Povezanost majčine pretilosti i gestacijskog dijabetesa s ekspresijom monoamin oksidaze A u posteljici

Cahunek, Iva

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:919802

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Iva Cahunek

Povezanost majčine pretilosti i gestacijskog dijabetesa s ekspresijom monoamin oksidaze A u posteljici

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Iva Cahunek

Association of maternal obesity and gestational diabetes with placental expression of monoamin oxidase A

Graduation thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom mentorice dr. sc. Jasminke Štefulj, te komentorstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

ZAHVALA

Ovim putem želim se zahvaliti mojoj mentorici prof. dr. sc. Jasminki Štefulj na ukazanoj prilici, povjerenju, ljubaznosti i stručnosti tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se Institutu Ruđer Bošković i cijelom Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju na podršci, svim savjetima i pomoći.

Veliko hvala dr.sc. Maji Kesić na uloženom trudu, energiji, ustrajnosti, savjetima i svim provedenim zajedničkim satima i ranojutarnjim buđenjima koja su uslijedila tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Također se zahvaljujem i svojoj komentorici prof. dr. sc. Dubravki Hranilović na cjelokupnom iskustvu, savjetima i prenesenom znanju tijekom ovog školovanja.

Nakon svega, posebno hvala mojoj sestri Margareti što je uvijek vjerovala u mene i ohrabrivala me u teškim trenucima.

Hvala roditeljima, čitavoj obitelji i prijateljima na razumijevanju i ustrajnosti tijekom ovih godina.

Hvala i svima onima koji su bili tu, a više nisu i onima koji još uvijek koračaju pored mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

Povezanost majčine pretilosti i gestacijskog dijabetesa s ekspresijom monoamin oksidaze A u posteljici

Iva Cahunek

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Majčina pretilost u trudnoći i gestacijski dijabetes melitus (GDM) su rastući javno-zdravstveni problemi širom svijeta, povezani s brojnim negativnim zdravstvenim posljedicama za majku i plod. Posteljica je organ koji osigurava izmjenu tvari i plinova između majčinog i fetalnog krvotoka. Serotonin, biogeni monoamin koji obnaša ulogu neurotransmitera, hormona i paraktinog/autokrinog glasnika, sudjeluje u regulaciji razvoja i različitih funkcija posteljice te je važan i za pravilan razvoj fetalnog mozga. Ključni enzim u razgradnji serotonina je monoamin oksidaza (MAO). Izoforma A ovog enzima (MAOA) ima preferencijalni afinitet za serotonin u odnosu na druge monoamine i visoko je eksprimirana u posteljici. Cilj ovog rada je istražiti jesu li majčina pretilost i GDM povezani s promijenjenom razinom proteina MAOA u posteljici. U tu svrhu, metodom *western blot*, određene su razine proteina MAOA u uzorcma posteljica ženske (N=48) i muške (N=50) novorođenčadi čije majke su imale različiti metabolički status u trudnoći. Razine proteina MAOA u posteljici nisu se statistički značajno razlikovale između novorođenčadi majki s različitim metaboličkim statusom, neovisno o spolu novorođenčadi. Dobiveni rezultati pokazuju da GDM i debljina nisu povezani s promijenjenom ekspresijom proteina MAOA u posteljici.

Ključne riječi: MAOA, placenta, 5-hidroksitriptamin, GDM, pretilost, trudnoća
(49 stranica, 14 slika, 5 tablica, 113 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. Vesna Benković
prof. dr. sc. Domagoj Đikić
prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology Graduation thesis

Association of maternal obesity and gestational diabetes with placental expression of monoamin oxidase A

Iva Cahunek

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Maternal obesity during pregnancy and GDM are growing public health problems worldwide, associated with a number of negative health consequences for the mother and fetus. The placenta is an organ that ensures the exchange of substances and gases between the maternal and fetal bloodstreams. Serotonin, a biogenic monoamine that acts as a neurotransmitter, hormone and paracrine/autocrine messenger, participates in the regulation of the development and various functions of the placenta and is also important for the proper development of the fetal brain. The key enzyme in the breakdown of serotonin is monoamine oxidase (MAO). Isoform A of this enzyme (MAOA) has a preferential affinity for serotonin over other monoamines and is highly expressed in the placenta. The aim of this study is to investigate whether maternal obesity and GDM are associated with altered MAOA protein levels in the placenta. For this purpose, using the western blot method, MAOA protein levels were determined in placental samples of female (N=48) and male (N=50) newborns whose mothers had different metabolic status during pregnancy. The MAOA protein levels in the placenta were not statistically significantly different between the newborns of mothers with different metabolic status, regardless of the sex of the newborn.The obtained results show that GDM and obesity are not associated with altered MAOA protein expression in the placenta.

Keywords: MAOA, placenta, 5-hydroxytryptamine, GDM, obesity
(49 pages, 14 figures, 5 tables, 113 references, original in: croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Jasminka Štefulj, PhD
Co-mentor: Prof. Dubravka Hranilović, PhD

Reviewers: Prof. Vesna Benković, PhD
Prof. Domagoj Đikić, PhD
Prof. Dubravka Hranilović, PhD

Thesis accepted:

Sadržaj

1. Uvod ... 1
1.1. Prekomjerna tjelesna masa i pretilost ... 1
1.1.1. Klinički problem u trudnica s prekomjernom tjelesnom masom i pretilošću ... 2
1.2. Gestacijski dijabetes melitus (GDM) ... 3
1.2.1. Kliničke posljedice GDM-a ... 3
1.3. Posteljica ... 4
1.3.1. Posteljica i majčino metaboličko stanje (debljina i GDM) ... 5
1.3.2. Posteljica i serotonin ... 8
1.4. Monoamin oksidaza A ... 11
2. Cilj istraživanja ... 13
3. Materijali i metode ... 14
3.1. Uzorci tkiva posteljice ... 14
3.2. Materijali ... 14
3.2.1. Protutijela ... 14
3.2.2. Komercijalni kompleti ... 15
3.2.3. Kemikalije i otopine ... 15
3.2.4. Tehnička oprema i pribor ... 16
3.3. Metode ... 17
3.3.1. Optimizacija metode za izolaciju ukupnih proteina iz tkiva posteljice ... 17
3.3.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina ... 18
3.3.3. SDS-PAGE i western blot ... 19
3.3.3.1.Priprema uzoraka za SDS-PAGE ... 19
3.3.3.2. Priprema gelova za SDS-PAGE ... 20
3.3.3.3. SDS PAGE ... 21
3.3.3.4. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu i njihovo specifično obilježavanje ... 22
3.4. Obrada podataka ... 24
4. Rezultati ... 24
4.1. Podaci o sudionicima istraživanja ... 24
4.2. Optimizacija metode za kvantitativno određivanje razine proteina MAOA u ljudskoj posteljici ... 25
4.3. Usporedba razine proteina MAOA u ljudskoj posteljici između sudionica s različitim metaboličkim statusom ... 28
4.3.1. Muška novorođenčad ... 30
4.3.2. Ženska novorođenčad ... 32
5. Rasprava ... 34
6. Zaključak ... 37
7. Literatura ... 38
8. Životopis ... 49

Kratice

5-HIAA - 5-hidroksiindol octena kiselina, eng. *5-hydroxyindoleacetic acid*

5-HIAL - 5-hidroksiindolacetaldehid

5-HT - 5-hidroksitriptamin, serotonin

AADC - dekarboksilaza aromatskih L-aminokiselina, eng. *aromatic L-amino acid decarboxylase*

ACTB - aktin beta, eng. *Actin Beta*

GTT – test tolerancije na glukozu, eng. *glucose tolerance test*

GDM - gestacijski dijabetes melitus

GLUT4 - glukozni transporter 4

HDL - lipoprotein visoke gustoće, eng. *high-density lipoprotein*

IRS - supstrati inzulinskog receptora, eng. *insulin-receptor substrates*

ITM - indeks tjelesne mase

LDL - lipoproteini niske gustoće, eng. *low density lipoproteins*

LGA - novorođenče preveliko za gestacijsku dob, eng. *large for gestational age*

MAO – monoamin oksidaza

oGTT - oralni test tolerancije na glukozu, eng. *oral glucose tolerance test*

PE - preeklampsija

SERT – serotoninski prijenosnik, eng. *serotonin transporter*

STM – status tjelesne mase

T2DM - dijabetes melitus tip 2, eng. *type 2 diabetes mellitus*

TNF – faktor nekroze tumora, eng. *tumor necrosis factor*

TPH - triptofan hidroksilaza, eng. *tryptophan hydroxylase*

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija, eng. *World Health Organization*

1. Uvod

1.1. Prekomjerna tjelesna masa i pretilost

Prekomjerna tjelesna masa i pretilost (u nastavku će izraz ″debljina″ podrazumijevati prekomjernu tjelesnu masu ili pretilost) su metabolički poremećaji koji nastaju uslijed prekomjernog nakupljanja masnog tkiva u organizmu, što dovodi do povećanja tjelesne mase. Debljina nastaje zbog neravnoteže između dnevnog unosa i potrošnje energije, prilikom čega tijelo pohranjuje nastali kalorijski višak u obliku masti (Berg, 2013; Panuganti, 2023). Mjera kojom se najčešće klasificira status tjelesne mase je indeks tjelesne mase (ITM), koji se izračunava na sljedeći način (Guyton i Hall, 2017):

$$\text{ITM} = \frac{\text{tjelesna masa u kilogramima}}{\text{visina u metrima}^2}$$

Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, eng. *World Health Organization*), vrijednosti ITM<18,5 kg/m^2 upućuju na pothranjenost, vrijednosti ITM 18,5 – 24,9 kg/m^2 na normalnu tjelesnu masu, vrijednosti ITM 25,0 – 29,9 kg/m^2 na povećanu tjelesnu masu, a vrijednosti ITM više od 30,0 kg/m^2 na pretilost (Tablica 1.) (World Health Organization 2010).

Tablica 1. Status tjelesne mase (World Health Organization 2010)

ITM (kg/m^2)	**Status tjelesne mase**
<18,5	Pothranjenost
18,5 – 24,9	Normalna tjelesna masa
25,0 – 29,9	Prekomjerna tjelesna masa
30,0 – 34,9	Pretilost tipa 1
35,0 – 39,9	Pretilost tipa 2
> 40,0	Pretilost tipa 3

Debljina nastaje kao rezultat interakcije genetičkih čimbenika i drugih nepovoljnih čimbenika poput kulturoloških, socioekonomskih te osobnim odabirom fizičke aktivnosti i

prehrambenih navika (Panuganti, 2023). Povišeni ITM negativno utječe na sve aspekte života te je ujedno jedan od rizičnih čimbenika koji se povezuje s nastankom dijabetesa, bolesti srca i krvnih žila, povišenog krvnog tlaka, moždanog i srčanog udara, ciroze, bolesti bubrega, tumora (Guyton i Hall, 2017; Berg, 2013; Jin i sur., 2023). Trudnice s povišenim ITM-om imaju povišene postprandijalne koncetracije inzulina, lipida, leptina, IGF-1 (inzulinu sličan faktor rasta, eng. *insulin-like growth factor 1*), proupalnih citokina te smanjene razine adipokina u odnosu na trudnice s normalnim ITM-om (Pantham i sur., 2015; Barbour i sur., 2018a; Jin i sur. 2023). Povišene razine glukoze i lipida u cirkulaciji majke prolaze kroz posteljičnu barijeru u fetalni krvotok, što ima za posljedicu fetalnu hiperglikemiju i hiperlipidemiju s negativnim ishodom na fetus. Također ima utjecaj i na rad i funkciju posteljice zbog metaboličkih signala koje šalje tijelo majke s prekomjernom tjelesnom masom ili pretilošću (Jansson i Powell, 2013; Vaughan i sur., 2017). Osim toga, majčina debljina povezuje se i s imunološkim promjenama poput povećanog izlučivanja prouplanih citokina kao što su interleukin 6 (IL-6), C reaktivni protein (CRP), TNF- α (faktor nekroze tumora α, eng. *tumor necrosis factor α*), monocitni kemoatraktantni protein 1 (MCP-1) (Aye i sur., 2014) i interleukin 8 (IL-8) (Challier i sur., 2008, Ramsay i sur., 2002). Smatra se da ovakvo proupalno stanje nije karakteristično za sve pretile trudnice već se javlja samo u nekim podskupinama pretilih žena (Pendeloski i sur., 2017). Također dolazi i do polarizacije makrofaga iz protuupalnog fenotipa M2 u fenotip M1 koji promovira upalno stanje u organizmu (Pantham i sur., 2015).

1.1.1. Klinički problem u trudnica s prekomjernom tjelesnom masom i pretilošću

Prekomjerna tjelesna masa i pretilost u trudnoći imaju negativan utjecaj kako na majku tako i na fetus jer dovode do kratkotrajnih posljedica poput povećanog rizika od hipertenzivnih poremećaja, preeklampsije (PE), makrosomije, venske tromboembolije, gestacijskog dijabetesa melitusa (GDM), neonatalne hipoglikemije, poroda carskim rezom, opstetričke traume, postporođajnog krvarenja, te perinatalne smrti djeteta (Fuchs i sur., 2017; Ehrenberg i sur., 2004; Ornaghi i sur., 2015; Turner i sur., 2019; Jolly i sur., 2003; Boulet i sur., 2004). Makrosomija uzrokuje veće stope porođaja carskim rezom, ali i komplikacije tijekom poroda poput distocije ramena, ozljeda brahijalnog pleksusa, ozljede kostura, aspiracije mekonija, perinatalne asfiksije (Jolly i sur., 2003; Nesbitt i sur., 1998), dok neonatalna hipoglikemija ima neurorazvojne posljedice (Turner i sur., 2019; Stanley i sur., 2015).

Osim kratkotrajnih posljedica, majčina debljina dovodi i do dugotrajnih posljedica za dijete, te se povezuje s povećanim rizikom za razvoj astme (Forno i sur., 2014), neurokognitivnih poremećaja (Basatemur i sur., 2013), pretilosti, dijabetesa tipa 2 (T2DM, eng. *type 2 diabetes mellitus*) (Boney i sur., 2015), metaboličkog sindroma (Armitage i sur., 2008), te kardiovaskularnih bolesti (Reynolds i sur., 2013) u djetinjstvu i odrasloj dobi.

1.2. Gestacijski dijabetes melitus (GDM)

Poremećaj metabolizma ugljikohidrata, masti i bjelančevina kojem je uzrok nedostatno lučenje inzulina ili smanjena osjetljivost tkiva na inzulin naziva se šećerna bolest ili dijabetes melitus (lat. *diabetes mellitus*). GDM je oblik dijabetesa koji se prvi puta dijagnosticira u trudnoći (McIntyre i sur., 2019). Detektira se u kasnom drugom tromjesečju, obično između 24. i 28. tjedna trudnoće pomoću oralnog testa tolerancije glukoze (OGTT, eng. *oral glucose tolerance test*), koji je uveden u kliničku praksu u Hrvatskoj (Lovrenčić i sur., 2013). Za potvrdu dijagnoze GDM-a, iznos glukoze natašte u venskoj plazmi mora iznositi 5,1 mmol/L, 60 minuta nakon oralne primjene glukoze (75g) koncentracija glukoze u venskoj plazmi mora iznositi 10,0 mmol/L i/ili 120 minuta nakon opterećenja glukozom mora iznositi 8,5 mmol/L (Lovrenčić i sur., 2013). Veću predispoziciju za obolijevanje od GDM-a imaju majke kod kojih je prisutna debljina, nedostatak mikronutrijenata i zapadnjački stil prehrane, starija dob majke prilikom trudnoće, obiteljska povijest dijabetes melitusa tipa 2 i etnička pripadnost (Azijati).

1.2.1. Kliničke posljedice GDM-a

Kratkotrajne komplikacije koje majčina hiperglikemija može izazvati su preeklampsija, prijevremeni porod, novorođenčad prevelika za gestacijsku dob (LGA, eng. *large for gestational age*), distocija ramena, carski rez te neonatalna hipoglikemija i hiperbilirubinemija (Metzger i sur., 2008). Dugotrajne posljedice koje GDM može izazvati kod majke je povećan rizik za oboljenjem od dijabetesa, osobito T2DM (Cheung i Byth, 2003), ali i od kardiovaskularnih bolesti, metaboličkog sindroma, bolesti bubrega, jetre i mrežnice (Lauenborg i sur., 2005; Retnakaran, 2018b; Retnakaran i Shah, 2017b; Kramer i sur., 2019). Ukoliko se GDM ne liječi, on može uzrokovati dugotrajne rizike i za dijete. Klinička opažanja zabilježila su povećan rizik od dijabetesa i debljine kod djece čije su majke u trudnoći imale GDM (Silverman is ur., 1991; Dabelea i sur., 2000; Fraser i Lawlor, 2014). U istraživanju provedenom na trudnicama zabilježeno je da su djeca majki s GDM-om imala povećanu inzulinsku rezistenciju, razinu glukoze natašte, prekomjernu tjelesnu masu ili pretilost i kardiovaskularne probleme (Grunnet i sur., 2017). Istraživanja su sugerirala da je GDM

značajan čimbenik rizika za razvoj pretilosti kod potomaka i kada se analize prilagode s obzirom na majčin ITM (Lowe i sur., 2019a; Lowe i sur., 2019b). Neka istraživanja sugeriraju da potomci žena s GDM-om imaju povećan rizik od poremećaja autističnog spektra, poremećaja pažnje i hiperaktivnosti (Xiang i sur., 2015; Xiang i sur., 2018).

