

# Povezanost polimorfizama gena za serotoninski prijenosnik s antropometrijskim karakteristikama novorođenčadi

---

Kugić, Azra

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:661993>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Azra Kugić**

**Povezanost polimorfizama gena za serotonininski  
prijenosnik s antropometrijskim  
karakteristikama novorođenčadi**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad prijavljen je Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, i izrađen u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, pod stručnim vodstvom dr. sc. Ivone Bečeheli i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Tome Kesera.

*Neizmjernu zahvalnost dugujem svojoj mentorici dr. sc. Ivoni Bečeheli na stručnom vodstvu, ukazanom povjerenju i pruženim savjetima prilikom izrade i pisanja ovog rada. Posebno se zahvaljujem na strpljivosti, konstantnoj podršci i razumijevanju te dragocjenom vremenu koje mi je posvetila.*

*Iskreno se zahvaljujem voditeljici laboratorija prof. dr. sc. Jasminki Štefulj te dr. sc. Lipi Čičin-Šain na prilici koja mi je pružena.*

*Veliku zahvalu dugujem suvoditelju doc. dr. sc. Tomi Keseru na iskazanoj susretljivosti i pruženoj pomoći.*

*Izrazito se zahvaljujem dr.sc. Marini Horvatiček, dr.sc. Maji Kesić, mag. biol. mol. Maji Perić te mag. biol. oecol. Zvonimiru Ercegovcu na nesebičnom dijeljenju svojeg iskustva, pruženim savjetima i odličnoj radnoj atmosferi.*

*Posebna zahvala ide mojoj obitelji, sestri Almi i svim prijateljima na beskrajnoj potpori i strpljenju.*

Rad je financiran sredstvima projekta *Utjecaj majčinog metaboličkog stanja na serotoninski sustav posteljice i neonatusa: od metilacije DNA do funkcije proteina* (IP-2018-01-6547) Hrvatske zaklade za znanost, voditeljice prof. dr. sc. Jasminke Štefulj.



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Serotoninski sustav .....	1
1.1.1. Struktura, uloga i sinteza serotonina .....	1
1.1.2. Pohrana, otpuštanje i inaktivacija serotonina .....	2
1.2. Serotoninski transporter .....	2
1.3. Gen za serotoninski transporter .....	4
1.4. Polimorfizmi gena za serotoninski transporter .....	6
1.4.1. Polimorfizam 5-HTTLPR .....	7
1.4.2. Polimorfizam rs25531 .....	10
1.4.3. Polimorfizam STin2 .....	11
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>13</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>14</b>
3.1. Materijali .....	14
3.1.1. Uzorci i podaci o sudionicima .....	14
3.1.2. Kemikalije i enzimi .....	15
3.1.3. Tehnička oprema .....	16
3.2. Metode .....	17
3.2.1. Izolacija genomske DNA .....	17
3.2.1.1. Priprema tkiva posteljice .....	17
3.2.1.2. Postupak izolacije genomske DNA .....	18
3.2.1.3. Mjerenje masene koncentracije izolata DNA .....	19
3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR) .....	20
3.2.2.1. Genotipizacija polimorfizma 5-HTTLPR .....	21
3.2.2.1.1. Optimizacija metode .....	21
3.2.2.2. Genotipizacija polimorfizma STin2 .....	22

3.2.3. Digestija restrikcijskom endonukleazom <i>MspI</i> za genotipizaciju polimorfizma rs25531 .....	23
3.2.4. Agarozna gel elektroforeza .....	24
3.2.4.1. Optimizacija metode.....	26
3.2.5. Statistička obrada podataka .....	26
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>28</b>
4.1. Demografske i kliničke karakteristike uzorka.....	28
4.1.1. Povezanost majčinih i djetetovih karakteristika s antropometrijskim karakteristikama novorođenčeta.....	29
4.2. Genotipizacija polimorfizama 5-HTTLPR, rs25531, STin2 .....	32
4.2.1. 5-HTTLPR .....	32
4.2.2 rs25531 .....	33
4.2.3. STin2 .....	34
4.3. Analiza odstupanja frekvencije genotipova od Hardy-Weinbergovog načela ravnoteže .....	35
4.4. Povezanost polimorfizama 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 u genu <i>SLC6A4</i> s karakteristikama majke i novorođenčeta za koje je pokazana povezanost s antropometrijskim karakteristikama novorođenčeta.....	37
4.5. Povezanost polimorfizama 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 s antropometrijskim karakteristikama novorođenčeta: porođajnom masom i duljinom te ponderalnim indeksom .....	40
4.6. Optimizacija metode za genotipizaciju polimorfizma 5-HTTLPR.....	45
4.6.1. Optimizacija PCR reakcije .....	45
4.6.1.1. Utjecaj količine DNA i vrsta tkiva iz kojeg je izolirana DNA.....	45
4.6.1.2. Utjecaj PCR uređaja .....	47
4.6.1.3. Utjecaj uvjeta PCR reakcije .....	48
4.6.2. Optimizacija postupka agarozne gel elektroforeze .....	50
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>54</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>64</b>

<b>7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....</b>	<b>67</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>69</b>
<b>9. SAŽETAK / SUMMARY .....</b>	<b>81</b>
9.1. Sažetak .....	81
9.2. Summary .....	82
<b>10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. UVOD

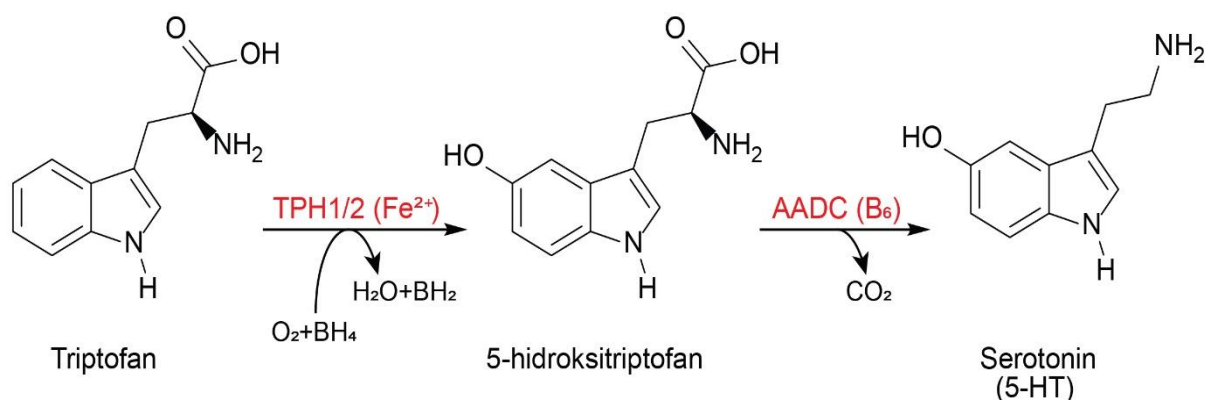
## 1.1. Serotoninski sustav

### 1.1.1. Struktura, uloga i sinteza serotonina

Serotonin, također poznat kao 5-hidroksitriptamin (5-HT), je monoamin s bazičnom amino skupinom spojenom na aromatsku jezgru preko alifatskog lanca od dva ugljikova atoma (Slika 1.) (Nichols i Nichols, 2008). Jedan je od glavnih neurotransmitera u središnjem živčanom sustavu, ali ima i ulogu hormona te autokrine i parakrine signalne molekule u različitim organskim sustavima. Uključen je u širok raspon fizioloških funkcija, poput kardiovaskularne regulacije, regulacije ponašanja, ciklusa budnosti i spavanja, apetita i energetske ravnoteže (Nichols i Nichols, 2008; Lucki, 1998).