1.3. Posteljica

Posteljica je fetalni organ koji se razvija rano u trudnoći, a čiji razvoj započinje već unutar nekoliko dana od same oplodnje. Blastocista se implementira u stijenku maternice pomoću stanica trofoblasta koji oblažu njezinu površinu. Od tih stanica nastat će posteljica i membrane koje se stvaraju tijekom trudnoće. Unutrašnji dio blastociste tvori embrioblast iz kojeg nastaje embrij dok vanjski dio tvori trofoblast iz kojeg nastaje amnion, korion i posteljica. Trofoblast nakon što prodre u epitel endometrija diferencira se na sinciciotrofoblast i citotrofoblast. Citotrofoblast izlučuje enzime za razgradnju međustaničnih veza u endometriju i omogućuje sinciciotoroblastu da invadira u stijenku endometrija. Sinciciotrofoblast odgovoran je za pravilno funkcioniranje posteljice u trudnoći, proizvodnju hormona te prijenos hranjivih tvari. Završetkom prvog tromjesečja osigura se protok majčine oksigenirane krvi te omogućuje majčinoj krvi da ispuni praznine nastale unutar sloja sinciciotrofoblasta. S vanjske strane formiranih tračaka trofoblasta, istovremeno dolazi do formiranja krvnih sinusa kroz koje prolazi krv majke. Daljnji razvoj i invazija trofoblasta tvore nastavke koji formiraju posteljične resice u koje također urastaju krvne kapilare fetusa, a obavijaju ih sinusi s majčinom krvlju. Progesteron kojeg luči žuto tijelo iz jajnika osigurava da se endometrijske stanice strome pretvore u velike i nabubrene stanice koje pohranjuju glikogen, masti, bjelančevine i mineralne tvari za rast i razvoj ploda. Nakon implantacije, progesteron se počinje konstantno lučiti te se nastavlja bubrenje endometrijskih stanica za pohranu hranjivih tvari pa se te stanice nazivaju decidualnim stanicama, a čitava njihova tvorevina deciduom. Embrij se u narednih 8 tjedana hrani isključivo preko tvari iz decidualnih stanica, a njima se nakon 16 dana od oplodnje postepeno pridružuje i posteljica koja nakon nekog vremena potpuno preuzima ulogu prehrane fetusa.

Glavna uloga posteljice je da prenosi hranjive tvari i kisik iz krvi majke u krv fetusa, eliminira otpadne tvari iz krvi fetusa u majčinu krv te vrši i endokrinu ulogu. Tijekom trudnoće izlučuje razne hormone poput ljudskog korionskog gonadotropina, estrogena, progesterona, ljudskog korionskog somatomamotropina, ali i čimbenika rasta i citokine koji sudjeluju u regulaciji majčinih fizioloških funkcija tijekom trudnoće te regulaciji rasta i razvoja fetusa (Guyton i Hall, 2013; Kos i Leniček, 2011).

1.3.1. Posteljica i majčino metaboličko stanje (debljina i GDM)

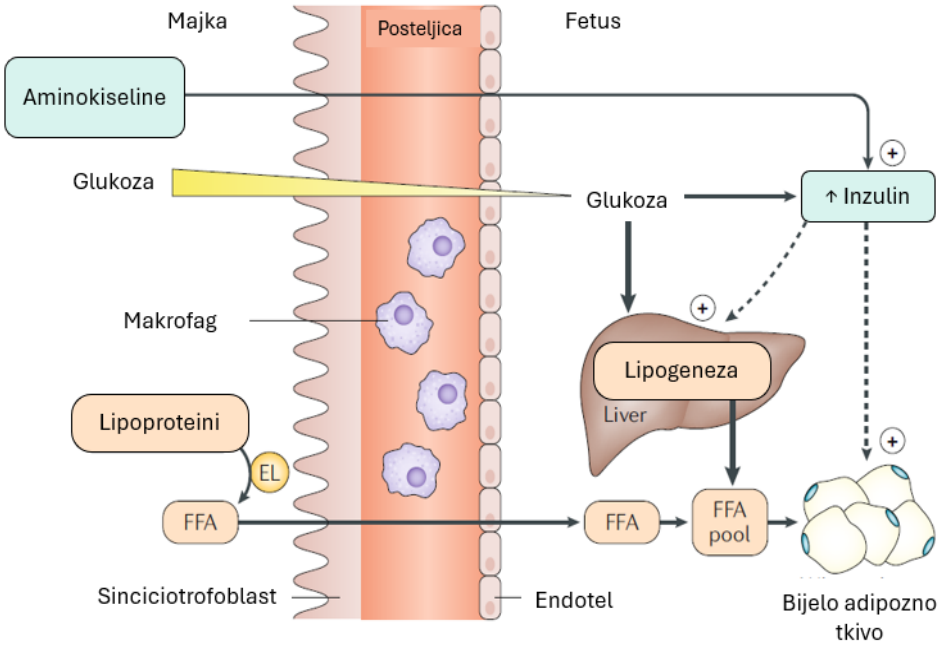
Kao što je prije spomenuto, posteljica je privremeni fetalni organ koji posreduje u komunikaciji između krvotoka majke i fetusa kako bi zadovoljila potrebe za pravilan rast i razvoj fetusa. U tu svrhu koristi se majčinim izvorima energije te sudjeluje i u utjecaju majčinih metaboličkih poremećaja na fetus. Metabolički poremećaji odnose se na hiperglikemiju, povišene koncentracije masnih kiselina i aminokiselina u cirkulaciji majke (McIntrye i sur., 2019). U trudnica s GDM-om nutritivna opskrba fetusa postaje prekomjerna čime se smanjuje mogućnost štićenja fetusa od strane posteljice (Desoye i Shafrir, 1994). Količina glukoze koja od majke dospije do fetusa važna je determinanta za određivanje koncentracije glukoze između fetalne i majčine cirkulacije, a sam gradijent je određen majčinom glikemijom i razinom glukoze u fetusu. Fetalni inzulin modificira fetalnu glikemiju, a koncentracije inzulina kod GDM-a su povišene što dovodi do fetalne hiperinzulinemije kako bi se olakšao unos glukoze u periferna tkiva i u svrhu povećavanja koncentracijskog gradijenta (McIntrye i sur., 2019). U tim uvjetima dolazi i do fenomena fetalne krađe glukoze prilikom čega fetus povlači glukozu iz majčine cirkulacije i sebi osigurava više majčine glukoze u cirkulaciji (McIntrye i sazgraur., 2019; Desoye i Nolan, 2016).

Masne kiseline su manje učinkovitije u posteljičnom prijenosnom sustavu od glukoze jer fetus samostalno može sintetizirati neesencijalne masne kiseline iz glukoze koja mu služi kao prekursor (Slika 1.) (Haggarty i sur., 1997; McIntrye i sur., 2019). Smatra se da kod GDM-a dolazi do izmjene samo kod esencijalne masne kiseline dokozaheksaenske kiseline koja osigurava razvoj mozga i dolazi iz majčinih izvora (Pagan i sur., 2013). U žena s GDM-om zabilježene su niže razine dokozaheksaenske kiseline zbog smanjene razine njenog transportera NLS1 (eng. *Nuclear localization signal* 1) u posteljici za ~30% u odnosu na trudnice sa normoglikemijom (Prieto- Sanchez i sur., 2017; McIntrye i sur., 2019).

Promjene koje se odvijaju u posteljici tijekom GDM-a imaju utjecaj i na puferski kapacitet posteljice. Hiperinzulinemija koja se javlja u GDM-u stimulira fetalni aerobni metabolizam dok crvene krvne stanice i eritropoetin iz pupkovine stvaraju stanje fetalne hipoksije prilikom čega dolazi do povećane potreba za kisikom te posteljica povećava površinu kapilara (Gauster i sur., 2012; McIntrye i sur., 2019). Posteljica u uvjetima niske razine kisika, hiperinzulinemije i promijenjene razine faktora angiogeneze stimulira proces angiogeneze (Cvitic i sur.,2014; Lassance i sur.,2013). Promijene se očituju i u broju i funkciji trofoblasta i makrofaga koji su važni za normalnu funkciju posteljice (Loegl i sur., 2016a; Loegl i sur., 2016b). Oni vrše regulaciju vaskularizacije posteljice koja je kod stanja GDM-a zbog

višestrukih signala hipervaskularizirana (McIntrye i sur., 2019). Kod GDM-a, u endotelnim stanicama posteljice, dolazi do povećane sinteze kolesterola koje stanični i molekularni mehanizmi nastoje ukloniti iz feto-posteljične cirkulacije kako ne bi došlo do stvaranja preateroskleroznih lezija koje bi uzrokovale smanjeni protok krvi (Sun i sur., 2018; Scholler i sur., 2012). Posteljica ima ograničeni kapacitet kojim nastoji prigušiti ovakav intrauterini okoliš te ukoliko su promjene u majčinom organizmu ekstremne pod utjecajem neliječenog GDM-a ili GDM-a u kombinaciji s debljinom, tada može doći do stvaranja patoloških učinaka na fetus jer se nadjača puferski kapacitet kojim se posteljica i fetus štite (Desoye, 2018; Gauster i sur., 2011). Nakon što se formiraju fetalni organi, posteljica prelazi pod utjecaj i kontrolu fetusa u drugoj polovici gestacije te postaje manje osjetljiva na promjene u majčinom organizmu. U prvoj polovici gestacije posteljica je pod utjecajem i kontrolom majke (Desoye i Hauguel- de Mouzon, 2007). Privih 10-12 tjedana trudnoće, posteljica ima nisku razinu antioksidativnih enzima te slabu antioksidativnu obranu što uzrokuje veću osjetljivost na upalne i oksidativne procese koji su češći kod trudnica sa GDM-om i/ili debljinom (Lappas i sur., 2011; Hoch i sur., 2018).

GDM ima dugotrajni metabolički učinak na potomstvo (Eder i sur., 2016; McIntrye i sur., 2019). Glukoza iz krvotoka majke glavni je izvor za rast fetusa. U trudnica koje boluju od T1DM (eng. *type 1 diabetes mellitus*) ili GDM-a dolazi do produljene izloženosti fetalne gušterače hiperglikemiji što rezultira ranom hiperinzulinemijom koja za posljedicu ima fetalnu hiperglikemiju. Produljena izloženost fetusa aminokiselinama leucin i arginin stimuliraju gušteraču fetusa i izazivaju hiperinzulinemiju. Slobodne masne kiseline (FFA, eng. *free-faty acid*) oslobađaju se iz lipoproteina majke procesom lipolize u kojem sudjeluju endotelne lipaze (EL) na površini posteljice i pridonose FFA-skupu (eng. *FFA pool*), a samo manji udio prolazi posteljicu. FFA-skup se uglavnom sastoji od slobodnih masnih kiselina iz fetalne jetre nastale procesom lipogeneze *de novo* (Slika 1.). Višak glukoze koji se javlja kod prekomjerne prehrane majke služi kao prekursor za lipogenezu. Sinteza triglicerida i skladištenje masti u bijelim adipocitima fetusa stimulirani su fetalnim inzulinom. Neonatalno taloženje masti ovisno je o spolu te ima veću povezanost s inzulinom iz pupkovine kod muške nego kod ženske novorođenčadi (Eder i sur., 2016; McIntrye i sur., 2019).



Slika 1. Posteljica u GDM-u. Majčina glukoza je važan makronutrijent za razvoj fetusa. Na površini posteljice slobodne masne kiseline oslobađaju se lipolizom uz pomoć endotelnih lipaza. Kroz posteljicu prolazi manji udio slobodnih masnih kiselina koje pridonose jetrenoj lipogenezi *de novo*. Sinteza triglicerida stimulirana je fetalnim inzulinom, a samim time potaknuto je i skladištenje masti u bijele adipocite što ovisi o spolu. Pune linije prikazuju protok makronutrijenata dok isprekidane predstavljaju regulacijske mehanizme fetalnog inzulina. EL – enotelne lipaze; FFA - slobodne masne kiseline; FFA *pool*- FFA-skup (Preuzeto i prilagođeno iz McIntrye i sur., 2019)

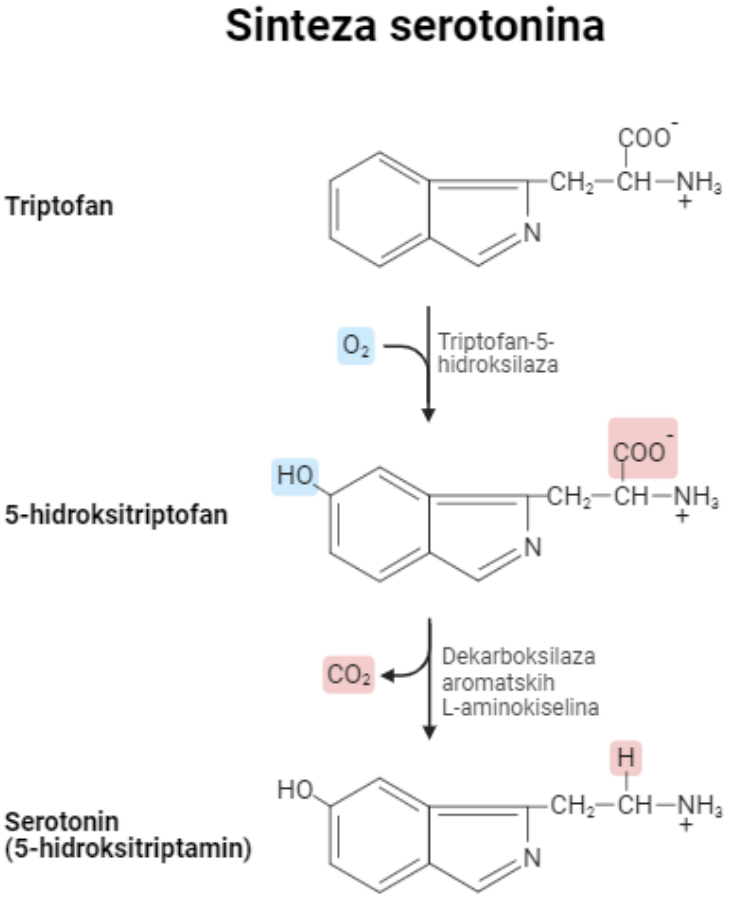
U pretilih trudnica dolazi do promijene metabolita, faktora rasta, citokina i hormona koji utječu na funkciju posteljice. Pretilost trudnice povezuje se s hiperinzulinemijom koja ima utjecaj na aktivaciju posteljične glukoze i transportera aminokiselinskog sustava A. Visoka razina leptina u pretilih trudnica potiče lipolizu posteljice koja nema utjecaja na sintezu lipida, a rezultira smanjenjem razine posteljičnih triglicerida i kolesterola, stimulira oslobađanje IL-6, dušikovog oksida i humanog korionskog gonadotropina iz stanica posteljice. Zabilježeno je da snižena razina adiponektina kod pretilih trudnica povećava signalizaciju inzulina u posteljici te i sam transport hranjivih tvari i dovodi do makrosomije. Kod ovog stanja zabilježena je i povećana koncentracija IGF-1 čija bioraspoloživost u pretilih majki, zajedno sa sniženim IGFBP potiče posteljični unos hranjivih tvari i prijenos na fetus. Povišeni citokini TNF i IL-6 utječu na metabolizam posteljice te transport lipida i aminokiselina u posteljici. U pretilih trudnica zabilježena je i različita ekspresija gena u posteljici, koja se odnosi na metabolizam lipida u odnosu na trudnice sa normalnih ITM-om (Kelly i sur., 2020).

U pretilih trudnica dvije su ključne promjene koje se odvijaju u posteljici. Jedna promjena odnosi se na posteljične transkripte, proteine i metabolite koji su povezani s metabolizmom lipida dok je druga promjena vezana uz upalne/imunološke odgovore koji su različito izraženi u posteljicama pretilih trudnica. Utvrđeno je da posteljica pretilih trudnica ima smanjenu ekspresiju određenih gena koji su povezani s metabolizmom lipida (*APOE, DKK1, ANGPTL4 i NRIP1*) te povećanu količinu lipidnih kapljica koje se vežu uz protein CIDEA (eng. *Cell Death Inducing DFFA Like Effector A*) što opravdava povećanu razinu triglicerida u trofoblastu pretilih trudnica. Dolazi do smanjenja ekspresije gena koji su zaduženi za transport i metabolizam retinoične kiseline (vitamin A) koja vrši važnu ulogu u posteljici. Također je smanjena funkcija posteljičnog *mTOR* gena te je pojačana regulacija gena koji su zaduženi za oksidativni stres i funkciju mitohondrija, a zabilježen je i povećan transport kolesterola u stanice trofoblasta. To sve dovodi do lipotoksičnosti posteljice zbog povećanog udjela lipida te smanjenje antioksidativne sposobnosti stanica trofoblasta u pretilih trudnica (Kelly i sur., 2020).

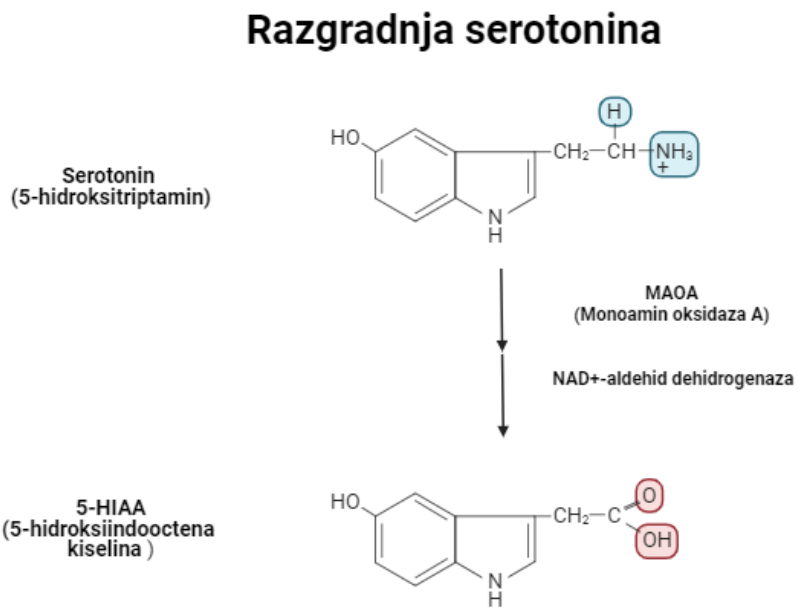
1.3.2. Posteljica i serotonin

Različite signalne molekule osiguravaju pravilan razvoj i funkciju posteljice. Jedna od važnih molekula je i serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT), biogeni monoamin koji obnaša ulogu neurotransmitera, hormona i parakrinog/autokrinog glasnika (Berger i sur., 2017). Prvi puta je izoliran 1937. godine iz enterokromafinih stanica tankog crijeva, gdje potiče kontrakcije (Erspamer i Vialli, 1937). Nedugo nakon toga, otkrivena je njegova funkcija u regulaciji tonusa krvnih žila pa je stoga dobio i naziv serotonin (Rapport i sur., 1948). Daljnja istraživanja pokazala su da se sintetizira i u mozgu i u nekim perifernim organima. Danas je poznato da serotonin ima ulogu u regulaciji moždanih funkcija (emocije, kognicija, raspoloženje, ritam spavanja i budnosti, seksualno ponašanje, percepcija boli, apetit) (Jacobs i Azmitia, 1992), ali i brojnih drugih fizioloških procesa (hemostaza, imunološki procesi, reproduktivni procesi, gastrointestinalni procesi i drugi) (Yabut i sur., 2029; Berger i sur., 2017). Također vrši i kontrolu nad staničnim procesima proliferacije, migracije, diferencijacije i apoptoze (Azmitia, 2001). Sama sinteza serotonina odvija se u dva metabolički odvojena sustava, centralnom i perifernom odjeljku. Većina proizvodnje i skladištenja serotonina na periferiji odvija se u enterokromafilnim stanicama gastrointestinalnog trakta odakle se izlučuje u cirkulaciju te brzo unosi u trombocite ili manjim udjelom ostaje slobodan u plazmi (Lechin i sur., 1996).

Sinteza serotonina odvija se putem dva enzimatska koraka iz L-triptofana koji služi kao prekursor. Prvi korak je kataliziran triptofan hidroksilazom 1 (TPH1) ili 2 (TPH2) (izoformama odgovornim za sintezu serotonina u različitim odjeljcima), a drugi korak katalizira dekarboksilaza aromatskih L-aminokiselina (AADC, od eng. *aromatic L-amino acid decarboxylase*) (Slika 2.). Razgradnja serotonina također se odvija u dva enzimatska koraka gdje u prvom sudjeluje monoamin oksidaza A (MAOA)(Slika 3.) ili monoamin oksidaza B (MAOB) i određuju brzinu cijelog kataboličkog puta.



Slika 2. Sinteza serotonina (5-HT). Ilustracija je izrađena u programu BioRender



Slika 3. Razgradnja serotonina (5-HT). Ilustracija je izrađena u programu BioRender

Zbog svoje hidrofilnosti, serotonin ne može prolaziti kroz fosfolipidni dvosloj već se mora koristiti svojim specifičnim membranskim prijenosnicima te u tu svrhu postoje dva sustava transportera na plazmatskoj membrani koji omogućuju njegov prijenos, a razlikuju se u kinetičkim svojstvima. Prvi sustav karakterizira svojstvo visokog afiniteta i niskog kapaciteta i u tu skupinu spada serotoninski transporter SERT (eng. *serotonin transporter*) (Ramamoorthy i sur., 1998). SERT je visoko specifičan transporter za serotonin te je rasprostranjen u neuronima, ali ga sadrže i periferna tkiva poput posteljice (Baković i sur., 2021). Drugi sustav ima obrnuta svojstva tako da je niskog afinitieta, a visokog kapaciteta te u tu skupinu spadaju PMAT (eng. *plasma membrane monoamine transporter*) i OCTs (eng. *organic cation transporters*) 1, 2 i 3 koji mogu transportirati serotonin, ali i druge monoamine (Duan i Wang., 2010; Perić i sur., 2022). Nakon ulaska u stanicu, serotonin se može skladištiti u unutarstaničnim oraganelima za skladištenje kod enterokromafinih stanica, u trombocitima ili neuronima, a oslobađa se iz stanica egzocitozom kada je organizmu potreban. Serotoninski receptori (HTR1-HTR7) nalaze se na staničnoj membrani te putem njih serotonin vrši svoje djelovanje. Kod ljudi je utvrđeno da postoji 14 podtipova serotoninskih receptora (Sharp i Barnes, 2020).

Posteljica također izražava brojne komponente serotoninskog sustava (Perić i sur., 2022). Pokazano je da serotoninski sustav posteljice sudjeluje u regulaciji razvoja i različitih

funkcija posteljice (Perić i sur., 2022) te je važan za pravilan razvoj fetalnog mozga i samih neurona (Rosenfeld, 2020). Odstupanje od normalne funkcije serotoninskog sustava posteljice povezuju se s različitim patološkim stanjim, poput GDM-a, debljine, preeklampsije, zastoja fetalnog rasta i peripartalne depresije (Perić i sur., 2022).

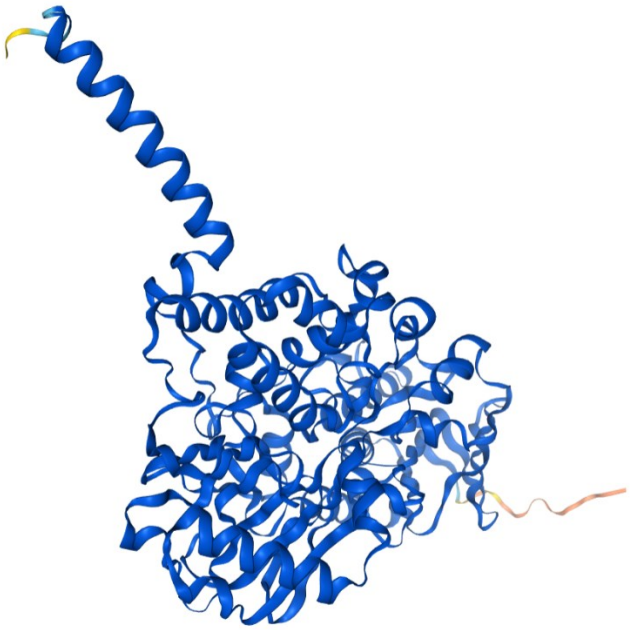
Serotonin regulira razvoj posteljice putem proliferacije i apoptoze trofoblasta, regulacije posteljično-umbilikalnog krvotoka i same endokrine uloge posteljice (Hadden i sur, 2017; Perić i sur., 2022). Istraživanja sugeriraju da se tijekom ranog razvoja fetus opskrbljuje serotoninom iz posteljice na dva načina. Prvi način je da posteljica proizvodi serotonin pomoću triptofana iz majčinog krvotoka (Bonnin i sur., 2011), dok je drugi način putem specifičnih prijenosnika koji dopremaju serotonin od majčinog krvotoka do posteljice i na kraju do samog ploda (Kliman i sur., 2018). Prije nego što fetalna tkiva sama započnu sa sintezom serotonina, ova dva načina su potrebna fetusu kako bi se pravilno mogao razvijati mozak (Perić i sur., 2022). Serotonin ima važnu ulogu za razvoj i funkciju kako posteljice tako i samog fetusa.

Kod ljudi je zabilježeno da postoje metaboličke razlike serotonina između spolova. Razlike se očituju u koncentraciji serotonina i njegovih metabolita te brzini njegove sinteze u središnjem živčanom sustavu. Osim toga, postoji razlika i u gustoći i rasprostranjenosti SERT-a u mozgu između muškaraca i žena. Ove razlike javljaju se već u ranoj fazi razvoja, a na njih utječu prenatalni i perinatalni faktori (Perić i sur., 2022).

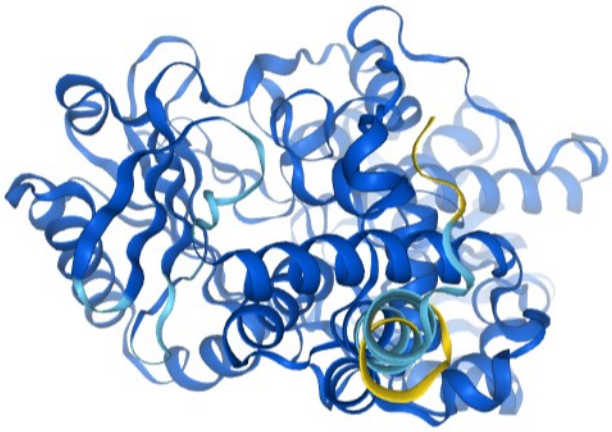
1.4. Monoamin oksidaza A

Monoamin oksidaza (MAO) je enzim iz skupine flavoenzimskih oksidaza. U tu skupinu pripadaju enzimi čija je prostetička skupina FAD (flavin adenin dinukleotid). Kao akceptor elektrona u reakcijama koriste kisik te vrše oksidaciju amina u dva koraka. MAO je otkrivena 1928. godine u ekstraktu jetre kunića (Hare, 1928). Prvotni naziv dodijeljen je na temelju njenog supstrata tiramina te se nazivala tiramin oksidaza, ali je naknadno nazvana amin oksidaza zbog metaboliziranja amina (Richter, 1937). Ključan je razgradni enzim serotonina, a smješten je na vanjskoj strani mitohondrijske membrane u neuronima, gliji i drugim stanicama (Yabut i sur., 2019; Frazer i Hensler, 1999). Iz serotonina pomoću enzima MAOA stvara se 5-hidroksiindolacetaldehid (5-HIAL, eng. *5-hydroxyindoleacetaldehyde*) kojeg zatim NAD^+-aldehid dehidrogenaza pretvara u 5-hidroksiindoloctenu kiselinu (5-HIAA, eng. *5-hydroxyindoleacetic acid*) koji je konačan produkt razgradnje i izlučuje se iz organizma putem bubrega (Frazer i Hensler, 1999) (Slika 3.).

Postoje dvije izoforme ovog enzima: MAOA (Slika 4.) i MAOB (Slika 5.). Geni za obje izoforme su u ljudi smješteni na kraćem kraku kromosoma X (Grimsby i sur., 1991), a iskazuju 73% sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci, dok se razlike očituju u specifičnosti za supstrate i inhibitore. Obje izoforme enzima MAO (MAOA i MAOB) smještene su na vanjskoj strani mitohondrijske membrane.



Slika 4. Struktura MAOA (preuzeto iz Protein Atlas)



Slika 5. Struktura MAOB (preuzeto iz Protein Atlas)

Specifično, izoforma MAOA ima preferentni afinitet za serotonin, ali i za adrenalin i noradrenalin te je visoko eksprimirana u posteljici dok izoforma MAOB ima veći afinitet za razgradnju drugih supstrata poput feniletilamina i benzilamina te se u posteljici nalazi u minimalnim količinama (Johnston, 1968; Knoll i Magyar, 1972). Izoforme MAOA i MAOB se razlikuju i s obzirom na rasprostranjenost u tkivima. MAOA je specifično prisutna u posteljici i gastrointestinalnom traktu dok je MAOB prisutna u trombocitima. Obje izoforme su eksprimirane u jetri i mozgu, ali MAOB ipak dominira u ovim tkivima u odnosu na MAOA (Waller i Sampson, 2018). MAOA je u izobilju prisutna u ljudskoj posteljici gdje ima važnu ulogu tijekom trudnoće. Eksprimira se u citotrofoblastu, sinciciotrofoblastu i feto-placentalnim endotelnim stanicama (Auda i sur., 1998; Kliman i sur., 2018; Baković i sur., 2023). Kako bi se fetus mogao neometano razvijati potrebno je održavati homeostazu serotonina u fetalnoj cirkulaciji. Krajem trudnoće, to se postiže tako da ga membranski prijenosnici, koji su zaduženi za prijenos serotonina, prenose iz fetalne cirkulacije u stanice posteljice gdje se vrši njegova razgradnja pomoću enzima MAOA i stvara se 5-HIAA koji se potom luči u majčinu cirkulaciju (Staud i sur., 2023). Istraživanja su pokazala da je promijenjena ekspresije i/ili aktivnosti ovog enzima u posteljici povezana s preeklampsijom, poremećajima neurorazvoja fetusa te s majčinim stresom u trudnoći i kasnijim promjenama temperamenta kod djeteta (Sivasubramaniam i sur., 2002; Rosenfeld, 2020; Pehme i sur., 2018). Međutim, potencijalna povezanost majčine pretilosti i GDM-a s razinom ekspresije ovog enzima u posteljici do sada nije istraživana.

2. Cilj istraživanja

Iako dosadašnja istraživanja ukazuju na ulogu serotonina u regulaciji razvoja i funkcija posteljice, organa čija je funkcija presudna za normalan tijek trudnoće i razvoj ploda, još uvijek se ne zna dovoljno o promjenama serotoninskog sustava posteljice kod trudnoća kompliciranih majčinom debljinom i GDM-om.

Stoga, glavni cilj ovog rada je istražiti jesu li majčina debljina i GDM povezani s promijenjenom razinom proteina MAOA u posteljici.

U skladu s tim, specifični ciljevi rada su:

1. uhodati metodu *western blot* za kvantitativno određivanje razine MAOA u ljudskoj posteljici;
2. odrediti razine MAOA u uzorcima posteljica sudionica istraživanja;

3. usporediti razinu proteina MAOA u posteljici između sudionica s različitim statusom tjelesne mase i tolerancije glukoze.

3. Materijali i metode

3.1. Uzorci tkiva posteljice

Istraživanje je provedeno na uzorcima tkiva ljudske posteljice, prethodno prikupljenim u Klinici za ženske bolesti i porođaje Kliničkog bolničkog centra (KBC) Zagreb, od sudionica čija je trudnoća dovršena planiranim carskim rezom. Uzorci tkiva posteljice uzeti su s fetalne strane posteljice prema prethodno opisanoj standardiziranoj proceduri (Blažević i sur., 2017; Horvatiček i sur., 2022). Svi postupci bili su u skladu s Helsinškom deklaracijom, a sve sudionice su potpisale pisani informirani pristanak. Uzorci su prikupljeni u okviru istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Utjecaj majčinog metaboličkog stanja na serotoninski sustav posteljice i neonatusa: od metilacije DNA do funkcije proteina (PlaNS)“ (HRZZ;IP-2018-01-6547), voditeljice prof. dr.sc. Jasminke Štefulj. Svi postupci pri sakupljanju i obradi uzoraka odobreni su od strane Etičkog povjerenstva KBC Zagreb (Klasa:8.1–18/162-2, Broj: 02/21 AG) i Bioetičkog povjerenstva Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu (BEP-8761/2-2018). Uzorci su po uzimanju pohranjeni u nativnom obliku pri - 80 °C do daljnje obrade.

Sudionice uključene u istraživanje bile su podijeljene u četiri metaboličke skupine: (1) sudionice s normalnom tjelesnom masom prije trudnoće (ITM < 25) i normalnom tolerancijom glukoze u trudnoći; (2) sudionice s normalnom tjelesnom masom prije trudnoće i GDM-om; (3) sudionice s prekomjernom tjelesnom masom ili pretilošću prije trudnoće (ITM ≥ 25) i normalnom tolerancijom glukoze u trudnoći; te (4) sudionice s prekomjernom tjelesnom masom ili pretilošću prije trudnoće i GDM-om. U svaku od navedenih metaboličkih skupina uključen je podjednak broj sudionica. Zbog mogućeg utjecaja spola djeteta na odnos između majčinog metaboličkih statusa i razine proteina MAOA u posteljici, analize sam provela zasebno u uzorcima posteljica iz trudnoća s muškom i trudnoća sa ženskom novorođenčadi.