Od ukupne količine u tijelu, samo se otprilike 5 % serotonina nalazi u središnjem živčanom sustavu, dok je preostala količina rasprostranjena periferno, najvećim dijelom u gastrointestinalnom (GI) traktu, trombocitima, jetri i posteljici, ali i u drugim organima i tkivima (Rosenfeld, 2020; El-Merahbi i sur., 2015). Središnje mjesto sinteze serotonina u mozgu jesu *raphe* jezgre smještene medijalno, u području moždanog debla (Karlović, 2016; Nichols i Nichols, 2008), dok se sinteza na periferiji odvija gotovo isključivo unutar enterokromafinih stanica GI trakta (Nichols i Nichols, 2008). Sinteza započinje iz esencijalne aminokiseline triptofan, a odvija se u dva enzimska koraka (Slika 1.). Triptofan se, nakon aktivnog prijenosa preko membrane, u neuronima i enterokromafinim stanicama hidroksilira uz pomoć enzima triptofan hidroksilaze (TPH, EC 1.14.16.4) (www.expasy.org, a; Karlović, 2016). Za katalitičku aktivnost navedenog enzima potrebni su molekularni kisik te kofaktori tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) i željezov kation, a u tijelu je prisutan u obliku dva izoenzima: TPH-2, moždani izoenzim, i TPH-1 koja je prisutna na periferiji (www.expasy.org, a; Brunton i sur., 2018; Karlović, 2016). Nastali 5-hidroksitriptofan dalje se dekarboksilira u serotonin pomoću aromatske L-aminokiselinske dekarboksilaze (engl. *aromatic-L-amino-acid decarboxylase*, AADC), također poznata kao 5-hidroksitriptofan dekarboksilaza (EC 4.1.1.28), a neophodan kofaktor za ovu reakciju je piridoksal-5'-fosfat, aktivni oblik vitamina B<sub>6</sub> (www.expasy.org, b; Karlović, 2016).





Slika 1. Shematski prikaz biosinteze serotonina (preuzeto i prilagođeno iz Matthes i Bader, 2018).

### 1.1.2. Pohrana, otpuštanje i inaktivacija serotonina

Kako bi se zaštitio od razgradnje oksidativnom deaminacijom monoaminoooksidazom (MAO, EC 1.4.3.4) ([www.expasy.org](http://www.expasy.org), c), nakon sinteze serotonin se pohranjuje u sekretijskim vezikulama presinaptičkih neurona i enterokromafinih stanica iz kojih se dalje egzocitozom oslobađa u izvanstanični prostor. Najvažniji mehanizam njegove inaktivacije jest uklanjanje, odnosno, ponovni unos nazad u stanice putem serotoniniskog transportera (SERT). SERT ima važnu funkciju u živčanom i probavnom sustavu, ali i u kardiovaskularnom sustavu gdje ima ulogu u preuzimanju serotonina iz plazme i njegovoj pohrani u trombocitima te tako sudjeluje u regulaciji agregacije trombocita i vazokonstrikcije okolnih krvnih žila (Karlović, 2016; Jonnakuty i Gragnoli, 2008).

### 1.2. Serotoniniski transporter

Serotoniniski transporter član je obitelji monoaminskih prijenosnika ovisnih o  $Na^+$  i  $Cl^-$  u koju se također ubrajaju transporteri za dopamin (DAT) i norepinefrin (NET), kao i transporteri za kreatin, prolin i  $\gamma$ -aminomaslačnu kiselinu. Riječ je o membranskom glikoproteinu s 12 transmembranskih regija građenom od 630 aminokiselina, molekularne mase od približno 70 kDa, tj. 90 kDa u potpuno glikoziliranoj formi. SERT koristi energiju ionskog gradijenta za aktivni prijenos serotonina, a njegova glavna uloga očituje se u terminaciji

serotoninske transmisije unosom serotonina iz izvanstaničnog u unutarstanični prostor (Katzung, 2020; Cooper i sur., 2018; Lin i sur., 2011; Visiers i sur., 2003; Lesch i sur., 1993).

Pri fiziološkom pH, zbog svoje bazične, alifatske amino skupine ( $pK_a \approx 10$ ), serotonin je pozitivno nabijena molekula koja bez pomoći odgovarajućeg proteinskog nosača ne može prijeći preko stanične membrane (Pratungdejkul i sur., 2006; De Ponti, 2004). Vezanje izvanstaničnog serotonina na vezno mjesto transportera SERT dovodi do konformacijskih promjena samog transportera i posljedičnog kotransporta  $Na^+$  i  $Cl^-$  u stanični prostor. Vezanje unutarstaničnog  $K^+$  i njegovo otpuštanje izvan stanice uzrokuje ponovnu uspostavu bazalne konformacije proteina SERT te otpuštanje serotonina u unutarstanični prostor (Katzung, 2020).

Zbog svoje nezamjenjive uloge u regulaciji razine izvanstaničnog serotonina, SERT je prepoznat kao ključna farmakološka meta u liječenju velikog broja različitih patoloških stanja. Inhibicija ovog transportera, tj. unosa serotonina u stanicu, glavni je mehanizam velikog broja lijekova, ali i opojnih sredstava poput kokaina i amfetamina (Lin i sur., 2011). S obzirom na njihovu kemijsku strukturu i mehanizme djelovanja, lijekovi koji svoje djelovanje ispoljavaju inhibicijom proteina SERT dijele se u nekoliko većih skupina (Tablica 1.), kao što su selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SIPPS) (engl. *selective serotonin reuptake inhibitor*, SSRI), triciklički antidepressivi (TCA), serotoninski antagonisti i inhibitori ponovne pohrane serotonina (SARI), inhibitori ponovne pohrane serotonina i noradrenalina (SNRI), parcijalni serotoninski agonisti i inhibitori ponovne pohrane serotonina (SPARI) te noradrenergički i specifični serotoninergički antidepressivi (NaSSA). U velikoj mjeri riječ je o lijekovima koji se poglavito primjenjuju u liječenju depresije, ali mogu biti indicirani i za liječenje drugih stanja poput opsesivno-kompulzivnog poremećaja, paničnih i anksioznih poremećaja, posttraumatskog stresnog poremećaja, neuropatske boli, profilaktičkog liječenja tenzijskih glavobolja i migrena, noćne enureze kod djece te različitih poremećaja hranjenja poput anoreksije nervoze i bulimije (www.halmed.hr, a, b; Bogdanović, 2022; Francetić i sur., 2015; Lin i sur., 2011; Šagud i sur., 2002).

Tablica 1. Podjela inhibitora ponovne pohrane serotonina po skupinama (Bogdanović, 2022; Francetić i sur., 2015).

Naziv skupine lijekova	Naziv lijeka
Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SIPPS)	fluvoksamin, fluoksetin, sertralin, paroksetin, escitalopram, citalopram
Triciklički antidepresivi (TCA)	amitriptilin, maprotilin, imipramin, dezipramin, klomipramin, nortriptilin
Serotoninski antagonisti i inhibitori ponovne pohrane serotonina (SARI)	trazodon, vortiooksetin, nefazodon
Inhibitori ponovne pohrane serotonina i noradrenalina (SNRI)	duloksetin, venlafaksin, desvenlafaksin, milnacipran, levomilnacipran
Parcijalni serotoninski agonisti i inhibitori ponovne pohrane serotonina (SPARI)	vilazodon
Noradrenergički i specifični serotonergički antidepresivi (NaSSA)	mirtazapin, mianserin