3.2. Materijali

3.2.1. Protutijela

Monoklonalna primarna protutijela za monoamin oksidazu A mišijeg porijekla (Mouse monoclonal primary antibody MAO-A (G-10); kataloški broj: sc-71123) te za aktina beta (Mouse monoclonal primary antibody ACTIN-B (C-2); kataloški broj: sc-8432) nabavljena su od

tvrtke Santa Cruz Biotechnology. Sekundarno protutijelo za mišje molekule IgG, konjugirano s peroksidazom iz hrena i proizvedeno u ovci (Amersham ECL Horseradish peroxidase labelled anti-mouse antibody; kataloški broj: NIF825) nabavljeno je od tvrtke Cytiva. Protutijela su čuvana u alikvotima na - 80°C i odmrzavana neposredno prije primjene.

3.2.2. Komercijalni kompleti

- komplet za kemiluminiscentnu detekciju signala u Western blot analizi (Clarity i Clarity Max ECL Western Blotting Substrates, Bio-Rad Laboratories, Inc. SAD)
- komplet za inhibiciju proteaza (*HaltTM Protease Inhibitor Cocktail (100X)*, Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)
- komplet za određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom BCA (eng. *bicinchoninic acid*) – *Pierce*^{Tm} *BCA Protein Assay Kit*, Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)

3.2.3. Kemikalije i otopine

Za homogenizaciju tkiva

- reagens za izolaciju membanskih proteina uključujući površinske proteine i receptore u svrhu analize ELISA (*Cloud-clone Corp.*, Katy, TX, SAD)
- kalij-fosfatni pufer (KH_2PO_4, 0.05 M, pH 7.6; Kemika, Hrvatska)
- RIPA pufer (2.5 mL 1M TRIS pufera (pH 8), 1.5 mL 5M NaCl, 0.5 mL Triton X, 0.5 mL 10% SDS, 0.25 g natrijevog deoksikolata i H_2O do 50 mL; profiltritan: pore na PVDF filteru veličine 0.45 µm)
- DMEM medij

Za mjerenje ukupnih proteina

- miliQ voda

Za pripremu uzoraka za *western-blot* analizu

- 4× pufer za denaturaciju, pH 6.8 (0.2M Tris-HCl, 0.4M DDT, 8% SDS, 40% glicerol, 0.001% bromfenol plavo)

Za elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz natrijev dodecil sulfat (SDS-PAGE , od eng. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) i elektrotransfer proteina

- 30% otopina monomera akrilamid/bisakrilamid (AAS) (29:1) (Sigma-Aldrich, SAD)
- Tris pufer za elektroforezu, pH 8.8 (1.5M Tris)
- Tris pufer za sabijanje, pH 6.8 (1.0M Tris)
- 10% amonijev persulfat (APS) (Sigma-Aldrich, SAD)
- 10% natrijev dodecil sulfat (SDS, eng. *sodium dodecyl sulfate*; Sigma-Aldrich, SAD)
- 10× elektroforetski pufer (tris-glicinski pufer), pH 8.3 (0.025M Tris, 0.192M glicin, 1% SDS)
- 10× pufer za prijenos (184mM Tris, 140mM glicin)
- molekularna ljestvica - *Prestained Protein Ladder - Mid-range molecular weight (10 - 180 kDa)* (Abcam, Cambridge, Velika Britanija)
- naftol plavo (pufer za bojanje) (10% metanol, 2% octena kiselina, 0.1% naftol plavo) (Kemika, Hrvatska)
- otopina za odbojavanje (5% metanol, 7% octena kiselina)
- otopina za uklanjanje proteina, pH 2.2 (eng. *stripping pufer*)

Za imunodetekciju i kemiluminiscentnu vizualizaciju signala

- fosfatni pufer (PBS od engl. *phosphate buffer solution*), pH = 7,4: γ (NaCl) = 8 g/L, γ (KCl) = 0,2 g/L, γ (Na_2HPO_4) = 1,44 g/L, γ (KH_2PO_4) = 0,24 g/L, dH_2O
- TBS-T, pH 7.5 50mM Tris, 150mM NaCl, 0.5% Tween20
- pufer za blokiranje: 5% mlijeko u prahu u TBS-T puferu

Ostale kemikalije: NaCl, KCl, Na_2HPO_4, octena kiselina, glicin, Trizma® base, TEMED (N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine) (Sigma-Aldrich, SAD); metanol, gricerol (Gram-Mol, Hrvatska); 1,4- ditiotreitol (DDT) (Roche, Švicarska), DMEM medij (Gibco, Thermo Fisher, SAD)

3.2.4. Tehnička oprema i pribor

- ultrazvučni homogenizator (B. Braun Biotech International, Njemačka)
- automatske pipete i propipete (Eppendorf, Njemačka; Gilson, SAD)
- homogenizator (Tehtnica, Slovenija)

- homogenizator GentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec, Njemačka)
- epruvete za homogenizaciju tipa M (M-tube, Miltenyi Biotec, Njemačka)
- termomikser LLG-uni thermix1 (Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, Njemačka)
- inkubator Memmert 100-800 (Memmert GmbH, Njemačka)
- električne miješalice (IKA, Njemačka)
- pH metar Lab 845 (SI Analytics, Njemačka)
- magnetska miješalica (IKA Combimag RCH, Njemačka)
- centrifuge (Beckman GS-6R, SAD; Eppendorf Research, Njemačka)
- vage (Tehtnica, Slovenija; Mettler H54AR, Kern, Njemačka)
- digestor (Tlos, Hrvatska)
- hladnjak i zamrzivači (Gorenje, Slovenija)
- sustav za SDS-PAGE elektroforezu Hoefer SE 260 (Hoefer Inc., SAD)
- sustav za transfer Hoefer TE 22 (Hoefer Inc., SAD)
- uređaj za napajanje (*Cytiva EPS 301 Electrophoresis Power Supply*, Amersham Biosciences, Velika Britanija)
- transiluminator s digitalnom kamerom, Uvitec Alliance Q9 Mini (Cambridge, Velika Britanija)
- čitači mikrotitarskih pločica Labsystems Multiskan MS (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, SAD)
- Hybond ECL-Nitrocellulose Membrane (Amersham Biosciences, Velika Britanija)
- parafilm M (Sigma-Aldrich, SAD)
- pločice za mjerenje koncentracije proteine, 96-jažica, prozirne, ravno dno (Greiner Bio-One International GmbH, Austrija)
- *blotting* papir Munktell BF2
- nastavci za automatske pipete, filter papir, aluminijska folija, epruvete, mikroepruvete, stalci za epruvete, menzure, laboratorijske čaše, Erlenmeyerove tikvice, hvataljke

3.3. Metode

3.3.1. Optimizacija metode za izolaciju ukupnih proteina iz tkiva posteljice

U svrhu određivanja najpovoljnije metode izolacije ukupnih proteina iz tkiva posteljice čovjeka ispitala sam učinak različitih parametara na efikasnost same metode. Parametri koji su varirali bili su vrsta pufera za izolaciju proteina, metoda izolacije proteina te masa tkiva korištenoga za izolaciju proteina.

Prvi način homogenizacije tkiva uključivao je homogeniziranje tkiva pomoću uređaja za homogenizaciju *GentleMACS Dissociator S* . Uzorke tkiva posteljice izvadila sam neposredno prije rezanja iz zamrzivača te sam škaricama izrezala otprilike 400 mg tkiva na rashlađenoj podlozi obloženoj aluminijskom folijom. Uzorke sam zatim prebacila u GentleMACS epruvetu tipa M sa unaprijed pripremljenim RIPA puferom za homogeniziranje. Tkivo je homogenizirano u 2 mL RIPA pufera uz dodatak inhibitora proteaza (*HaltTM Protease Inhibitor Cocktail* (100X)), a odabrani program bio je M-TUBE Protein_01_01. Homogenat sam zatim centrifugirala 15 sekundi pri 196 x g, prebacila u novu plastičnu epruvetu pazeći da ne uzmem mjehuriće te dodatno homogenizirala sonikacijom (tri ciklusa od 10 s uz frekvenciju 20 KHz i amplitudu 8 µm). Nakon toga, sonikat sam centrifugirala 20 min pri 12200 x g i 4°C kako bi se istaložili nehomogenizirani ostaci tkiva. Svi postupci su rađeni na ledu kako bi se onemogućila aktivnost proteaza.

Drugi način homogenizacije tkiva uključivao je metodu homogeniziranja tkiva (50mg) titanovom mikrosondom (3 ciklusa od 10 s uz frekvenciju 20 KHz i amplitudu 8 µm) u 20 volumena hladnog kalij fosfatnog pufera (0.05 M, pH = 7.6). Nakon toga, uzorke sam centrifugirala 5 min pri 2000 x g i 4 °C.

Treći način homogenizacije tkiva uključivao je metodu homogeniziranja tkiva (15mg) laganim pokretima na homogenizatoru s keramičkim tučkom (20 ciklusa potisaka pri brzini 1200 rpm) u 20 volumena pufera za izolaciju membranskih proteina (*Cloud-clone Corp.*) s dodatkom inhibitora proteaza (*HaltTM Protease Inhibitor Cocktail* (100X)). Nakon toga sam homogenat prebacila u novu plastičnu epruvetu i sonicirala titanovom mikrosondom (3 ciklusa od 10 s uz frekvenciju 20 KHz i amplitudu 8 µm), te centrifugirala 10 min pri 10000 x g i 4°C kako bi se istaložili nehomogenizirani ostatci tkiva. Svi postupci su rađeni na ledu kako bi se onemogućila aktivnost proteaza.

Svi uzorci su alikvotirani u nove plastične epruvete u manjim volumenima te pohranjeni pri -80°C do daljnje analize.

3.3.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Za određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom BCA (eng. *bicinchoninic acid*) koristila sam komercijalno dostupni komplet (*PierceTm BCA Protein Assay Kit*) pri čemu sam slijedila upute proizvođača. Ukratko, na mikrotitarsku prozirnu pločica s 96 jažica ispipetirala sam 20 µL miliQ vode (negativna kontrola) te po 20 µL svakog od standarada (BSA, albumin iz goveđeg seruma, eng. *bovine serum albumin*) različitih koncentracija (1500, 1000, 750, 500,

375, 250, 125, 62.5 ng/µl) koje sam prethodno pripremila i pohranila pri -20°C. Uzorke (20 µL po jažici) sam pipetirala u duplikatu u dva razrijeđenja – 1:10 (2 µL uzorka + 18 µL miliQ vode) i 1:5 (4 µL uzorka + 16 µL miliQ vode). U svaku jažicu dodala sam po 200 µL smjese radne otopine A i B (u omjeru 50:1) iz kompleta. Mikropločicu sam lagano protresla, zatvorila plastičnim poklopcem te ju prekrila aluminijskom folijom i inkubirala 30 minuta pri 37°C u inkubatoru *Memmert* 100-800. Nakon toga sam dopustila da se pločica ohladi na sobnu temperaturu nekoliko minuta te sam izmjerila apsorbanciju na čitaču apsorbancije za mikrotitarske pločice *Labsystem Multiskan MS,* pri valnoj duljini od 570 nm. Na temelju apsorbancije standarada i negativne kontrole izradila sam baždarenu krivulju pomoću koje sam izračunala koncentraciju proteina u uzorcima, pazeći na 5× i 10× faktor razrijeđenja uzoraka.

3.3.3. SDS-PAGE i western blot

Razinu monoamin oksidaze A i aktina beta (ACTB, eng. *Actin Beta*) određivala sam kvantitativnom *western blot* metodom. Metoda se temelji na 3 osnovna koraka: razdvajanje proteina prema veličini pomoću SDS-PAGE, prijenos razdvojenih proteina na čvrstu podlogu i označavanje ciljnog proteina korištenjem odgovarajućeg primarnog i sekundarnog protutijela za vizualizaciju.

3.3.3.1. Priprema uzoraka za SDS-PAGE

Kako bih odredila količinu ukupnih proteina koju ću koristiti u daljnjim pokusima napravila sam preliminarni titracijski pokus na uzorcima homogenata ljudske posteljice u kalij fosfatnom puferu. Uzorke sam pripremala tako što sam u plastične epruvete dodala izračunati volumen koji sadrži 2.5 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg i 40 µg proteina te volumen pufera za denaturaciju proteina (4x koncentriran; vidi poglavlje 3.2.3) tako da na ukupni volumen smjese od 10 µL dolazi 2,5 µL (¼) pufera za denaturaciju. Po potrebi sam u svaki uzorak dodala *miliQ* H_2O do konačnog volumena od 10µL po uzorku. Kako bi pospješila proces denaturacije proteina, uzorke sam inkubirala u termobloku 10 min pri 95°C, nakon čega su kratko centrifugirani. Tako pripremljene uzorke sam odmah potom nanosila na gel.

Na temelju rezultata preliminarnih titracijskih pokusa, određeno je da će ukupna količina proteina koju ću nanositi na gel iznositi 10µg. Uzorci proteina željene koncentracije su denaturirani dodatkom 4x koncentriranog pufera za denaturaciju uz dodatak miliQ H_2O do konačnog volumena od 10µL po uzorku. Denaturaciju uzoraka sam pospješila na iznad opisani način te sam ih odmah potom nanosila na gel.

3.3.3.2. Priprema gelova za SDS-PAGE

Poliakrilamidni gel u prisutnosti anionskog deterdženta natrijevog dodecilsulfata (engl. *sodium dodecylsulphate*, SDS) kao denaturirajućeg agensa pripremila sam prema receptu iz Tablice 2. Prije izlijevanja gela, cijelu aparaturu prethodno sam očistila destiliranom H_2O, 70%-tnim alkoholom i osušila. Zatim sam sastavila kalup za pripremu gela koji se sastoji od dviju staklenih ploča međusobno odvojenih odstojnikom od 1μm. Nakon toga sam stakla stavila na nosač s gumom te učvrstila pomoću kvačica sa strane kalupa (Slika 6.). Prvo sam pripremila 10%-tni gel za razdvajanje (donji gel) na način da sam u Falkon epruvetu redom dodavala: dH_2O, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 30 % AAS, 10% SDS, te, brzo jedan iza drugoga, TEMED i 10% APS. Smjesu sam brzo dobro promiješala te odmah nanijela između stakala. Zatim sam donji gel nadslojila dH_2O kako bih izravnala gel i spriječila kontakt gela s kisikom koji bi mogao spriječiti polimerizaciju poliakrilamida i ostavila da gel polimerizira oko 45 min pri sobnoj temperaturi. Nakon njegove polimerizacije sam uklonila svu dH_2O, te sam pripremila smjesu za 5%-tni gel za sabijanje (gornji gel), nanijela na donji gel i umetnula češljić za formiranje 15 jažica, te ostavila oko 30 min pri sobnoj temperaturi da polimerizira. Gornji gel nam služi za sabijanje uzoraka u tanku frontu koja ulazi u gel za razdvajanje. Nakon polimerizacije gela za sabijanje pažljivo sam odstranila češljić te sam jažice pažljivo isprala destiliranom vodom kako bih uklonila ostatke akrilamida. Nakon toga, gel sam odmah koristila za elektroforezu.

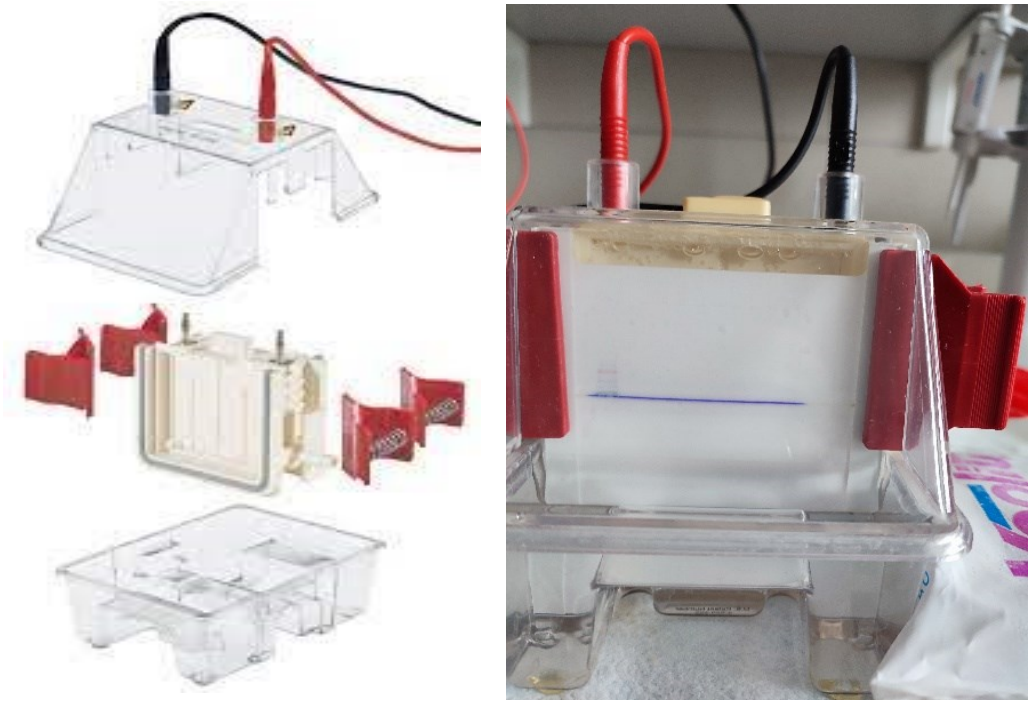
Slika 6. Prikaz sustava za pripremu poliakrilamidnih gelova

Tablica 2. Priprema poliakrilamidnog gel za SDS-PAGE

OTOPINA/PUFER	VOLUMENI	
	GEL ZA SABIJANJE (5%) – gornji gel	**GEL ZA RAZDVAJANJE (10%) – donji gel**
dH_2O (mL)	3,40	4,00
30% AAS (mL)	0,83	3,30
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (mL)		2,50
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8 (mL)	0,63	
10% SDS (mL)	0,05	0,100
10% APS (mL)	0,05	0,100
TEMED (mL)	0,005	0,004

3.3.3.3. SDS-PAGE

Stakla s pripremljenim gelom izvukla sam iz nosača i stavila u Hoefer SE 260 aparaturu tako da je manje staklo bilo okrenuto prema unutrašnjosti aparature za elektroforezu (Slika 7.). Aparaturu sam zatim napunila 1× puferom za elektroforezu (RB, eng. *running buffer*), pripremljenim miješanjem 50 mL 10× Tris-glicinskog pufera i 450 mL dH_2O. U prvu jažicu gela dodala sam standard s proteinima poznatih molekulskih masa (*Prestained Protein Ladder - Mid-range molecular weight (10 - 180 kDa)*, a u preostale jažice uzorke izoliranih proteina ljudske posteljice u ukupnom volumenu od 10 µL. Prvo sam elektroforezu provela 10 min pri 90V kako bi dopustila da se uzorci sabiju u jednu frontu i prijeđu u gel za razdvajanje, a nakon toga sam elektroforezu postavila na 150V 2 h pri 4°C. Kako bih odredila količinu proteina MAOA i aktina beta, svaki uzorak sam nanosila na dva odvojena gela u istom pokusu (tehnički replikati).

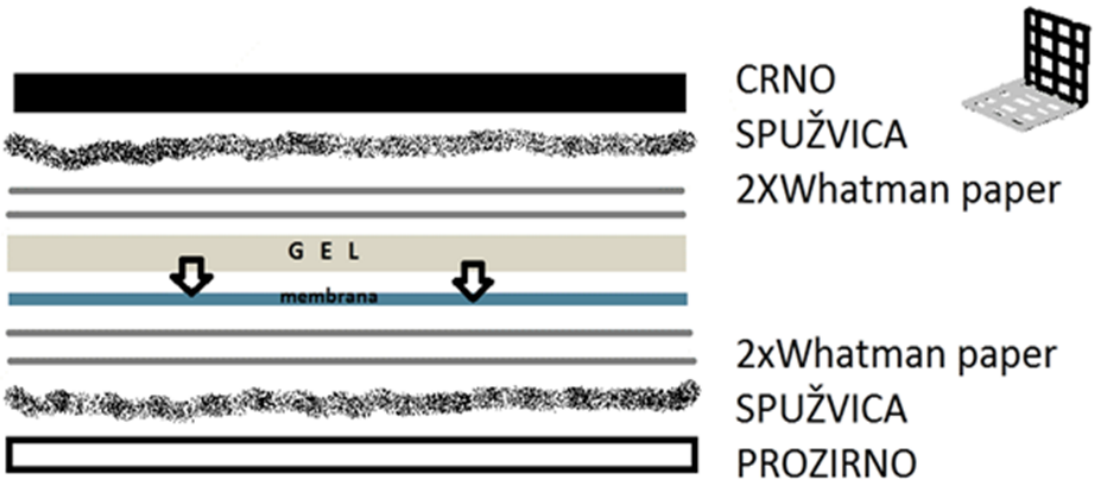


Slika 7. Prikaz sustava za elektroforezu

3.3.3.4. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu i njihovo specifično obilježavanje

Nakon završene elektroforeze, proteini se iz gela prenose na nitroceluloznu membranu metodom *western blot*. Pufer za prijenos proteina na membranu (1×TB, eng. *transfer buffer*) prethodno je pripremljen iz 10×TB (100 mL 10×TB + 700mL dH_2O + 200mL metanola). Nitrocelulozna membrana i filter papir izrezani su prema dimenzijama gela te uronjeni zajedno sa spužvicama u 1xTB kako bi se hidrirali. Po završetku elektroforeze, stakla s gelom sam izvadila iz aparature za SDS-PAGE te sam gornji gel odstranila, a donji gel pažljivo prebacila u posudu s puferom za prijenos proteina. Kazetu za prijenos sam slagala u posudi s puferom za prijenos kako bih spriječila da zrak uđe između slojeva. Kazeta se slaže tako da se redom, na stranicu koja će biti okrenuta prema negativnoj elektrodi stavi spužvica koju sam dobro namočila puferom i iz koje sam istisnula zrak, na spužvicu 2 navlažena filter papira, gel, nitrocelulozna membrana, 2 navlažena filter papira, spužva te se naposljetku zatvori plastični okvir koji će biti okrenut prema pozitivnoj elektrodi (Slika 8.). Između svakog sloja sam pažljivo staklenim štapićem prelazila preko površine kako bih istisnula sav zrak. Aparaturu za prijenos proteina (Hoefer TE 22) napunila sam do oznake puferom za prijenos, stavila dvije kazete koje sam složila

prema gore opisanoj proceduri, između njih stavila hladni blok te po potrebi dodala pufera do oznake MAX. Prijenos proteina na membranu proveden je pri 90V i 4°C tijekom 90 min.



Slika 8. Shematski prikaz načina slaganja kazete za prijenos proteina s gela na membranu

Po završetku prijenosa, membrane sam isprala u puferu TBS-T kako bih odstranila metanol te sam ih bojala u otopini naftol plavo do vizualizacije vrpci proteina iz proteinskog standarda. Zatim sam nitrocelulozu membranu u potpunosti odbojala ispiranjem 10 min sa otopinom za odbojavanje, a položaj proteina iz proteinskog standarda sam prethodno označila kemijskom olovkom, jer ove vrpce nakon odbojavanja više neće biti vidljive na membrani. Membrane sam zatim isprala 3 puta u puferu TBS-T po 10 minuta na tresilici nakon čega su bile spremne za blokiranje.

Prije samog blokiranja, u Falkon epruveti od 50 mL sam pripremila otopinu za blokiranje (5%) tako da sam odvagala 2g mlijeka u prahu i dodala 50mL TBS-T pufera. Kako bih izbjegla inkubiranje membrane s više protutijela, membrane sam prije samog blokiranja izrezala na signalu od 50kDa. Membrane su blokirane na tresilici 30 minuta pri sobnoj temperaturi.

Nakon inkubacije u otopini za blokiranje, membrane sam uronila u otopine primarnog protutijela (za MAOA i ACTB, i ostavila preko noći pri 4 °C. Gornji dio membrane inkubirala sam s primarnim protutijelom za MAOA, dok sam donji dio membrane inkubirala s primarnim protutijelom za ACTB. Otopine primarnog protutijela u razrjeđenju 1:400 pripremila sam u 5 %-tnoj otopini mlijeka u TBST puferu. Membrane sam nakon inkubacije u otopini primarnog protutijela isprala tri puta po 10 min s TBS-T puferom na tresilici. Nakon što su membrane bile isprane od primarnog protutijela, uronila sam ih u otopinu sekundarnog protutijela (*Amersham*

ECL HRP) u razrjeđenju 1:5000 u TBS-T puferu s 5 %-tnim mlijekom te ih inkubirala jedan sat pri sobnoj temperaturi, nakon čega sam membranu isprala po istom protokolu kao i sa primarnim protutijelom.

Nakon ispiranja, na membrane sam nanijela kemiluminiscencijski reagens koji se priprema na način da se otopine A i B pomiješaju u omjeru 1:1. Za detekciju MAOA koristila sam reagens *Clarity Western ECL Substrate*, dok sam za ACTB koristila *Clarity Max Western ECL Substrate*. Nakon inkubacije (1 min), membrane sam stavila između dvije prozirne folije te sam pažljivo istisnula zrak. Membrana je zatim snimljena na uređaju *Alliance Q9 Mini*.

3.4. Obrada podataka

Integriranu optičku gustoću (IOG) dobivenih signala odredila sam pomoću računalnog programa *Image Lab*, verzija 6.1.0 build 7, dok sam rezultate statistički analizirala pomoću programa *GraphPad Prism*, verzija 8.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, SAD). ACTB sam koristila kao kontrolu nanošenja uzoraka i za normalizaciju jer je visoko konzervirani protein u eukariotskim stanicama. Pravilnost distribucije vrijednosti kontinuiranih varijabli odredila sam *D´Agostino i Pearson omnibus testom*. Vrijednosti koje imaju pravilnu distribuciju analizirala sam parametrijskim (*Studentov t-test*, jednosmjerna ANOVA), a one koji nemaju pravilnu distribuciju neparametrijskim (*Mann-Whitney, Kruskal-Wallis*) testovima. Ukoliko je razlika među skupinama dosegla statističku značajnost, testovi su bili popraćeni odgovarajućim *post hoc* testovima. Prisutnost vrijednosti koja je značajno odskakala od distribucije ostalih vrijednosti unutar grupe (eng. *outlier*) detektirala sam pomoću Grubb´s testa uz granicu značajnosti $p<0,05$ i tu sam vrijednost isključila iz daljnje statističke obrade. Vrijednosti $p<0,05$ smatrane su statistički značajnim, dok su vrijednosti $p<0,1$ smatrane trendom.

4. Rezultati

4.1. Podaci o sudionicima istraživanja

Demografske i kliničke karakteristike sudionica i novorođenčadi uključenih u ovo istraživanje prikazane su u Tablici 3.

Tablica 3. Demografski i klinički podaci o sudionicama istraživanja s obzirom na spol novorođenčadi.

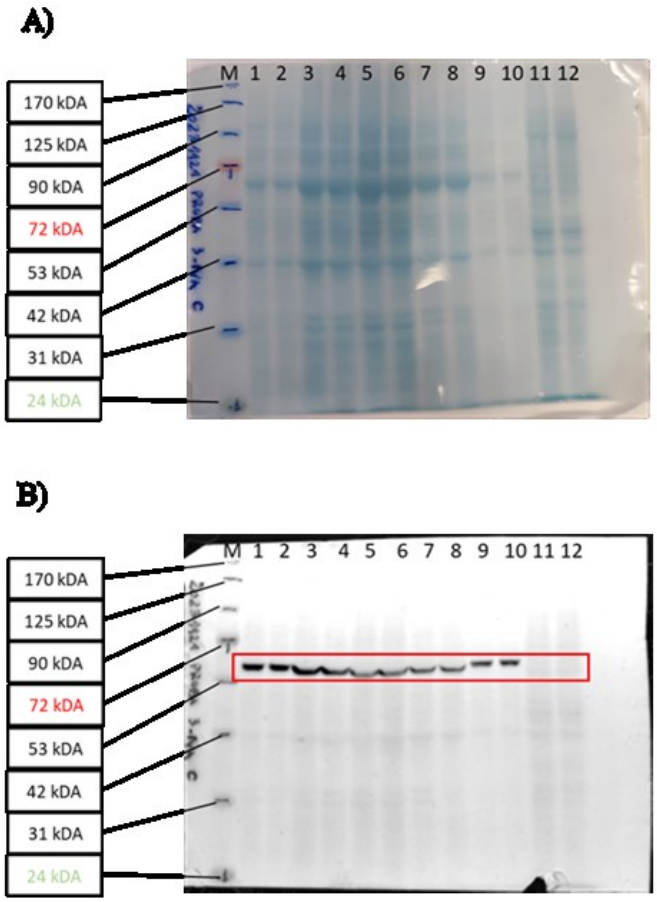
Karakteristika	Ženska novorođenčad (n=48)	Muška novorođenčad (n=50)
Starosna dob majke pri porodu, godine	33,8 (24,3 – 44,8)	33,6 (22,9 – 43,0)
Gestacijska dob pri porodu, tjedni	39,2 (37,7 – 41,6)	39,2 (37,6 – 41,0)
ITM prije trudnoće, kg/m^2	26,6 (18,6 – 43,3)	27,5 (19,4 – 51,7)
Status tjelesne mase:		
normalna tjelesna masa, n (%)	24 (50%)	22 (44%)
debljina, n (%)	24 (50%)	28 (56%)
Status tolerancije glukoze:		
NGT, n (%)	23 (48%)	24 (48%)
GDM, n (%)	25 (52%)	26 (52%)

Za kontinuirane varijable prikazane su srednja vrijednost i raspon (minimalna - maksimalna vrijednost). Za kategorijske varijable prikazani su podaci o broju sudionica (n) i postotku (%). Kategorija „debljina" podrazumijeva prekomjernu tjelesnu masu i pretilost. NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus, ITM – indeks tjelesne mase.

U istraživanju je sudjelovao podjednaki broj sudionica s muškom i ženskom novorođenčadi. Zbog mogućeg utjecaja spola djeteta na odnos između majčinog metaboličkog statusa i razine proteina MAOA u posteljici, analize su provedene zasebno u uzorcima posteljica iz trudnoća s muškom i trudnoća sa ženskom novorođenčadi.

4.2. Optimizacija metode za kvantitativno određivanje razine proteina MAOA u ljudskoj posteljici

Prvi dio istraživanja bio je usmjeren na optimizaciju metode za izolaciju ukupnih proteina iz tkiva posteljice čovjeka. Parametri koji su varirani detaljno su opisani u poglavlju 3.3.1. Prinos i kvalitetu ukupnih proteina provjerila sam mjerenjem koncentracije metodom BCA (vidi poglavlje 3.3.2.), a intenzitet i specifičnost signala za proteine MAOA i ACTB provjerila sam izvođenjem SDS-PAGE i *western blot* analize (vidi poglavlje 3.3.3.). Kao negativnu kontrolu koristila sam lizat stanica MDA-MB-231t za koje se zna iz literature da nemaju protein MAOA (Bahrti i sur., 2018).

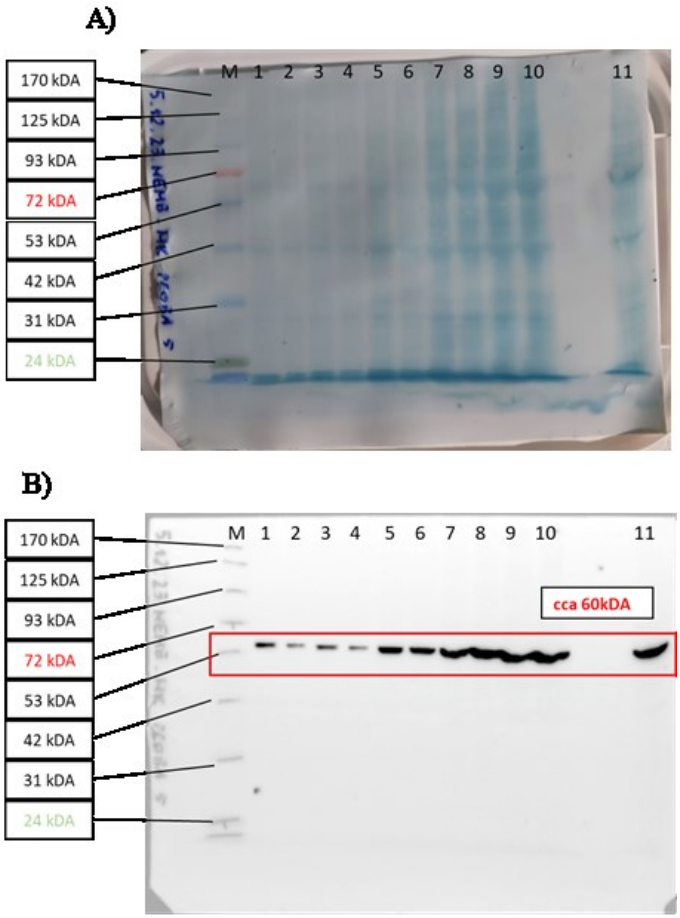


Slika 9. Optimizacija izolacije ukupnih proteina iz tkiva posteljice čovjeka. Prikazani su **(A)** ukupni proteini vizualizirani bojanjem membrane s naftol plavim i (**B**) protein MAOA, vizualiziran imunodetekcijom i kemiluminiscencijom **.** Jažica 1 - 6 – uzorci posteljice u RIPA puferu; jažice 7 i 8 – uzorak posteljice u kalij-fosfatnom puferu; jažice 9 i 10 – uzorak posteljice u *Cloud-clone* puferu; jažice 11 i 12 – uzorak staničnog lizata u DMEM mediju. Količine ukupnih proteina nanešenih na gel iznosile su 5 µg (jažice 1, 2, 9 i 10) i 20 µg (jažice 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11 i 12). M – standard s proteinima poznatih molekulskih masa (10 – 180 kDa). Crvena boja na M – standardu s proteinima poznatih molekulskih masa označava oznaku veličine proteina od 72 kDa dok zelena boja označava oznaku veličine proteina od 24 kDa. Crvenim pravokutnikom označeni su dobiveni proteini MAOA te negativna kontrola.