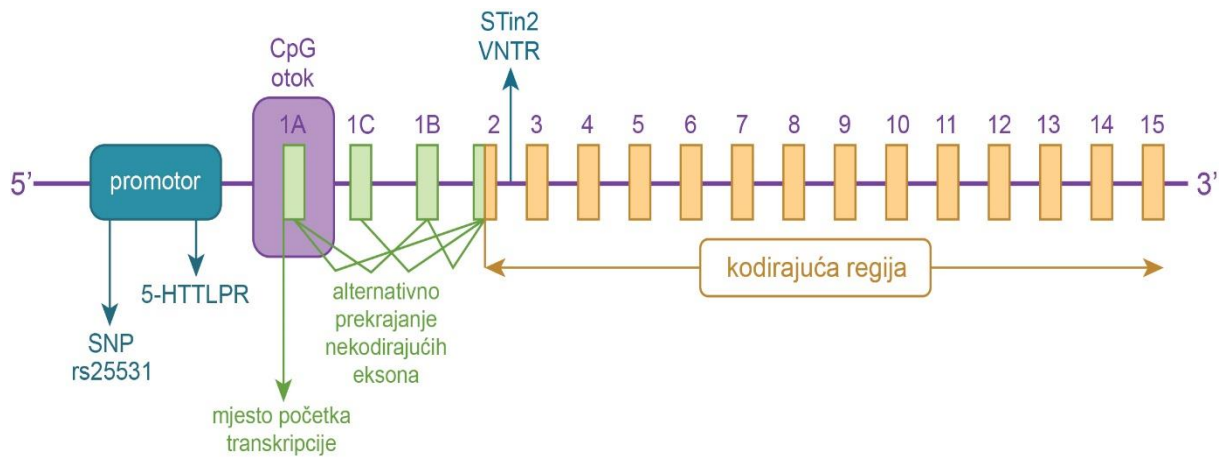
S obzirom na iznimno važan značaj i funkciju serotonina u regulaciji apetita, prehrambenih navika, crijevne peristaltike i tjelesne mase, upravo je serotoninski sustav i njegova uloga u kontroli energijske ravnoteže organizma posljednjih desetljeća u fokusu brojnih znanstvenih istraživanja. Poznato je kako su razmjeri tzv. epidemije debljine u konstantnom porastu te predstavljaju značajnu ugrozu zdravlju i kvaliteti života stanovništva na globalnoj razini. U potrazi za potencijalnim genskim faktorima koji doprinose podložnosti razvoja debljine i pretilosti, prepoznato je i istraženo nekoliko gena kandidata, među kojima se ističe i gen za serotoninski transporter (who.int; Peralta-Leal, 2012).

### 1.3. Gen za serotoninski transporter

Gen za serotoninski transporter, *SLC6A4* (engl. *solute carrier family 6 member 4*, *SLC6A4*), smješten je na duljem (*q*) kraku kromosoma 17 na položaju 11.2 te obuhvaća približno 40 kilo baza (kb) DNA. Sadrži 15 egzona i jednu promotorsku regiju smještenu uzvodno od egzona 1 (Slika 2.) (Murphy i Lesch, 2008). Transkripcijska aktivnost gena izražena je u većem broju tkiva i organa, ponajviše u moždanom deblu, plućima, tankom crijevu i posteljici (proteinatlas.org; ncbi.nlm.nih.gov, a). Riječ je o evolucijski visoko konzerviranom

genu čiji su ortoložni geni dosad zabilježeni u oko 400 različitih organizama. Visoka razina očuvanosti DNA sekvence i homologije među vrstama (čak više od 90 % homologije među kralježnjacima, po nekim istraživanjima) upućuju na presudnu važnost navedenog gena i njegovu nezamjenjivu ulogu u očuvanju normalne funkcije organizma (ncbi.nlm.nih.gov, a; Murphy i Lesch, 2008; Murphy i sur., 2004).

Kontrola ekspresije gena *SLC6A4* odvija se na više razina. Epigenetička regulacija na razini transkripcije odvija se putem metilacije tzv. CpG mjesta (engl. *cytosine-phosphate-guanine sites*). U neposrednoj blizini 5' promotorske regije *SLC6A4* gena smješten je ukupno 81 dinukleotidni par citozina i gvanina organiziran u obliku CpG otoka (engl. *CpG island*) (Slika 2.). Visoka razina metilacije spomenutih CpG mjesta dovodi se u vezu sa smanjenom aktivnošću *SLC6A4* gena i nizom strukturnih, funkcionalnih i bihevioralnih promjena u organizmu, poput primjerice sklonosti agresivnom ponašanju (Blažević i sur., 2017; Palma-Gudiel i Fañanás, 2016; Wang i sur., 2012). Ekspresija gena *SLC6A4* na posttranskripcijskoj razini regulirana je putem molekula mikroRNA (miR) miR-15a i miR-16 za koje je primijećeno da ulaze u interakciju s 3' netranslatirajućom regijom molekule mRNA i onemogućuju njezinu daljnju translaciju (Moya i sur., 2013). Osim toga, veći broj alternativnih promotora u kombinaciji s alternativnim prekrajanjem nekodirajućih egzona 1A, 1B i 1C u određenim tkivima doprinose nastanku višestrukih mRNA izoformi. Uz to, alternativna poliadenilacija 3' netranslatirajuće regije molekule mRNA također doprinosi varijabilnosti konačnih mRNA transkripata (Palma-Gudiel i Fañanás, 2016; Murphy i Lesch, 2008; Murphy i sur., 2004). Varijacije u poliadenilaciji 3' regije mogu rezultirati nastankom molekula mRNA različitih duljina i sekundarnih struktura što posljedično može utjecati na njihovu stabilnost, tj. brzinu razgradnje, a time i na razinu translacije konačnog proteinskog produkta (Di Giammartino i sur., 2011). Također, zabilježena je i uloga imunskog sustava u ekspresiji gena za serotoninški transporter. Primijećeno je kako interleukin (IL) 1 $\beta$  dovodi do povećanja translacije molekula mRNA SERT-a u JAr stanicama koriokarcinoma čovjeka (Ramamoorthy i sur., 1995), dok je za IL-6 uočeno da uzrokuje smanjenje translacije i količinu SERT-a u stanicama hipokampusu miševa (Kong i sur., 2015).



Slika 2. Shematski prikaz gena za serotoninski transporter, *SLC6A4* (preuzeto i prilagođeno iz Palma-Gudiel i Fañanás, 2016; Murphy i Lesch, 2008).

Pored svega navedenog, potrebno je istaknuti i presudnu ulogu određenih genskih polimorfizama u kontroli razine ekspresije gena. Dosad je otkriveno oko 30 različitih genskih varijanti u genu za serotoninski transporter kao što su polimorfizmi varijabilnog broja ponavljanja tandemskih sljedova (engl. *variable number tandem repeat*, VNTR), polimorfizmi zamjene pojedinačnih nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) te varijacije u inserciji i deleciji nukleotidnih sljedova (Palma-Gudiel i Fañanás, 2016). Među njima se po svojoj značajnosti ističu funkcionalni promotorski polimorfizmi poput polimorfizma duljine 5-HTTLPR (engl. *5-HT transporter linked polymorphic region*) te SNP rs25531, kao i intronski polimorfizam duljine STin2 (engl. *serotonin transporter intron 2*) (Palma-Gudiel i Fañanás, 2016; Lesch i sur., 1994).

#### 1.4. Polimorfizmi gena za serotoninski transporter

Protein SERT ima ulogu u regulaciji serotoninske signalizacije putem modulacije koncentracije izvanstaničnog serotonina. Određeni polimorfizmi gena *SLC6A4* i razlike u njegovoj ekspresiji povezuju se s velikim brojem različitih patoloških stanja (Murphy i sur., 2004).

Ispitivanja provedena na tzv. SERT *knock-out* miševima u kojima je onemogućena sinteza funkcionalne mRNA gena *SLC6A4* (SERT<sup>-/-</sup>), pokazala su određene abnormalnosti u regulaciji crijevne peristaltike, vrlo slične onima prisutnima kod sindroma iritabilnog crijeva (engl. *irritable bowel syndrome*, IBS) (Chen i sur., 2001). U drugim istraživanjima provedenim

na SERT<sup>-/-</sup> miševima, zamijećena je smanjena sinteza i razina 17 $\beta$ -estradiola te povećanje količine masnog tkiva, pojava inzulinske rezistencije i intolerancije na glukozu, dok su Üçeyler i sur. kod muških jedinki SERT<sup>-/-</sup> miševa zabilježili zamjetno nižu razinu fizičke aktivnosti, u usporedbi s divljim tipom, što je vremenom dovelo do povišenja njihove tjelesne mase i posljedičnog nastanka pretilosti (Zha i sur., 2017; Üçeyler i sur., 2010). Povezanost transportera SERT i tjelesne mase primijećena je i u ljudi. Kod iznimno pretilih osoba s indeksom tjelesne mase (ITM) većim od 35 kg/m<sup>2</sup> zabilježen je smanjen broj transportera SERT u staničnim membranama trombocita (Giannaccini i sur., 2013). Određena istraživanja ispitala su posljedice primjene lijekova iz skupine SSRI za vrijeme prenatalnog razvoja na porođajnu masu novorođenčeta pri čemu je pokazano da SSRI terapija utječe na rast i razvoj fetusa (Lewis i sur., 2010). Osim toga, uočeno je da je efekt SSRI terapije na masu novorođenčeta moduliran 5-HTTLPR polimorfizmom u genu *SLC6A4* što dodatno potvrđuje ulogu transportera SERT kao jednog od značajnih faktora uključenih u regulaciju tjelesne mase (Oberlander i sur., 2008).