Nakon provedene metode *western blot*, vidljiva je prisutnost vrpce specifične za protein MAOA u svim uzorcima homogenata tkiva posteljice, ali ne i u lizatu stanica MDA-MB-231t koji je služio kao negativna kontrola (Slika 9.). S obzirom na dobiveni rezultat, odlučeno je da ću u daljnjim analizama koristiti homogenate tkiva ljudske posteljice pripremljene u kalij fosfatnom puferu, u sklopu prethodnih eksperimenata provedenih u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju (Perić 2024.), kako bi se uštedjela i očuvala ograničena količina pohranjenih uzoraka tkiva posteljice. Ova metoda uključivala je homogenizaciju 50 mg tkiva

titanovom mikrosondom u 20 volumena hladnog kalij fosfatnog pufera (volumen u µl = mg tkiva × 20).

U slijedećem koraku odredila sam optimalnu masu ukupnih proteina za nanošenje na gel (Slika 10.). U ovim pokusima koristila sam uzorke tkiva ljudske posteljice dobivene homogenizacijom u kalij fosfatnom puferu (vidi poglavlje 3.3.1.), nakon čega sam izvela SDS-PAGE i *western blot* (vidi poglavlje 3.3.3.). U rasponu od 2,5 do 40 mikrograma ukupnih proteina dobila sam mjerljiv signal za protein MAOA, čiji je intenzitet bio proporcionalan masi ukupnih proteina. Odlučeno je da ću za daljnje analize koristiti masu proteina od 10 µg, koja se nalazi u središnjem dijelu raspona te daje vrpce proteina MAOA pravilnog oblika te zadovoljavajućeg intenziteta i reproducibilnosti. Pri manjim masama ukupnih proteina intenzitet vrpci nije bio podjednak između dvaju tehničkih replikata, dok je veća masa ukupnih proteina davala signal prevelikog intenziteta.



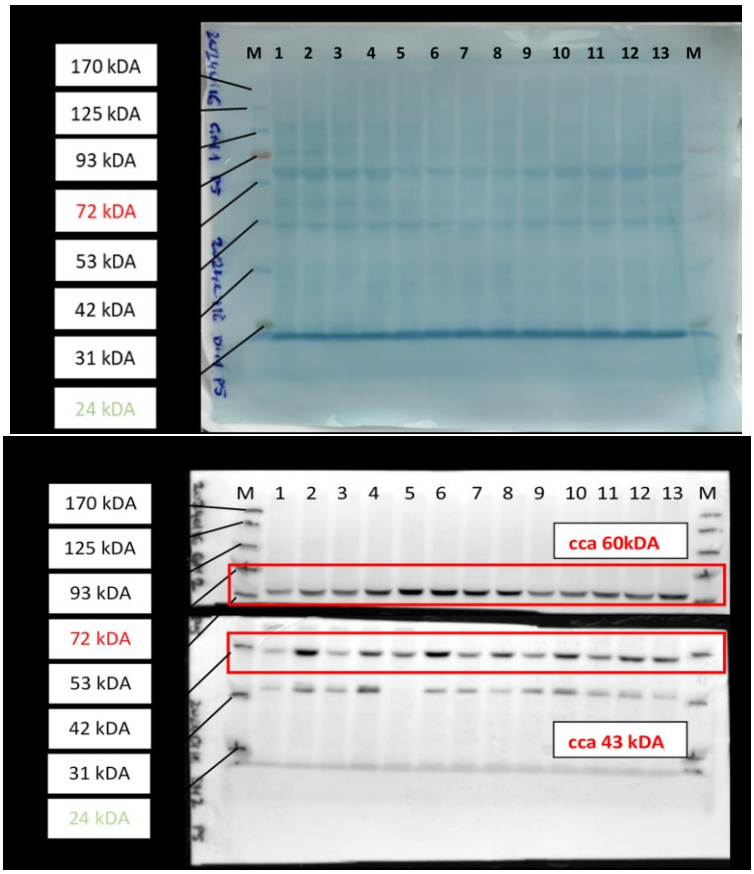
Slika 10. Titracijski pokus na probnim uzorcima dobivenim homogenizacijom tkiva posteljice u kalij fosfatnom puferu. Prikazana je ista membrana **(A)** ukupnih proteina vizualizirana bojanjem s naftol plavo i **(B)** protein MAOA, vizualiziran imunodetekcijom i kemiluminiscencijom. Mase ukupnih proteina nanešenih na gel iznosile su 2,5 µg (jažice 1 i 2), 5,0 µg (jažice 3 i 4), 10,0 µg (jažice 5 i 6), 20 µg (jažice 7 i 8) i 40 µg (jažice 9 i 10) mikrograma. M – standard s proteinima poznatih molekulskih masa (10 – 180 kDa). Crvena boja M – standarda s proteinima poznatih molekulskih masa označava oznaku veličine proteina od 72 kDa dok zelena boja označava oznaku veličine proteina od 24 kDa. Crvenim pravokutnikom označen je dobiveni protein MAOA koji se nalazi na oznaci veličine približno 60 kDa.

4.3. Usporedba razine proteina MAOA u ljudskoj posteljici između sudionica s različitim metaboličkim statusom

U svrhu analize povezanost majčinog metaboličkog stanja i razine proteina MAOA u posteljici, sudionice su podijeljene u četiri metaboličke skupine: (1) sudionice s normalnom tjelesnom masom prije trudnoće (BMI < 25) i normalnom tolerancijom glukoze u trudnoći (**NW-NGT**); (2) sudionice s normalnom tjelesnom masom prije trudnoće i GDM-om (**NW-**

GDM); (3) sudionice s prekomjernom tjelesnom masom ili pretilošću prije trudnoće (BMI ≥ 25) i normalnom tolerancijom glukoze u trudnoći (**OWO-NGT**); te (4) sudionice s prekomjernom tjelesnom masom ili pretilošću prije trudnoće i GDM-om (**OWO-GDM**). U istraživanju je sudjelovao podjednaki broj sudionica iz svake metaboličke skupine. Kao što je već navedeno, analize razina proteina MAOA kod muške i ženske novorođenčadi provedene su u zasebnim pokusima. Zbog ograničenog broja uzoraka na pojedinom gelu, za svaki spol provedena su ukupno četiri pokusa, pazeći da je u svakom pokusu bio zastupljen podjednak broj sudionica iz svih četiriju metaboličkih skupina. Unutar jednog pokusa, svi uzorci ponavljani su na dva gela, pri čemu su dobiveni slični rezultati.

Reprezentativni primjer membrane iz ove serije pokusa prikazan je na Slici 11. Korištenjem standarda s proteinima poznatih molekulskih masa, vidljivo je da se vrpca za protein MAOA nalazi na približno 60 kDa, a za referentni protein ACTB na približno 43 kDa, što je bilo prema očekivanju. Rezultati analize *western blot* su denzitometrirani i integrirana optička gustoća (IOG) pojedinog uzorka podijeljena je sa srednjom vrijednosti IOG svih uzoraka na pojedinom gelu, a potom su vrijednosti za protein MAOA podijeljene vrijednostima za protein ACTB, kako bi se dobile razine proteina MAOA normirane s obzirom na referentni protein ACTB.



Slika 11. Primjer *Western blot* analize (proteina MAOA i ACTB u uzorcima posteljice sudionica s različitim metaboličkim statusom. Prikazani su **(A)** ukupni proteini vizualizirani bojanjem membrane s naftol plavo te (**B**) proteini MAOA (gornji panel) i ACTB (donji panel), vizualiziran imunodetekcijom i kemiluminiscencijom. Jažica 1 – referentni uzorak; jažice 2, 3 i 4 – sudionice iz skupine NW-NGT; jažice 5, 6 i 7 – sudionice iz skupine OWO-NGT; jažice 8, 9 i 10 – sudionice it skupine NW-GDM; jažice 11, 12 i 13 – sudionice iz skupine OWO-GDM. M – proteinski marker (10 – 180 kDa). NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus, NW – normalna tjelesna masa, OWO – prekomjerna tjelesna masa ili pretilost prije trudnoće. Crvena boja M – standarda s proteinima poznatih molekulskih masa označava veličinu proteina od 72 kDa dok zelena boja označava veličinu proteina od 24 kDa. Crvenim pravokutnikom na veličini približno 60 kDA označen je dobiveni protein MAOA dok crveni pravokutnik na veličini od približno 43 kDa označen je dobiveni protein ACTB.

4.3.1. Muška novorođenčad

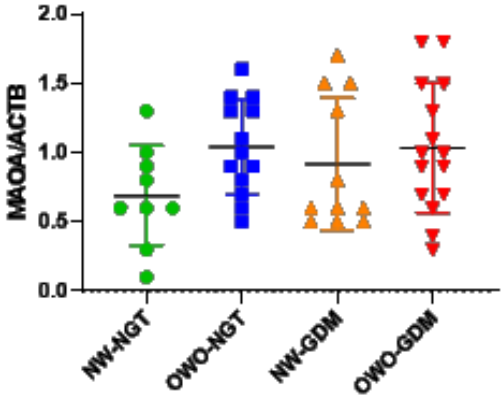
Rezultati denzitrometrijske analize u uzorcima posteljica iz trudnoća s muškom novorođenčadi prikazani su u Tablici 4. i na Slici 12. Vrijednosti razine proteina MAOA u skupinama NW-NGT, OWO-NGT, OWO-GDM imale su normalnu raspodjelu dok skupina NW-GDM nije imala normalnu raspodjelu zbog čega sam koristila Kruskal-Wallis test . Kod muške novorođenčadi, nije bilo statistički značajne razlike u razini proteina MAOA između različitih metaboličkih skupina sudionica (KW =4,52; p=0,211; Kruskal-Wallis test), iako su prosječne

vrijednosti bile nešto više u skupinama sudionica s promijenjenim metaboličkim stanjem u odnosu na skupinu sudionica s normalnom tjelesnom masom i normalnom tolerancijom glukoze (Slika 12.). Budući da smo primijetili da je prosječna vrijednost razine proteina MAOA bila viša u skupini OWO-NGT u odnosu na NW-NGT, dodatno smo usporedili ove dvije skupine pomoću parametrijskog t-testa, koji je pokazao statistički značajnu razliku između navedenih skupina (*p=0.034, t-test), što bi moglo indicirati da kod sudionica s normalnom tolerancijom glukoze postoji potencijalna povezanost majčine prekomjerne mase / pretilosti s povišenom razinom proteina MAOA u posteljici.

Tablica 4. Razine proteina MAOA u ljudskoj posteljici sudionica iz različitih metaboličkih skupina (muška novorođenčad).

	Majčin metabolički status			
	NW-NGT (n)	OWO-NGT (n)	NW-GDM (n)	OWO-GDM (n)
Muška novorođenčad	0,70 ± 0,36 (9)	1,06 ± 0,34 (13)	0,93 ± 0,49 (11)	1,03 ± 0,46 (15)

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; u zagradama je prikazan broj sudionica (n). NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus, NW – normalna tjelesna masa, OWO – prekomjerna tjelesna masa ili pretilost.



Slika 12. Razina proteina MAOA u uzorcima posteljice muške novorođenčadi u ovisnosti o majčinom metaboličkom stanju. Razina proteina MAOA izražena je u odnosu na razinu referentnog proteina aktin beta. Prikazane su pojedinačne vrijednosti te srednja vrijednost ± standardna devijacija. NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus, NW – normalna tjelesna masa, OWO – prekomjerna tjelesna masa ili pretilost prije trudnoće.

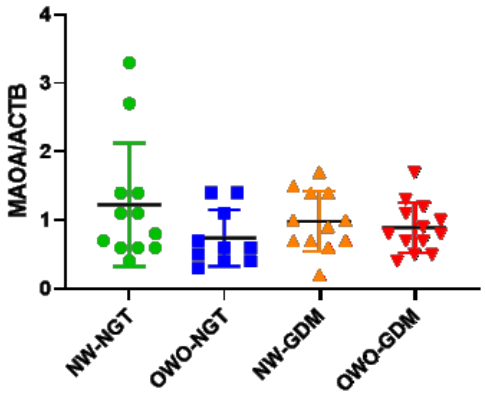
4.3.2. Ženska novorođenčad

Rezultati denzitrometrijske analize razine proteina MAOA u uzorcima posteljica iz trudnoća s ženskom novorođenčadi prikazani su u Tablici 5. i na Slici 13. Vrijednosti razine proteina MAOA u skupinama OWO-NGT, NW-GDM i OWO-GDM imale su normalnu raspodjelu dok je u skupini NW-NGT došlo do odstupanja od normalne raspodijele. Iako nije uočena statistički značajna razlika u razini proteina MAOA u posteljici između ispitivanih metaboličkih skupina sudionica (KW =3,32; p=0,344; Kruskal-Wallis test), prosječne vrijednosti bile su nešto niže u skupinama sudionica s promijenjenim metaboličkim stanjem u odnosu na skupinu sudionica s normalnom tjelesnom masom i normalnom tolerancijom glukoze (Slika 13). Usporedbom skupina NW-NGT i OWO-NGT kod ženske novorođenčadi nije uočena statistički značajna razlika (p=0,126, Mann-Whitney test).

Tablica 5. Razine proteina MAOA u ljudskoj posteljici sudionica iz različitih metaboličkih skupina (ženska novorođenčad).

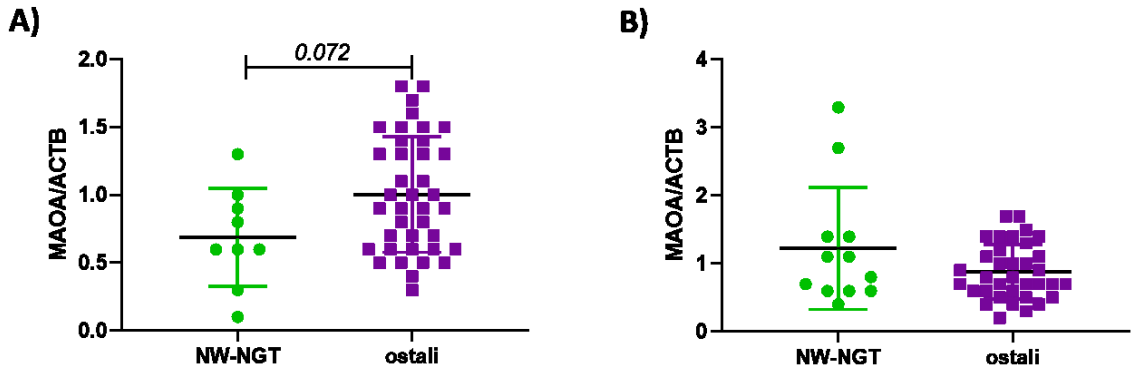
	Majčin metabolički status			
	NW-NGT (n)	OWO-NGT (n)	NW-GDM (n)	OWO-GDM (n)
Ženska novorođenčad	1,21 ± 0,90 (12)	0,75 ± 0,41 (10)	0,97 ± 0,45 (12)	0,88 ± 0,36 (13)

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; u zagradama je prikazan broj sudionica (n). NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus, NW – normalna tjelesna masa, OWO – prekomjerna tjelesna masa ili pretilost.



Slika 13. Razina proteina MAOA u uzorcima posteljice ženske novorođenčadi u ovisnosti o majčinom metaboličkom stanju. Razina proteina MAOA izražena je u odnosu na razinu referentnog proteina aktin beta. Prikazane su pojedinačne vrijednosti te srednja vrijednost ± standardna devijacija. NGT – normalna tolerancija glukoze, GDM – gestacijski dijabetes melitus, NW – normalna tjelesna masa, OWO – prekomjerna tjelesna masa ili pretilost prije trudnoće.

Iako nije uočena statistički značajna razlika u razini MAOA između pojedinih metaboličkih skupina sudionica, može se uočiti da su i kod muške (Slika 12) i kod ženske (Slika 13) novorođenčadi, prosječne vrijednosti u skupinama sudionica s promijenjenim metaboličkim stanjem (prekomjernom tjelesnom masom i/ili GDM-om) bile nešto drugačije nego u skupini sudionica s normalnom tjelesnom masom i normalnom tolerancijom glukoze. Zbog toga sam dodatno usporedila razinu proteina MAOA u posteljici između sudionica s normalnom tjelesnom masom i normalnom tolerancijom glukoze (skupina NW-NGT) te sudionica iz svih preostalih skupina zajedno. Kod muške novorođenčadi (Slika 14.A), razine proteina MAOA (srednja vrijednost ± standardna devijacija) imale su trend ($p = 0,072$; Mann Whitney test) prema višim vrijednostima u skupini sudionica s promijenjenim metaboličkim stanjem (1,00 ± 0,43; n=39) u odnosu na skupinu NW-NGT (0,70 ± 0,36; n=9). Kod ženske novorođenčadi (Slika 14.B), nije bilo statistički značajne razlike ($p = 0,413$; Mann Whitney test) između skupine sudionica s promijenjenim metaboličkim stanjem (0,88 ± 0,41; n=35) i skupine NW-NGT (1,2 ± 0,9; n=12).