#### 1.4.1. Polimorfizam 5-HTTLPR

Polimorfizam 5-HTTLPR smješten je u promotorskoj regiji gena *SLC6A4*, 1 kb uzvodno od mjesta inicijacije transkripcije. Riječ je o polimorfizmu duljine koji se sastoji od tandemskog ponavljanja nukleotidnog slijeda bogatog GC parovima, duljine od približno 20 nukleotida. S obzirom na broj tandemskih ponavljanja, razlikujemo dvije uobičajene alelne varijante, dugu (engl. *long*, L) koja sadrži 16 ponavljanja te kratku (engl. *short*, S) koja sadrži 14 ponavljanja. Navedene alelne varijante tvore tri moguća genotipa: L/L, S/L i S/S. Pored S i L alela, zabilježene su i iznimno rijetke varijante od 11-13, 15, 17-24 te 28 ponavljanja (Ikegame i sur., 2021; Lesch i Mössner, 1998; Heils i sur., 1996). Primijećene su značajne razlike u distribuciji spomenutih genotipa unutar različitih etničkih skupina. Distribucija genotipa unutar hrvatske populacije (L/L 38 %, S/L 45 %, S/S 17 %) te frekvencija spomenutih alela (L 61 %, S 39 %) u skladu su s rezultatima dobivenim u bjelačkoj populaciji, dok je značajna razlika alelnih frekvencija primijećena u usporedbi s afroameričkom i azijskom populacijom (Culej i sur., 2014).

Dominantni S alel dovodi se u vezu s dva do tri puta nižom transkripcijskom aktivnošću i koncentracijom SERT mRNA te posljedično i ekspresijom, u usporedbi s L alelom (Iurescia i sur., 2016; Heils i sur., 1996). Alelna varijanta S povezana je s povećanim rizikom razvoja depresije kod starijih, oboljelih od Parkinsonove bolesti te od koronarne bolesti srca (Cheng i

sur., 2021; Zhang i sur., 2020; Gao i sur., 2014). Osim toga dovodi se u vezu s bipolarnim poremećajem, posttraumatskim stresnim poremećajem, s rizikom od razvoja ovisnosti o alkoholu, kao i osobinama povezanih s neuroticizmom u općoj populaciji (Gressier i sur., 2013; Jiang i sur., 2013; Gonda i sur., 2008; Feinn i sur., 2005).

Fuemmeler i sur. ispitali su povezanost različitih varijanti 5-HTTLPR polimorfizma i ITM kategorija ispitanika. Ispitanike (N = 1584) su grupirali u tri ITM kategorije: pretili ispitanici (ITM > 29,9), ispitanici prekomjerne tjelesne mase zajedno s pretilim ispitanicima (ITM ≥ 25) te ispitanici normalne tjelesne mase (ITM = 18,5-24,9). U prve dvije kategorije (pretili te pretili zajedno s ispitanicima prekomjerne tjelesne mase) broj ispitanika S/S genotipa je bio veći u usporedbi s ispitanicima S/L i L/L genotipa. Daljnja stratifikacija prema spolu otkrila je kako je povezanost genotipa i ITM statistički značajna za muški, ali ne i za ženski spol. Ispitivanje je provedeno na grupi adolescenata čija se tjelesna masa pratila kroz veći niz godina te se pokazalo kako je kod S/S homozigota zabilježeno najveće prosječno povećanje ITM, u usporedbi s ispitanicima S/L i L/L genotipa (Fuemmeler i sur., 2008). Slična opažanja utvrđena su i u drugim studijama gdje je na skupini adolescenata utvrđeno kako S alel predstavlja faktor rizika za razvoj pretilosti te kako su djeca s barem jednim S alelom imala veću tzv. ITM z-vrijednost (engl. *z-score*) (prilagođena ITM vrijednost s obzirom na dob i spol djeteta), u usporedbi s L/L homozigotima (Sookoian i sur., 2007). U osoba mlađih od 65 godina koje su preživjele moždani udar, Lan i sur. zabilježili su kako je S/S genotip u većoj mjeri zabilježen među pojedincima koji su imali više ITM vrijednosti i među pretilim osobama, u usporedbi s L/L genotipom, dok u tom pogledu između S/L i L/L genotipa nije zamijećena značajna razlika (Lan i sur., 2009). Na uzorku od 1329 muških ispitanika europskog podrijetla primijećene su statistički značajne razlike u vrijednostima ITM između grupa različitog genotipa (L/L: 25,4 ± 0,2; S/L: 26,0 ± 0,1; S/S: 26,7 ± 0,2) kao i povećan rizik od pojave pretilosti u slučaju S/S genotipa (omjer izgleda (engl. *odds ratio*, OR) u usporedbi S/S genotipa s L/L genotipom iznosio je 1,36) (Sookoian i sur., 2008).

S druge strane, u istraživanju provedenom na skupini ispitanika iz meksičke opće populacije (N = 138) zabilježena je korelacija između L alela i povećanog iznosa ITM (Peralta-Leal i sur., 2012). Kod fizički neaktivnih mlađih odraslih pojedinaca portugalskog podrijetla također je uočena značajna povezanost L alela, prekomjerne tjelesne mase i pretilosti. Iako je među fizički aktivnom populacijom bilo više pretilih pojedinaca, nego u fizički neaktivnoj populaciji, u fizički aktivnoj populaciji nije zamijećena povezanost genotipa i podložnosti razvoja prekomjerne tjelesne mase i pretilosti što ukazuje na mogući zaštitni učinak fizičke

aktivnosti u ublažavanju potencijalnih negativnih efekata genotipa (Dias i sur., 2016). Pored toga, Bah i sur. u svojem su istraživanju zabilježili kako je S/S genotip bio znatno učestaliji među pothranjenim ispitanicima ( $ITM < 20$ ), ali na relativno malom broju sudionika (Bah i sur., 2010), dok određene studije nisu uspjele zamijetiti nikakvu povezanost 5-HTTLPR alelnih varijanti i iznosa tjelesne mase (Iordanidou i sur., 2010; Mergen i sur., 2007).

Dugotrajna izloženost stresu može pogodovati nastanku cijelog niza posljedica, a jedna od njih je i povećana potreba za unosom visoko kaloričnih namirnica što može dovesti do neželjenog povećanja tjelesne mase (Gluck, 2006). Poznato je kako snižena funkcija moždanog serotoniniskog sustava može rezultirati smanjenom otpornosti na stresne događaje te povećati rizik razvoja određenih poremećaja hranjenja (Miller i sur., 2013; Steiger, 2004). S obzirom na to kako je kraća varijanta 5-HTTLPR polimorfizma povezana s manje učinkovitim funkcioniranjem serotoniniskog sustava mozga i većom ranjivošću na stres, pretpostavlja se kako bi spomenuti S alel mogao biti povezan s povećanim rizikom debljanja i/ili pretilosti. Međutim, kod istraživanja tako izravnog odnosa gena i povećane tjelesne mase uočena je zamjetna nereproducibilnost rezultata (Schepers i Markus, 2017).

Moguća uloga i utjecaj polimorfizma 5-HTTLPR na porođajnu masu novorođenčadi nisu u potpunosti razjašnjeni. Oberlander i sur. bilježe kako je novorođenčad S/L genotipa koja je za vrijeme prenatalnog razvoja bila izložena SSRI terapiji imala značajno niže vrijednosti porođajne mase. Kada je utjecaj gestacijske dobi uzet u obzir, primijećeno je kako je porođajna masa novorođenčadi S/S genotipa koja je bila izložena SSRI terapiji bila značajno viša u usporedbi s porođajnom masom novorođenčadi koja nije bila izložena spomenutoj terapiji (Oberlander i sur., 2008). Blažević i sur. otkrili su negativnu korelaciju koncentracije *SLC6A4* mRNA u tkivu posteljice i porođajne mase novorođenčadi ( $n = 50$ ), dok korelacija između 5-HTTLPR alelnih varijanti i porođajne mase nije zabilježena (Blažević i sur., 2017). Conley i Rauscher ispitali su mogući utjecaj 5-HTTLPR polimorfizma na razlike u porođajnoj masi unutar parova jednojajčanih i dvojajčanih blizanaca, no takav utjecaj unutar parova blizanaca, ali i na individualnoj razini nije zabilježen. Međutim, kao jedan od nedostataka istraživanja, autori navode kako podaci o porođajnoj masi u određenom broju slučajeva nisu u potpunosti prikupljeni za oba, već samo jednog od blizanaca što je nepovoljno utjecalo na veličinu analiziranog uzorka i statističku snagu istraživanja (Conley i Rauscher, 2013). Navedeni rezultati ukazuju na potrebu za provođenjem dodatnih istraživanja na većem broju ispitanika koja se odnose ne samo 5-HTTLPR polimorfizam, već i na ostale mehanizme koji bi mogli utjecati na razinu ekspresije gena *SLC6A4*.



#### 1.4.2. Polimorfizam rs25531

Polimorfizam zamjene pojedinačnog nukleotida rs25531 nalazi se na šestom nukleotidnom mjestu unutar 5-HTTLPR inserta duljine 44 bazna para (bp), svojstvenog alelnoj varijanti L. Pokazalo se kako navedeni (A→G) SNP dodatno modulira utjecaj polimorfizma 5-HTTLPR na transkripcijsku aktivnost *SLC6A4* gena. Zastupljeniji alel  $L_A$  dovodi se u vezu s većom ekspresijom gena *SLC6A4* i većom gustoćom transportera SERT na staničnim membranama, dok alel  $L_G$  rezultira nižom transkripcijskom aktivnošću gena, na razini usporedivoj s alelom S. Smatra se kako je navedena modulacija promotorske aktivnosti uzrokovana vezanjem transkripcijskog faktora AP2 (engl. *activator protein 2*) za vezno mjesto na  $L_G$  alelu nastalo supstitucijom adenina gvaninom (Hu i sur., 2006).

S obzirom na zamjetne razlike dvaju L varijanti u razini ekspresije spomenutog gena, određeni autori naglašavaju potrebnu za trialelnom klasifikacijom 5-HTTLPR polimorfizma ( $L_A$ ,  $L_G$ , S), umjesto bialelnom (L, S). Podjela mogućih kombinacija genotipova na visoko ( $L_A/L_A$ ), srednje ( $S/L_A$ ,  $L_A/L_G$ ) i nisko ( $L_G/L_G$ ,  $S/L_G$ ,  $S/S$ ) transkripcijski aktivne, mogla bi u većoj mjeri pridonijeti kvalitetnijoj interpretaciji podataka kako bi se prilikom ispitivanja mogućih povezanosti genotipa i fenotipa izbjegla pojava lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata (Vulturar i sur., 2012).

Različiti S: $L_A$ : $L_G$  omjeri zabilježeni su u bjelačkoj (4:5:1), afroameričkoj (2,5:5:2,5) i američkoj domorodačkoj populaciji (2:1:0) u kojoj je  $L_G$  alel gotovo u potpunosti bio odsutan. Alel  $L_G$  učestaliji je u afričkoj i azijskoj, nego u europskoj populaciji (Murdoch i sur., 2013; Hu i sur., 2006). Istraživanja upućuju na povezanost ovog polimorfizma s autizmom, poremećajem pozornosti s hiperaktivnošću i drugim bihevioralnim problemima opaženim u dječjoj populaciji (Wang i sur., 2018; Gadow i sur., 2013).

Stoltenberg i sur. pokušali su utvrditi je li trialelni 5-HTTLPR polimorfizam povezan s učestalosti nastanka poremećaja prehrane u uzorku opće populacije te je li ta povezanost moderirana izloženosti traumatičnim iskustvima za vrijeme djetinjstva i/ili spolom ispitanika. Pokazali su kako su spomenuti traumatični doživljaji u većoj mjeri bili povezani s rizikom od razvoja poremećaja hranjenja u odrasloj dobi kod žena koje imaju jedan ili više alela povezanih s niskom ekspresijom transportera SERT (S i  $L_G$  aleli) (Stoltenberg i sur., 2012). Bonnet i sur. su u istraživanju o sposobnosti kontrole unosa hrane koristili bialelnu i trialelnu klasifikaciju 5-HTTLPR polimorfizma. Kod osoba s niskom transkripcijskom aktivnošću gena *SLC6A4* s većom sklonošću emocionalnom jedenju i koje su imale nisku sposobnost kontrole unosa

količine hrane, zabilježene su niže plazmatske koncentracije leptina, tzv. hormona sitosti (Bonnet i sur., 2017). Miranda i sur. u svojem su longitudinalnom istraživanju također koristili bialelnu i trialelnu klasifikaciju s ciljem utvrđivanja povezanosti navedenih polimorfizama s dnevnim unosom energije i antropometrijskim parametrima u djece praćene od rođenja sve do njihove osme godine. Ispitanici su evaluirani tijekom tri razvojne faze: nakon 1. godine, između 3. i 4. te između 7. i 8. godine života. U bialelnoj klasifikaciji, djeca S/S genotipa pokazala su višu ITM  $z$ -vrijednost u sve tri razvojne faze i veći zbroj kožnih nabora u dobi od 3. do 4. i 7. do 8. godine, u usporedbi s nositeljima alela L. U trialelnoj klasifikaciji, genotipovi S/S, S/L<sub>G</sub> i L<sub>G</sub>/L<sub>G</sub> povezani su s većim dnevnim unosom energije do 1. godine života te s većim opsegom struka u dobi od 3. do 4. godine (Miranda i sur., 2017). Utjecaj polimorfizma rs25531 na porođajnu masu novorođenčadi nedovoljno je ispitan. Mueller i sur. grupirali su novorođenčad prema razini transkripcijske aktivnosti gena *SLC6A4* u tri genotipske skupine te usporedili dobivene srednje vrijednosti porođajnih masa (L<sub>G</sub>/L<sub>G</sub>, S/L<sub>G</sub>, S/S: 3345 ± 433 g; S/L<sub>A</sub>, L<sub>A</sub>/L<sub>G</sub>: 3532 ± 437 g; L<sub>A</sub>/L<sub>A</sub>: 3501 ± 386 g). Skupine različitog genotipa nisu se statistički značajno razlikovale s obzirom na porođajnu masu novorođenčadi. Međutim, autori naglašavaju kako raspodjela genotipova unutar analiziranog uzorka ispitanika (N = 126) nije bila u tzv. Hardy-Weinbergovoj ravnoteži te kako bi dobivene rezultate trebalo tumačiti s oprezom (Mueller i sur., 2010).