Slika 14. Razina proteina MAOA u uzorcima posteljice A) muške i B) ženske novorođenčadi u ovisnosti o majčinom metaboličkom statusu. Razina proteina MAOA izražena je u odnosu na razinu referentnog proteina aktin beta. Prikazane su pojedinačne vrijednosti te srednja vrijednost ± standardna devijacija. NGT – normalna tolerancija glukoze, NW – normalna tjelesna masa, ostali – sudionice s prekomjernom tjelesnom masom / pretilosti i/ili gestacijskim dijabetesom mellitusom.

5. Rasprava

Predmet ovog istraživanja je enzim monoamin oksidaza A koji je ključan u razgradnom putu hormona i neurotransmitera serotonina. Tijekom trudnoće, serotonin je jedan od važnih čimbenika koji sudjeluje u održavanju homeostaze organizma majke te regulaciji rasta i razvoja fetusa. Kroz trudnoću, serotonin također regulira razvoj i funkcije posteljice. Dosadašnja istraživanja pokazala su da je majčino promijenjeno metaboličko stanje u trudnoći povezano s promijenjenom razinom određenih regulatornih proteina serotonina u posteljici. Specifično, Viau i sur. (2009) su pokazali da su razine serotoninskog prijenosnika i serotoninskog receptora tipa 2A (HTR2A) značajno snižene u posteljicama sudionica s GDM-om u odnosu na sudionice s normalnom tolerancijom glukoze. Međutim, do sad ne postoje podaci o povezanosti GDM ili debljine s razinom proteina MAOA u posteljici.

U ovom istraživanju uhodana je metoda *western blot* za određivanje razine proteina MAOA u uzorcima ljudske posteljice te je, po prvi put, istražena povezanost majčinog metaboličkog stanja i razine proteina MAOA u posteljici. Obuhvaćeno je 98 sudionica koje su imale različito metaboličko stanje – normalnu tjelesnu masu i normalnu toleranciju glukoze, normalnu tjelesnu masu i GDM, debljinu i normalnu toleranciju glukoze ili debljinu i GDM. Zbog mogućeg utjecaja spola na povezanost majčinog metaboličkog stanja i razine proteina MAOA u posteljici, analize su provedene zasebno na sudionicama sa ženskom i muškom novorođenčadi.

U skladu s drugim istraživanjima (Auda i sur., 1998; Sivasubramaniam i sur., 2002; Karahoda i sur., 2020a; Karahoda i sur., 2020b,) naši rezultati su potvrdili visoku zastupljenost proteina MAOA u posteljici čovjeka na kraju trudnoće. Osim u posteljici, enzim MAOA prisutan je i u nekim drugim perifernim tkivima. Primjerice, Sivasubramaniam i sur. (2003) utvrdili su prisutnost proteina MAOA i u organima poput duodenuma, bubrega, jetri i plućima te u manjim količinama u srcu, koristeći se metodom imunohistokemije za detekciju proteina. Razina proteina MAOA značajno varira među različitim tkivima (Sivasubramaniam i sur. 2003), a visoka zastupljenost u tkivu posteljice ukazuje na njegovu važnu ulogu u ovome organu.

Iako debljina i GDM imaju različite nepogodne utjecaje na samu trudnoću i plod kao što je prethodno navedeno, prema rezultatima ovog istraživanja GDM i debljina nemaju utjecaj na ekspresiju proteina MAOA u posteljici ispitivanih sudionica s različitim metaboličkim statusom (NGT-NW, NGT-GDM, OWO-NW, OWO-GDM). Razina proteina MAOA među skupinama varira, kako kod muške tako i kod ženske novorođenčadi, ali razlika među skupinama nije dostigla statističku značajnost. Rezultat ovog istraživanja razlikuje se od istraživanja koje je utvrdilo da postoji povezanost majčinog stresa u trudnoći s ekspresijom proteina MAOA u posteljici. Prema Pehme i sur. (2018) prenatalni stres smanjuje ekspresiju proteina MAOA u posteljici te također utječe na temperament djeteta.

Iako poveznica GDM-a i/ili debljine s promjenom ekspresije proteina MAOA nije utvrđena u našem istraživanju, primijećeno je da kod muške novorođenčadi postoji trend ($p=0,072$) porasta razine proteina MAOA u posteljici novorođenčadi majki s promijenjenim metaboličkim stanjem u odnosu na skupinu NW-NGT. Ovaj indikativni nalaz bilo bi vrijedno dodatno istražiti na većem broju sudionica jer u ovom istraživanju obuhvaćen je relativno mali broj sudionica u skupini NW-NGT ($n=9$). S druge strane, kod ženske novorođenčadi nije postojao ovakav trend. Uzrok ovog nalaza mogao bi ležati u spolnim razlikama jer kod ljudi postoje razlike među spolovima u koncentraciji serotonina, ali i njegovih metabolita te brzini njegove razgradnje, s obzirom da se gen za MAOA nalazi na kromosomu X(Grimsby i sur., 1991). Osim toga, razlikuju se i gustoća i rasprostranjenost SERT-a u mozgu žena i muškaraca, a navedene razlike javljaju se već u ranim fazama razvoja (Perić i sur., 2022).

Daljnja istraživanja MAOA u posteljici mogla bi obuhvatiti, osim same razine proteina, i polimorfizam gena *MAOA*, koji ima utjecaj na ekspresiju gena. Zhang i sur. (2010) istražili su utjecaj polimofizma pod nazivom *MAOA-uVNTR* (VNTR, od eng. *upstream variable number of tandem repeats*), s različitim brojem ponavljanja u promotorskoj regiji, te su pokazali da taj

polimorfizam utječe na ekspresiju gena *MAOA* u posteljici. Također, osim razine proteina MAOA, bilo bi važno uključiti u istraživanje i aktivnost ovog enzima jer se ona može razlikovati unatoč tome što razina proteina nije promijenjena, što potvrđuje istraživanje Sivasubramaniam i sur. (2002). Istraživana je razina i aktivnost proteina MAOA u posteljicama iz preeklamptičkih i zdravih trudnoća te je utvrđeno da je katalitička aktivnost enzima MAOA značajno smanjena u preeklampsiji, ali razine proteina MAOA nisu bile promijenjene.

Ovo istraživanje ima određene prednosti i ograničenja koja valja spomenuti. Zbog ograničenog broja jažica na gelu, nisam bila u mogućnosti na isti gel nanositi uzorke i muške i ženske novorođenčadi u svrhu razmatranja potencijalnih spolnih razlika. Ovo istraživanje bilo je usmjereno na utvrđivanje postoje li razlike vezane uz metabolički status majke te su zbog toga na istom gelu analizirani uzorci iz svih četiriju metaboličkih skupina sudionica, ali odvojeno po spolovima. S druge strane, prednosti ovog istraživanja odnose se na dobro definirane uzorke posteljica. Sva novorođenčad čije su posteljice analizirane u ovom istraživanju rođena su planiranim carskim rezom, čime se izbjegao potencijalni utjecaj načina porođaja na rezultate. Svi su porođaji bili u punom terminu trudnoće te tako svi uzorci pripadaju ujednačenoj gestacijskoj dobi. Također u istraživanje je uključen podjednak broj muške i ženske novorođenčadi te je u svim ispitivanim skupinama bio sličan broj uzoraka. Svi uzorci rađeni su u duplikatu kako bi rezultati bili precizniji.

6. Zaključak

Metoda *western blot* za kvantitativno određivanje razine proteina MAOA u ljudskoj posteljici uspješno je uhodana te je određena razina proteina MAOA u uzorcima posteljica. Razlike između istraživanih skupina nisu dosegle prag statističke značajnosti, stoga proizlazi da GDM i debljina nisu povezani s promjenom razine proteina MAOA u posteljici. Unatoč tome, kod muške novorođenčadi uočen je trend porasta razine proteina MAOA u skupini sudionica s debljinom i/ili GDM-om, što bi trebalo u budućnosti dodatno istražiti na većem broju sudionica. Dobiveni rezultati pružaju temelj za daljnja istraživanja potencijalne uloge proteina MAOA posteljice u posljedicama majčine pretilosti i GDM-a.

7. Literatura

Armitage J.A., Poston L., Taylor P.D. (2008): Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity. Front Horm Res. 36: 73-84.

Auda G. R., Kirk S. H., Billett M. A., Billett, E. E. (1998): Localization of monoamine oxidase mRNA in human placenta. J Histochem Cytochem, 46(12): 1393-1400.

Aye I.L.M.H., Lager S., Ramirez V.I., Gaccioli F., Dudley D.J., Jansson T., Powell T.L. (2014): Increasing maternal body mass index is associated with systemic inflammation in the mother and the activation of distinct placental inflammatory pathways. Biol Reprod. 90(6): 129.

Azmitia, E. C. (2001): Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. Brain Res Bull., 56(5): 413-24.

Baković P., Kesić M., Perić M., Bečeheli I., Horvatiček M., George M., Čičin-Šain L., Desoye G., Wadsack C., Panzenboeck U., Štefulj, J. (2021): Differential Serotonin Uptake Mechanisms at the Human Maternal-Fetal Interface. Int J Mol Sci. 22(15): 7807.

Barbour L.A., Farabi S.S., Friedman J.E., Hirsch N.M., Reece M.S., Van Pelt R.E., Hernandez T.L. (2018): Postprandial Triglycerides Predict Newborn Fat More Strongly than Glucose in Women with Obesity in Early Pregnancy. Obesity (Silver Spring). 26(8): 1347-1356.

Basatemur E., Gardiner J., Williams C., Melhuish E., Barnes J., Sutcliffe A. (2013): Maternal prepregnancy BMI and child cognition: a longitudinal cohort study. Pediatrics. 131(1): 56-63.

Berg J.M., Tymoczko J.M., Stryer L. (2013): Biokemija – udžbenik . izdanje. Školska knjiga, Zagreb.

Berger M., Gray J. A., Roth B.L. (2009): The expanded biology of serotonin. Annu Rev Med. 60: 355-66.

Bharti R., Dey G., Das A.K., Mandal M. (2018): Differential expression of IL-6/IL-6R and MAO-A regulates invasion/angiogenesis in breast cancer. Br J Cancer. 118(11): 1442-1452.

Boney C.M., Verma A., Tucker R., Vohr B.R. (2005): Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. Pediatrics. 115(3): e290-6.

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

Boulet S.L., Salihu H.M., Alexander G.R. (2004): Mode of delivery and birth outcomes of macrosomic infants. J Obstet Gynaecol. 24(6): 622-9.

Carmichael, S. W., & Pfeiffer, G. L. (1987): Monoamine oxidase types A and B in the human adrenal gland and pheochromocytoma. Neurochem Int. 10(1): 49-53.

Catalano P.M., Farrell K., Thomas A., Huston-Presley L., Mencin P., de Mouzon S.H., Amini S.B. (2009b): Perinatal risk factors for childhood obesity and metabolic dysregulation. Am J Clin Nutr. 90(5): 1303-13.

Catalano P.M., Presley L., Minium J., Hauguel-de Mouzon S. (2009a): Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. Diabetes Care. 32(6): 1076-80.

Challier J.C., Basu S., Bintein T., Minium J., Hotmire K., Catalano P.M., Hauguel-de Mouzon S. (2008): Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. Placenta. 29(3): 274–81.

Cheung N. W., Byth K. (2003): Population health significance of gestational diabetes. Diabetes Care. 26(7): 2005-9.

Cvitic S., Desoye G., Hiden U. (2014): Glucose, insulin, and oxygen interplay in placental hypervascularisation in diabetes mellitus. Biomed. Res. Int. 2014: 145846.

Dabelea, D., Hanson, R. L., Lindsay, R. S., Pettitt, D. J., Imperatore, G., Gabir, M. M., Roumain J., Bennett P.H., Knowler, W. C. (2000): Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. Diabetes. 49(12): 2208-2211.

Daly, B., Toulis, K. A., Thomas, N., Gokhale, K., Martin, J., Webber, J., Keerthy D, Jolly K., Saravanan P., Nirantharakumar, K. (2018): Increased risk of ischemic heart disease, hypertension, and type 2 diabetes in women with previous gestational diabetes mellitus, a

target group in general practice for preventive interventions: a population-based cohort study. PLoS medicine. 15(1): e1002488.

Damm P. (2009): Future risk of diabetes in mother and child after gestational diabetes mellitus. Int. J. Gynaecol. Obstet. 104 Suppl 1: S25-6.

Dancis J., Jansen V., Kayden H. J., Schneider H., Levitz M. (1973): Transfer across perfused human placenta. II. Free fatty acids. Pediatr Res. 7(4): 192-7.

Desoye G. (2018): The human placenta in diabetes and obesity: friend or foe? The 2017 Norbert Freinkel Award Lecture. Diabetes Care. 41(7): 1362-1369.

Desoye G., Hauguel- de Mouzon S. (2007): The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network. Diabetes Care. 30 Suppl 2: S120-S126.

Desoye G., Nolan C. J. (2016): The fetal glucose steal: an underappreciated phenomenon in diabetic pregnancy. Diabetologia. 59(6): 1089-1094.

Desoye G., Shafrir E. (1994): Placental metabolism and its regulation in health and diabetes. Mol. Aspects Med. 15(6): 505-682.

Duan H., Wang J. (2010): Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3. J Pharmacol Exp Ther. 335(3): 743-53.

Eder, M., Csapo, B., Wadsack, C., Haas, J., Catalano, P. M., Desoye, G., & Van Poppel, M. N. M. (2016): Sex differences in the association of cord blood insulin with subcutaneous adipose tissue in neonates. Int J Obes (Lond). 40(3): 538-542.

Ehrenberg H.M., Durnwald C.P., Catalano P., Mercer B.M. (2015): The influence of obesity and diabetes on the risk of cesarean delivery. Am J Obstet Gynecol. 191(3): 969-74.

Erspamer, V., & Vialli, M. (1937): Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. Boll d Soc Med-chir Pavia. 51: 357-363.

Forno E., Young O.M., Kumar R., Simhan H., Celedón J.C. (2014): Maternal obesity in pregnancy, gestational weight gain, and risk of childhood asthma. Pediatrics. 134(2): e535-46.

Fraser A., Lawlor, D. A. (2014): Long- term health outcomes in offspring born to women with diabetes in pregnancy. Curr Diab Rep. 14(5): 489.

Frazer A., Hensler J.G. (1999) Serotonin. U: Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fisher S. K., Uhler M. D. (ur.), Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven.

Friedman J. E., Kirwan J. P., Jing M., Presley L., Catalano P. M. (2008): Increased skeletal muscle tumor necrosis factor- alpha and impaired insulin signaling persist in obese women with gestational diabetes mellitus 1 year postpartum. Diabetes. 57(3): 606-613.

Fuchs F., Senat M.V., Rey E., Balayla J., Chaillet N., Bouyer J., Audibert F. (2017): Impact of maternal obesity on the incidence of pregnancy complications in France and Canada. Sci Rep. 7(1): 10859.

Gauster, M., Hiden, U., van Poppel, M., Frank, S., Wadsack, C., Hauguel-de Mouzon, S., Desoye, G. (2011). Dysregulation of placental endothelial lipase in obese women with gestational diabetes mellitus. Diabetes. 60(10): 2457-2464.

Gauster M., Desoye G., Totsch M., Hiden U. (2012): The placenta and gestational diabetes mellitus. Curr Diab Rep. 12(1): 16-23.

Grimsby, J., Chen, K., Wang, L. J., Lan, N. C., & Shih, J. C. (1991): Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. Proc Natl Acad Sci U S A. 88(9): 3637-3641.

Grunnet, L. G., Hansen, S., Hjort, L., Madsen, C. M., Kampmann, F. B., Thuesen, A. C. B., Granstrømi C., Strøm M., Maslova E., Frikke-Schmidt R., Damm P., Chavarro J.E., Hu F.B., Olsen S.F.,Vaag, A. (2017): Adiposity, dysmetabolic traits, and earlier onset of female puberty in adolescent offspring of women with gestational diabetes mellitus: a clinical study within the Danish National Birth Cohort. Diabetes care. 40(12): 1746-1755.

Guyton A.C., Hall J.E. (2013): Medicinska fiziologija – udžbenik, 13. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb

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

Hadden, D. R. (2008): Prediabetes and the big baby. Diabet Med. 25(1): 1-10.

Haggarty P., Page K., Abramovich D. R., Ashton J., Brown D. (1997): Long- chain polyunsaturated fatty acid transport across the perfused human placenta. Placenta. 18: 635-642.

HAPO Study Cooperative Research Group; Metzger B.E., Lowe L.P., Dyer A.R., Trimble E.R., Chaovarindr U., Coustan D.R., Hadden D.R., McCance D.R., Hod M., McIntyre H.D., Oats J.J., Persson B., Rogers M.S., Sacks D.A. (2008): Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. N Engl J Med. 358(19): 1991-2002.

Hare, M. L. C. (1928): Tyramine oxidase: a new enzyme system in liver. Biochem J. 22(4): 968-979.

Hauguel S., Desmaizieres V., Challier J. C. (1986): Glucose uptake, utilization, and transfer by the human placenta as functions of maternal glucose concentration. Pediatr. Res. 20(3): 269-273.