### 1.4.3. Polimorfizam STin2

Intronski polimorfizam duljine STin2 nalazi se unutar drugog introna gena *SLC6A4*. Sastoji se od tandemskog ponavljanja nukleotidnog slijeda duljine 16 do 17 bp, a u ljudskoj populaciji identificirana su tri glavna alela, STin2.9, STin2.10 i STin2.12 koji sadrže 9, 10 te 12 kopija nukleotidnog slijeda, redom. Polimorfizam STin2 sudjeluje u regulaciji transkripcijske aktivnosti gena *SLC6A4* te je utvrđeno kako alel STin2.12 ima veću pojačivačku (engl. *enhancer*) ulogu u usporedbi s kraćim alelnim varijantama (STin2.9, STin2.10). Uzimajući u obzir kako STin2 polimorfna regija predstavlja vezno mjesto za transkripcijske faktore kao što su proteini CTCF (engl. *CCTC-binding factor*) i YB-1 (engl. *Y-box binding protein 1*), uočeno je kako bi određene promjene u primarnoj strukturi tandemskog slijeda također mogle utjecati na razinu transkripcije gena, s obzirom na to da bi promjena jednog ili više nukleotida unutar veznog mjesta za transkripcijske faktore mogla utjecati na afinitet i specifičnost njihovog vezanja (www.ncbi.nlm.nih.gov, b; Klenova i sur., 2004; Lovejoy i sur., 2003). Pored toga, sve je više dokaza o mogućem kombiniranom utjecaju STin2 i 5-HTTLPR

polimorfizma na ekspresiju transportera SERT, stoga se efekt navedenih polimorfizama vrlo često analizira istodobno (Ali i sur., 2010; Hranilović i sur., 2004).

Velik broj istraživanja bavi se mogućim genetičkim utjecajima, poput varijabilnog broja ponavljanja tandemskih sljedova, na pojavu pretilosti i posljedičnih komplikacija. Iako prvim ispitivanjem povezanosti polimorfizma STin2 i pretilosti, provedenom na uzorku turske populacije (N = 382), nije uočena njihova značajna poveznica (Uzun i sur., 2015), ostala istraživanja ukazuju na suprotno. Dias i sur. su među fizički neaktivnim pojedincima mlađe odrasle dobi i portugalskog podrijetla (N = 535) ustanovili povezanost alela STin2.10 s prekomjernom tjelesnom masom/pretilosti, dok je kombiniranom analizom dvaju *SLC6A4* polimorfizama, 5-HTTLPR i STin2, uočeno kako je haplotip L10 u velikoj mjeri povezan s većim iznosima tjelesne mase (Dias i sur., 2016). Na tragu toga, Manco i sur. zabilježili su sličan efekt STin2.10 alela na tjelesnu masu ženske djece u dobi od 3 do 11 godina, iako ne statistički značajan. Kombinirana analiza spomenutih *SLC6A4* polimorfizama djece ženskog spola upućuje na zaštitni učinak haplotipa S12 od nastanka pretilosti koji se očituje u vidu nižih vrijednosti ITM, ITM  $z$ -vrijednosti, opsega struka te omjera opsega struka i visine, u usporedbi s vrijednostima pretilih pojedinaca (Manco i sur., 2020). Povezanost polimorfizma STin2 i porođajne mase novorođenčadi dosad nije zabilježena.

Polimorfizam STin2 dovodi se u vezu s nizom psihopatoloških stanja poput opsesivno kompulzivnog poremećaja, shizofrenije, ali i depresije (Xu i sur., 2019; Gomes i sur., 2018; Kohen i sur., 2008; Ogilvie i sur., 1996). S obzirom na sve veći broj saznanja o komorbiditetu psihičkih i tjelesnih bolesti, sve se veća pažnja posvećuje proučavanju povezanosti depresije i pretilosti, dvama najčešćim poremećajima koji se javljaju poglavito u razvijenim zemljama. Kako su specifični dijelovi živčanog sustava uključeni u patofiziologiju pretilosti također poremećeni i u depresiji te s obzirom na to da se depresija često povezuje s povećanom razinom nakupljanja abdominalnog sala, razvojem metaboličkog sindroma i srodnih bolesti, nagađa se kako bi isti genski čimbenici mogli pridonijeti predispoziciji za oba poremećaja (Kabir i sur., 2006; Kishi i Elmquist, 2005).

Uzimajući u obzir kako prekomjerna tjelesna masa i pretilost uvelike doprinose riziku razvoja niza ozbiljnih zdravstvenih stanja poput kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti, dislipidemije, dijabetesa, depresije, ali i nekih vrsta tumora, identifikacija bioloških, genskih, okolišnih i ostalih čimbenika koji doprinose njihovom razvoju, s ciljem predviđanja njihovog nastanka, prevencije i liječenja, od iznimne je važnosti (Ogunbode i sur., 2011).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Osnovni cilj istraživanja bio je ispitati moguću povezanost polimorfizama gena *SLC6A4* s antropometrijskim karakteristikama novorođenčadi: porođajnom masom i duljinom te ponderalnim indeksom. Rastući trend prekomjerne tjelesne mase i pretilosti predstavlja jedan od najvećih javnozdravstvenih problema današnjice na globalnoj razini. Debljina, definirana kao prekomjerno nakupljanje masnog tkiva koje predstavlja rizik za zdravlje, povezuje se s povećanim mortalitetom te s različitim patološkim stanjima kao što su dijabetes tipa 2 i kardiovaskularne bolesti (who.int.; Musić Milanović i Bukal; 2018). Održavanje energijske ravnoteže organizma temeljna je biološka funkcija koja je regulirana složenim fiziološkim procesima. S obzirom na iznimno važan značaj funkcije serotonina koja obuhvaća kontrolu unosa hrane na razini središnjeg živčanog sustava, ali i izravnu regulaciju aktivnosti masnog tkiva na periferiji, upravo su serotoninski sustav i njegove sastavne komponente posljednjih desetljeća u fokusu brojnih znanstvenih istraživanja (El-Merahbi i sur., 2015; Namkung i sur., 2015). Pokazalo se kako se određeni polimorfizmi gena *SLC6A4*, koji kodira za serotoninski transporter, povezuju s različitom transkripcijskom aktivnošću navedenog gena te s podložnosti razvoja pretilosti i povezanih komorbiditeta (Trujillo-Hernández i Flores-Peña, 2021; Say 2017). U sklopu ovog istraživanja predviđena je izolacija genomske DNA iz tkiva posteljice te genotipizacija promotorskog polimorfizma duljine 5-HTTLPR i intronskog polimorfizma varijabilnog broja ponavljanja tandemskih sljedova STin2 pomoću lančane reakcije polimerazom, dok bi se genotipizacija polimorfizma zamjene pojedinačnih nukleotida rs25531 provela digestijom dobivenih 5-HTTLPR PCR produkata restrikcijom endonukleazom *MspI*. Uz to, predviđena je i provedba optimizacije metoda PCR i agarozne gel elektroforeze. Također, potrebno je provesti probir ispitanika s obzirom na definirane isključne kriterije, testirati genetičku ravnotežu analiziranog uzorka populacije, provjeriti povezanost potencijalno zbunjujućih varijabli s varijablama od interesa te usporediti skupine novorođenčadi različitih genotipova za polimorfizme 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 po porođajnoj masi i duljini te ponderalnom indeksu. Dobiveni rezultati mogli bi doprinijeti boljem razumijevanju uloge genetičkih čimbenika u regulaciji energetske ravnoteže organizma i razvoju pravovremenog sustava intervencije te prevencije nastanka potencijalnih negativnih posljedica na zdravlje u odrasloj dobi.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Uzorci i podaci o sudionicima

U istraživanje je uključeno 328 parova majki i novorođenčadi u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) IP-2018-01-6547 pod nazivom „*Utjecaj majčinog metaboličkog stanja na serotoninški sustav posteljice i neonatusa: od metilacije DNA do funkcije proteina*“, voditeljice prof. dr.sc. Jasminke Štefulj, u suradnji s Klinikom za ženske bolesti i porode Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Analizirani tip uzorka je tkivo posteljice, ukupno 328 uzoraka, prikupljeno s fetalne strane neposredno nakon poroda i pohranjeno u RNeasy<sup>®</sup> otopini na temperaturi od – 80 °C. Uzorci su sakupljeni u razdoblju od 2015. do 2021. godine.

Kako bi se izbjegle moguće varijacije u vremenu između poroda i uzorkovanja tkiva te potencijalan utjecaj različitog načina poroda na rezultate istraživanja, u obzir su uzeti samo uzorci posteljica jednoplodnih trudnoća prikupljeni nakon planiranog carskog reza. Nakon isključivanja po ostalim kriterijima: dijagnoza gestacijskog dijabetesa mellitusa, majčin pregestacijski ITM manji od 16, intrauterina restrikcija rasta (porođajna masa manja od 2400 g), i prijevremeni porođaj (gestacijska dob manja od 37 tjedana), ukupan broj uzoraka uključenih u analizu bio je: 187 uzoraka tkiva posteljice.