Hoch D., Gauster M., Hauguel- de Mouzon S., Desoye G. (2018): Diabesity- associated oxidative and inflammatory stress signalling in the early human placenta. Mol Aspects Med. 66: 21-30.

Hotamisligil, G. S., & Breakefield, X. O. (1991): Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. Am J Hum Genet. 49(2): 383.

Jacobs B. L., Azmitia E. C. (1992): Structure and function of the brain serotonin system. Physiol Rev. 72(1): 165-229.

Jansson T., Powell T. L. (2013): Role of placental nutrient sensing in developmental programming. Clin Obstet Gynecol. 56(3): 591-601.

Johnston J. P. (1968): Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. Biochem Pharmacol. 17(7): 1285-1297.

Jolly M. C., Sebire N. J., Harris J. P., Regan L., Robinson S. (2003): Risk factors for macrosomia and its clinical consequences: a study of 350,311 pregnancies. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 111(1): 9-14.

Karahoda, R., Abad, C., Horackova, H., Kastner, P., Zaugg, J., Cerveny, L., Kucera, R., Albrecht, C., Staud, F. (2020a): Dynamics of tryptophan metabolic pathways in human placenta and placental-derived cells: Effect of gestation age and trophoblast differentiation. Front Cell Dev Biol. 8: 574034.

Karahoda, R., Horackova, H., Kastner, P., Matthios, A., Cerveny, L., Kucera, R., Kacerovsky, M., Duintjer Tebbens, J., Bonnin, A., Abad, C., Staud, F. (2020b): Serotonin homeostasis in the materno-foetal interface at term: Role of transporters (SERT/SLC6A4 and OCT3/SLC22A3) and monoamine oxidase A (MAO-A) in uptake and degradation of serotonin by human and rat term placenta. Acta Physiol (Oxf). 229(4): e13478.

Kelly, A. C., Powell, T. L., Jansson, T. (2020): Placental function in maternal obesity. Clin Sci (Lond). 134(8): 961-984.

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

Knoll J., Magyar K. (1972): Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. Adv Biochem Psychopharmacol. 5: 393-408.

Kos M., Leniček T. (2011): Osnove patologije posteljice. Medicinska naklada. Zagreb

Kramer C. K., Campbell S., Retnakaran, R. (2019): Gestational diabetes and the risk of cardiovascular disease in women: a systematic review and metaanalysis. Diabetologia. 62(6): 905-914.

Lappas, M., Hiden, U., Desoye, G., Froehlich, J., Mouzon, S. H. D., Jawerbaum, A. (2011): The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. Antioxid Redox Signal. 15(12): 3061-3100.

Lassance, L., Miedl, H., Absenger, M., Diaz-Perez, F., Lang, U., Desoye, G., Hiden, U. (2013): Hyperinsulinemia stimulates angiogenesis of human fetoplacental endothelial cells: a possible role of insulin in placental hypervascularization in diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 98(9): E1438-E1447.

Lauenborg, J., Mathiesen, E., Hansen, T., Glumer, C., Jørgensen, T., Borch-Johnsen, K., Hornnes P., Pedersen O., Damm, P. (2005): The prevalence of the metabolic syndrome in a Danish population of women with previous gestational diabetes mellitus is three-fold higher than in the general population. J Clin Endocrinol Metab. 90(7): 4004-4010.

Lechin F., van der Dijs B., Orozco B., Lechin M., Lechin A.E. (1996): Increased levels of free serotonin in plasma of symptomatic asthmatic patients. Ann Allergy Asthma Immunol 77(3): 245-53.

Lewis R. M., Wadsack C., Desoye G. (2018): Placental fatty acid transfer. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 21(2): 78-82.

Loegl, J., Hiden, U., Nussbaumer, E., Schliefsteiner, C., Cvitic, S., Lang, I., Wadsack C., Huppertz B., Desoye, G. (2016a): Hofbauer cells of M2a, M2b and M2c polarization may regulate feto-placental angiogenesis. Reproduction. 152(5): 447-55.

Loegl, J., Nussbaumer, E., Hiden, U., Majali-Martinez, A., Ghaffari-Tabrizi-Wizy, N., Cvitic, S., Lang I., Desoye G., Huppertz, B. (2016b): Pigment epithelium-derived factor (PEDF): a novel trophoblast-derived factor limiting feto-placental angiogenesis in late pregnancy. Angiogenesis. 19(3): 373-388.

Lovrenčić, M.V., Honović, L., Kralik, S., Matica, J., Prašek, M., Pape-Medvidović, E., Ivanišević, M., Đelmiš, J. (2013): Redefinition of gestational diabetes mellitus: implications for laboratory practice in Croatia. Biochem Med. 23(1): 7-11.

Lowe, W. L., Scholtens, D. M., Lowe, L. P., Kuang, A., Nodzenski, M., Talbot, O., Catalano P.M., Linder B., Brickman W.J., Clayton P., Deerochanawong C., Hamilton J., Josefson J.L., Lashley M., Lawrence J.M., Lebenthal Y., Ma R., Maresh M., McCance D., Tam W.H., Sacks D.A., Dyer A.R., Metzger B.E.; HAPO Follow-up Study Cooperative Research Group. (2018): Association of gestational diabetes with maternal disorders of glucose metabolism and childhood adiposity. Jama. 320(10): 1005-1016.

Lowe W. L. Jr., Scholtens D.M., Kuang A., Linder B., Lawrence J.M., Lebenthal Y., McCance D., Hamilton J., Nodzenski M., Talbot O., Brickman W.J., Clayton P., Ma R.C., Tam W.H., Dyer A.R., Catalano P.M., Lowe L.P., Metzger B.E.; HAPO Follow-up Study Cooperative Research Group. (2019a): Hyperglycemia and adverse pregnancy outcome follow- up study (HAPO FUS): maternal gestational diabetes and childhood glucose metabolism. Diabetes Care. 42(3): 372-380.

Lowe W. L. Jr., Lowe L.P., Kuang A., Catalano P.M., Nodzenski M., Talbot O., Tam W.H., Sacks D.A., McCance D., Linder B., Lebenthal Y., Lawrence J.M., Lashley M., Josefson J.L., Hamilton J., Deerochanawong C., Clayton P., Brickman W.J., Dyer A.R., Scholtens D.M., Metzger B.E.; HAPO Follow-up Study Cooperative Research Group. (2019b): Maternal glucose levels during pregnancy and childhood adiposity in the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Follow- up Study. Diabetologia. 62(4): 598-610.

McIntyre H.D., Catalano P., Zhang C., Desoye G., Mathiesen E. R., Damm P. (2019): Gestational diabetes mellitus. Nat Rev Dis Primers. 5(1): 47.

Metzger B. E., Lowe L.P., Dyer A.R., Trimble E.R., Chaovarindr U., Coustan D.R., Hadden D.R., McCance D.R., Hod M., McIntyre H.D., Oats J.J., Persson B., Rogers M.S., Sacks D.A. (2008): Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. N. Engl J Med. 358(19): 1991-2002.

Nesbitt T.S., Gilbert W.M., Herrchen B. (1998): Shoulder dystocia and associated risk factors with macrosomic infants born in California. Am J Obstet Gynecol. 179(2): 476-80.

Ornaghi S., Mueller M., Barnea E. R., Paidas M. J. (2015): Thrombosis during pregnancy: Risks, prevention, and treatment for mother and fetus--harvesting the power of omic technology, biomarkers and in vitro or in vivo models to facilitate the treatment of thrombosis. Birth Defects Res C Embryo Today. 105(3): 209-25.

Pagan A., Prieto-Sánchez M.T., Blanco-Carnero J.E., Gil-Sánchez A., Parrilla J.J., Demmelmair H., Koletzko B., Larqué E. (2013): Materno- fetal transfer of docosahexaenoic acid is impaired by gestational diabetes mellitus. Am J Physiol Endocrinol Metab. 305(7): E826–E833.

Panuganti K. K., Nguyen M., Kshirsagar R. K. (2023): Obesity. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls.

Pantham P,, Aye I. L., Powell T. L. (2015): Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. Placenta. 36(7): 709-15.

Pehme P.M., Zhang W., Finik J., Pritchett A., Buthmann J., Dana K., Hao K., Nomura Y. (2018): Placental MAOA expression mediates prenatal stress effects on temperament in 12-month-olds. Infant Child Dev. 27(4): e2094.

Pendeloski K. P. T., Ono E., Torloni M. R., Mattar R., Daher S. (2017): Maternal obesity and inflammatory mediators: A controversial association. Am J Reprod Immunol. 77(5).

Perić M., Bečeheli I., Čičin-Šain L., Desoye G., Štefulj J. (2022): Serotonin system in the human placenta - the knowns and unknowns. Front Endocrinol (Lausanne). 13: 1061317.

Peters R. K., Kjos S. L., Xiang A., Buchanan T. A. (1996): Long- term diabetogenic effect of single pregnancy in women with previous gestational diabetes mellitus. Lancet 347 (8996): 227-230.

Poblete J. A., Olmos P. (2021): Obesity and Gestational Diabetes in Pregnant Care and Clinical Practice. Curr Vasc Pharmacol. 19(2): 154-164.

Prieto- Sanchez M. T., Ruiz-Palacios M., Blanco-Carnero J.E., Pagan A., Hellmuth C., Uhl O., Peissner W., Ruiz-Alcaraz A.J., Parrilla J.J., Koletzko B., Larqué E. (2017): Placental MFSD2a transporter is related to decreased DHA in cord blood of women with treated gestational diabetes. Clin Nutr. 36(2): 513-521.

Ramsay J. E., Ferrell W. R., Crawford L., Wallace A. M., Greer I. A., Sattar N. (2002): Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. J Clin Endocrinol Metab. 87(9): 4231-7.

Ramamoorthy S., Giovanetti E., Qian Y., Blakely R. D. (1998): Phosphorylation and regulation of antidepressant-sensitive serotonin transporters. J Biol Chem. 273(4): 2458-66.

Rapport M. M., ArdaAlden G., Page I. H. (1948): Serum vasoconstrictor (Serotonin). J Biol Chem 176(3): 1243-51.

Retnakaran R. (2018): Hyperglycemia in pregnancy and its implications for a woman's future risk of cardiovascular disease. Diabetes Res Clin Pract. 145: 193-199.

Retnakaran R., Shah, B. R. (2017): Role of type 2 diabetes in determining retinal, renal, and cardiovascular outcomes in women with previous gestational diabetes mellitus. Diabetes Care. 40: 101-108.

Reynolds R. M., Allan K. M., Raja E. A., Bhattacharya S., McNeill G., Hannaford P. C., Sarwar N., Lee A. J., Bhattacharya S., Norman J. E. (2013): Maternal obesity during pregnancy and premature mortality from cardiovascular event in adult offspring: follow-up of 1 323 275 person years. BMJ. 347: f4539.

Richter, D. (1937): Adrenaline and amine oxidase. Biochem J. 31(11): 2022-2028.

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

Sanfilippo, C., Castrogiovanni, P., Imbesi, R., Lazzarino, G., Di Pietro, V., Volti, G. L., Tibullo D,. Barbagallo I., Lazzarino G., Avola R., Musumeci G., Fazio F., Vinciguerra M., Di Rosa, M. (2021): Sex-dependent monoamine oxidase isoforms expression patterns during human brain ageing. Mech Ageing and Dev. 197: 111516.

Scholler M., Wadsack C., Metso J., Chirackal Manavalan A.P., Sreckovic I., Schweinzer C., Hiden U., Jauhiainen M., Desoye G., Panzenboeck U. (2012): Phospholipid transfer protein is differentially expressed in human arterial and venous placental endothelial cells and enhances cholesterol efflux to fetal HDL. J. Clin Endocrinol Metab. 97(7): 2466-2474.

Sharp, T., Barnes, N. M. (2020): Central 5-HT receptors and their function; present and future. Neuropharmacology. 177: 108155.

Silverman B. L. et al. (1991): Long- term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers. Diabetes. 40 Suppl 2: 121-125.

Sivasubramaniam S. D., Finch C. C., Billett M. A., Baker P. N., Billett E. E. (2002): Monoamine oxidase expression and activity in human placentae from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. Placenta. 23(2-3): 163-71.

Sivasubramaniam, S. D., Finch, C. C., Rodriguez, M. J., Mahy, N., & Billett, E. E. (2003): A comparative study of the expression of monoamine oxidase-A and-B mRNA and protein in non-CNS human tissues. Cell Tissue Res. 313(3): 291-300.

Stanley C. A., Rozance P.J., Thornton P. S., De Leon D. D., Harris D., Haymond M. W., Hussain K., Levitsky L. L., Murad M.H., Simmons R.A., Sperling M. A., Weinstein D. A., White N. H., Wolfsdorf J. I. (2015): Re-evaluating "transitional neonatal hypoglycemia": mechanism and implications for management. J Pediatr. 166(6): 1520-5.e1.

Staud F., Pan X., Karahoda R., Dong X., Kastner P., Horackova H., Vachalova V., Markert, U. R., i Abad C. (2023): Characterization of a human placental clearance system to regulate serotonin levels in the fetoplacental unit. Reprod Biol Endocrinol. 21(1): 74.

Sun Y., Kopp S., Strutz J., Gali C.C., Zandl-Lang M., Fanaee-Danesh E., Kirsch A., Cvitic S., Frank S., Saffery R., Björkhem I., Desoye G., Wadsack C., Panzenboeck U. (2018): Gestational diabetes mellitus modulates cholesterol homeostasis in human fetoplacental endothelium. Biochim. Biophys. Acta Mol Cell Biol Lipids. 1863(9): 968-979.

Turner D., Monthé-Drèze C., Cherkerzian S., Gregory K., Sen S. (2019): Maternal obesity and cesarean section delivery: additional risk factors for neonatal hypoglycemia? J Perinatol. 39(8): 1057-1064.

Vaughan O. R., Rosario F. J., Powell T. L., Jansson T. (2017): Regulation of Placental Amino Acid Transport and Fetal Growth. Prog Mol Biol Transl Sci. 145: 217-251.

Viau, M., Lafond, J., Vaillancourt, C., 2009. Expression of placental serotonin transporter and 5-HT 2A receptor in normal and gestational diabetes mellitus pregnancies. Reprod Biomed Online. 19(2): 207-215.

Waller D. G., 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.

Waters T., Minium J., Hagiac M., Schnellinger P., Ryan D., Hauguel-deMouzon S., Catalano P. (2015): Does maternal insulin sensitivity improve immediately after delivery or do we need to wait unti six weeks postpartum? Am J Obstet Gynecol. 212(1): S20.

Watts, S. W., Morrison, S. F., Davis, R. P., Barman, S. M. (2012): Serotonin and blood pressure regulation. Pharmacol Rev. 64(2): 359-388.

Xiang A.H., Wang X., Martinez M.P., Walthall J.C., Curry E.S., Page K., Buchanan T.A., Coleman K.J., Getahun D. (2015): Association of maternal diabetes with autism in offspring. Jama. 313(14): 1425-1434.

Xiang, A. H., Wang, X., Martinez, M. P., Getahun, D., Page, K. A., Buchanan, T. A., & Feldman, K. (2018): Maternal gestational diabetes mellitus, type 1 diabetes, and type 2 diabetes during pregnancy and risk of ADHD in offspring. Diabetes Care. 41(12): 2502-2508.

Yabut J. M., Crane J. D., Green A. E., Keating D. J., Khan W. I., Steinberg G. R.(2019): Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule. Endocr Rev. 40(4): 1092-1107.

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

Mrežni izvori:

Protein Atlas https://www.proteinatlas.org/ (Pristupljeno 31.5.2024.)

Svjetska zdravstvena organizacija https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/a-healthy-lifestyle---who-recommendations (Pristupljeno 1.4.2024.)

8. Životopis

Rođena sam 22. rujna 1997. godine u Koprivnici. Nakon završene osnovne škole upisala sam Gimnaziju „Fran Galović“ u Koprivnici, a zatim učiteljski fakultet na Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli. Nakon 2 godine obrazovanja shvatila sam da su moji interesi u području biologije i potom sam odlučila nastaviti školovanje na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, na odjelu za biologiju gdje sam 2021. godine stekla titulu prvostupnika biologije (univ. bacc. biol.). Po završetku preddiplomskog studija, obrazovanje sam nastavila na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na diplomskom studiju Eksperimentalne biologije, smjer Fiziologija i imunobiologija. Tijekom studija bila sam uključena u projekt Edukacija i istraživanje Lošinjskog arhipelaga te sam sudjelovala u organizacijskom timu Simpozija studenata biologije 2022. i 2023. (SiSB7 i SiSB8). Pohađala sam laboratorijsku stručnu praksu na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu na zavodu za molekularnu medicinu u laboratoriju za molekularnu virologiju i bakteriologiju pod vodstvom dr. sc. Josipe Skelin Ilić. Tijekom zadnje godine diplomskog studija izradila sam ovaj diplomski rad također na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasminke Štefulj i komenterstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović. Usporedno sa fakultetom odrađivala sam i brojne studentske poslove koji su također pridonijeli mojem osobnom razvoju i novim vještima.