Za novorođenčad uključenu u istraživanje prikupljeni su klinički podaci i antropometrijske mjere kao što su spol, porođajna masa i porođajna duljina, ponderalni indeks (mjera uhranjenosti novorođenčeta koja se izračunava formulom: ponderalni indeks = (porođajna masa/(porođajna duljina)<sup>3</sup>) x 100) i gestacijska dob u trenutku porođaja.

Prikupljeni podaci majki uključenih u istraživanje obuhvaćali su broj dosadašnjih porođaja, starosna dob na dan porođaja, indeks tjelesne mase prije trudnoće i na kraju trudnoće te prirast tjelesne mase za vrijeme trudnoće.

Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom, a svi uključeni ispitanici potpisali su informirani pristanak. Odobrenje za analizu ljudskih uzoraka i provođenje istraživanja dobiveno je od Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Etičkog povjerenstva Instituta Ruđer Bošković.

### 3.1.2. Kemikalije i enzimi

Popis kemikalija i enzima korištenih u istraživanju prikazan je u Tablicama 2.–5.

Tablica 2. Kemikalije korištene za pripremu tkiva i izolaciju genomske DNA

Kemikalija	Proizvođač
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Qiagen
GeneElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, Merck Millipore
Etanol, 96 %	Gram-Mol
Voda tretirana dietilpirokarbonatom (DEPC)	Ambion, Thermo Fisher Scientific

Tablica 3. Kemikalije korištene u lančanoj reakciji polimerazom

Kemikalija	Proizvođač
AllTaq Master Mix Kit	Qiagen
5-HTTLPR F početnica, 10 $\mu$ M	Metabion
5-HTTLPR R početnica, 10 $\mu$ M	Metabion
5-HTT VNTR-17 STin2 F početnica, 10 $\mu$ M	Metabion
5-HTT VNTR-17 STin2 R početnica, 10 $\mu$ M	Metabion

Tablica 4. Enzimi i puferi korišteni prilikom digestije PCR produkata

Enzimi i puferi	Proizvođač
<i>Msp</i> I ( <i>Hpa</i> II) Restriction Enzyme, 10 U/ $\mu$ L	Thermo Fisher Scientific
Tango Buffer, 2x	Thermo Fisher Scientific

Tablica 5. Kemikalije korištene pri agaroznoj gel elektroforezi

Kemikalija	Proizvođač
Agarozna	Sigma-Aldrich, Merck Millipore
Tris(hidroksimetil)aminometan	Fluka AG, Honeywell Research Chemicals
Na <sub>2</sub> EDTA	Sigma-Aldrich, Merck Millipore
Ledena octena kiselina, 100 %	VWR Chemicals
Tris-acetat-EDTA (TAE) pufer, 20x	Za 500 mL: 48,456 g tris(hidroksimetil)aminometana i 3,722 g Na <sub>2</sub> EDTA otopiti u 350 mL destilirane vode, a zatim dodati 11,44 mL ledene octene kiseline i nadopuniti do 500 mL destiliranom vodom (pH između 8,0 i 8,6).
MIDORI <sup>Green</sup> Advance Safe DNA/RNA stain (boja za vizualizaciju nukleinskih kiselina)	Nippon Genetics Europe
Loading dye solution 6x (boja za unošenje uzoraka u gel i vizualizaciju njihove migracije u gelu)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific
DirectLoad <sup>TM</sup> 50 bp DNA Step Ladder (molekularna ljestvica)	Sigma-Aldrich, Merck Millipore
DirectLoad <sup>TM</sup> PCR 100 bp Low Ladder (molekularna ljestvica)	Sigma-Aldrich, Merck Millipore

### 3.1.3. Tehnička oprema

Popis tehničke opreme i uređaja korištenih u istraživanju prikazan je u Tablici 6.

Tablica 6. Popis korištene tehničke opreme i uređaja

Tehnička oprema	Proizvođač
Mikropipete i pripadajući nastavci	Eppendorf; Gilson
PCR pločice, 96 jažica	Eppendorf
UniTHERMIX 1 termoblok	LLG Labware
Mikrocentrifuga 5417 C	Eppendorf
Vortex 2 mješalica	IKA
Mini G mini-centrifuga	IKA
Analitička vaga, tri decimale	Acculab

<b>Tehnička oprema</b>	<b>Proizvođač</b>
Analitička vaga, dvije decimale	Ohyo
NanoPhotometer® N60	Implen
Sustav za horizontalnu gel elektroforezu	Cleaver Scientific
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences, General Electric
Alliance 4.7 uređaj za vizualizaciju rezultata agarozne gel elektroforeze	UVItec
PCR uređaj T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories
PCR uređaj, Thermal Cycler GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific
Laboratorijski inkubator	RO za proizvodnju medicinskih uređaja, Sutjeska

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolacija genomske DNA

Istraživanje provedeno u svrhu diplomskog rada ne obuhvaća postupak izolacije genomske DNA iz svih uzoraka tkiva posteljice kao ni mjerenje koncentracije svih izolata DNA. Korišteni su ranije izolirani uzorci DNA, osim za 12 uzoraka tkiva posteljice kod koji je izolacija i određivanje masene koncentracije DNA provedeno u sklopu ovog istraživanja. Genomska DNA iz tkiva posteljice izolirana je putem komercijalno dostupnog kompleta *GeneElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich).

#### 3.2.1.1. Priprema tkiva posteljice

Tkivo posteljice pohranjeno u RNAlater® otopini osuši se na filter-papiru te se ( $0,012 \pm 0,001$ ) g tkiva odvaže u plastičnu tubicu od 1,5 mL i dodatno usitni čistim, dezinficiranim škarama kako bi se olakšala daljnja homogenizacija uzorka. Tako pripremljeno tkivo može se odmah koristiti za izolaciju DNA ili se može pohraniti na temperaturi od  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljnjeg korištenja.



### 3.2.1.2. Postupak izolacije genomske DNA

Izolacija DNA provedena je prema protokolu proizvođača uz određene prilagodbe. Postupak je započet digestijom unaprijed pripremljenog tkiva posteljice (postupak opisan u poglavlju 3.2.1.1.) dodatkom 180  $\mu$ L otopine *Lysis solution T* u tubice s tkivom. Tkivo se zatim homogenizira tučkom, a u nastali homogenat doda se 20  $\mu$ L otopine proteinaze K, koncentracije 20 mg/mL. Nakon laganog protresanja i obaranja u centrifugi, uzorak se inkubira pri temperaturi od 55 °C uz 300 okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, rpm) sljedeća četiri sata. Nakon 90 minuta ponovi se homogenizacija, protresanje i obaranje, pri čemu je poželjno da uzorak bude što kraće izložen sobnoj temperaturi.

Nakon završetka inkubacije i potpune razgradnje tkiva, homogenat se protrese desetak sekundi i obori centrifugiranjem te se ostavi na sobnoj temperaturi kako bi se ohladio. Na ohlađeni homogenat doda se 20  $\mu$ L enzima *RNase A*, vrlo lagano se protrese kako bi se očuvala aktivnost enzima i inkubira minimalno dvije minute na sobnoj temperaturi. Konačna liza stanica provodi se dodatkom 200  $\mu$ L otopine *Lysis solution C*, snažnim protresanjem, obaranjem na centrifugi i inkubiranjem 10 minuta pri temperaturi od 70 °C i 450 rpm.

Kolone za selektivno vezanje nukleinskih kiselina postavljaju se u tubice za sakupljanje te se na njih nanese 500  $\mu$ L otopine *Column preparation solution*. Centrifugiranjem kolona tijekom jedne minute na 12 000 rcf (engl. *relative centrifugal force*, rcf), pri sobnoj temperaturi, provodi se deaeriranje, tj. uklanjanje zraka iz kolone te ih se priprema za daljnje apliciranje lizata. Tekućina koja je prošla kroz kolonu se odbaci, a kolonu se ponovno umetne u istu tubicu za sakupljanje.

U ohlađeni lizat sobne temperature doda se 200  $\mu$ L 96 %-tnog etanola te ga se snažno protrese desetak sekundi i obori u centrifugi. Tako pripremljeni lizat spreman je za nanošenje na kolonu. Cjelokupni volumen lizata pipetom se prenese na kolonu koju se zatim centrifugira jednu minutu na 10 000 rcf, pri sobnoj temperaturi. Tekućina koja je prošla kroz kolonu se odbaci, a kolonu se ponovno umetne u istu tubicu za sakupljanje.

Prvim ispiranjem s kolone se uklanja sve što nije DNA kao što su primjerice RNA i proteini, odnosno, ostaci njihove razgradnje te lipopolisaharidi, a provodi se dodatkom 500  $\mu$ L otopine za ispiranje (engl. *wash solution*) koja je prethodno pripremljena otapanjem koncentrata *Wash solution concentrate* u 80 mL 96 %-tnog etanola. Kolona se centrifugira jednu minutu na 10 000 rcf, pri sobnoj temperaturi. Tekućina koja je prošla kroz kolonu se odbaci, a kolonu se ponovno umetne u istu tubicu za sakupljanje. Drugo ispiranje kolone provodi se na sličan način,

dodatkom jednakog volumena otopine za ispiranje, a kolona se centrifugira tri minute na 16 100 rcf, pri sobnoj temperaturi. Kolona se zatim stavlja u novu tubicu za sakupljanje te se provodi tzv. „suho centrifugiranje“ tijekom jedne minute na 16 100 rcf, pri sobnoj temperaturi, bez prethodnog dodavanja otopine za ispiranje. Na taj se način osigurava potpuno uklanjanje eventualnih zaostataka etanola s kolone.

Nakon što se kolona premjesti u epruvetu za sakupljanje prvog eluata, elucija DNA započinje nanošenjem 200  $\mu\text{L}$  otopine *Elution solution* u središnji dio kolone. Po isteku 10-minutne inkubacije na sobnoj temperaturi, kolona se centrifugira jednu minutu na 6 500 rcf. Dobiveni eluat DNA odmah se stavlja u led te je spreman za daljnju spektrofotometrijsku analizu.

Dodatnim ispiranjem kolone na isti način dobiva se i drugi eluat DNA. Oba eluata podvrgnuta su spektrofotometrijskoj analizi, a samo su radne otopine prvog eluata korištene u daljnjim PCR analizama, dok su radne otopine drugog eluata pohranjene na temperaturi od  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.1.3. Mjerenje masene koncentracije izolata DNA

Eluati izolirane DNA podvrgnuti su UV-Vis spektrofotometrijskoj analizi (NanoPhotometer<sup>®</sup> N60, Implen) kojom je utvrđena masena koncentracija DNA ( $c$ ) svakog pojedinog uzorka mjerenjem apsorbancije ( $A$ ) na 260 nm, prema Beer-Lambertovom zakonu

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot l}$$

gdje je  $\epsilon$  molarni koeficijent apsorpcije, a  $l$  debljina sloja uzorka kroz kojeg prolazi svjetlost (Atkins i sur., 2018). Stupanj čistoće DNA izolata utvrđen je na temelju omjera izmjerene  $A$  na 260 i 280 nm. Prihvatljive vrijednosti kretale su se u rasponu od 1,6 do 2,0. Mjerenje apsorbancije svakog pojedinog uzorka izvedeno je dva puta.

Nakon utvrđivanja masene koncentracije izolata DNA pripremljene su radne otopine izolata koncentracije 40 ng/ $\mu\text{L}$  razrjeđivanjem odgovarajućeg volumena osnovne otopine ( $V_1$ ) poznate masene koncentracije ( $c_1$ ), prema formuli

$$V_1 = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1}$$

gdje je  $c_2$  željena masena koncentracija radne otopine izolata DNA (40 ng/ $\mu$ L) volumena  $V_2$  (100  $\mu$ L).

### 3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) široko je rasprostranjena laboratorijska tehnika koja se koristi za višestruko umnažanje točno ciljanih fragmenata DNA (Lodish i sur., 2003). Umnažanje željenih polimorfničkih regija provedeno je pomoću komercijalno dostupnog kompleta *AllTaq Master Mix Kit* (Qiagen) i odgovarajućih parova početnica. PCR protokol korišten za genotipizaciju promotorskog polimorfizma 5-HTTLPR/rs25531 i intronskog polimorfizma STin2 preuzet je iz literature (Blažević i sur., 2017; Hranilović i sur., 2000) uz određene izmjene. PCR reakcijska smjesa sastoji se od odgovarajućih volumena *AllTaq Master Mix*-a, sterilne vode bez nukleaza, radne otopine DNA (40 ng/ $\mu$ L) te uzvodnih (engl. *forward primer*, F) i nizvodnih (engl. *reverse primer*, R) početnica (Tablica 7.) o kojima ovisi koji će se dio DNA umnožiti.

U svrhu kontrole praćenja moguće pojave kontaminacije i prevencije očitavanja pogrešnih rezultata, prilikom svakog PCR eksperimenta uobičajeno je korištenje negativne kontrole ( $C^-$ ), u čiju se PCR reakcijsku smjesu, umjesto uzorka DNA, dodaje jednaka količina vode bez nukleaza. Iz tog razloga, kod negativne kontrole ne očekuje se pojava vrpce prilikom vizualizacije rezultata gel elektroforeze, dok bi njezina eventualna pojava ukazivala na moguću kontaminaciju korištenih reagenasa, pribora ili radne okoline.

Tablica 7. Prikaz korištenih parova početnica

Oznaka polimorfizma	Orijentacija početnice	Sekvenca početnice 5'→3'	Referenca
5-HTTLPR (rs25531)/rs25532	F	CTCCCTGTACCCCTCCTAGG	Blažević i sur., 2017
	R	TGCAAGGAGAATGCTGGAG	
STin2	F	GTCAGTATCACAGGCTGCGAG	
	R	TGTTCCCTAGTCTTACGCCAGTG	

### 3.2.2.1. Genotipizacija polimorfizma 5-HTTLPR

Genotipizacija polimorfizma 5-HTTLPR provedena je umnažanjem promotorske polimorfne regije gena koji kodira za serotoninški transporter. Razlikuju se dvije uobičajene varijante, kratka (engl. *short*, S), koja ne sadrži insert duljine 44 bp, i duga (engl. *long*, L) koja ga sadrži i čiji će PCR ampliconi na agaroznom gelu posljedično putovati sporije (Heils i sur., 2002). U Tablici 8. navedeni su mogući genotipovi s odgovarajućim očekivanim duljinama umnoženih fragmenata DNA.

Tablica 8. Obrasci umnažanja u genotipizaciji polimorfizma 5-HTTLPR

Genotip	Očekivane duljine fragmenta DNA (pb)
S/S	250
S/L	250 i 293
L/L	293

#### 3.2.2.1.1. Optimizacija metode

Ispitan je učinak različitih parametara na efikasnost reakcije umnažanja korištene za genotipizaciju polimorfizma 5-HTTLPR te su određene najpovoljnije postavke metode variranjem sljedećih parametara: tip tkiva iz kojeg je izolirana DNA, količina DNA korištena u PCR reakciji, različiti uređaji i uvjeti umnažanja, uz dodatnu kontrolu stabilnosti korištenih reagenasa. Sastav korištene PCR reakcijske smjese naveden je u Tablici 9., dok su konačni uvjeti umnažanja korišteni za genotipizaciju polimorfizma 5-HTTLPR navedeni u Tablici 10.

Tablica 9. Sastav PCR reakcijske smjese za genotipizaciju 5-HTTLPR polimorfizma

Sastav reakcijske smjese	Volumen ( $\mu\text{L}$ ) jedne reakcije	Početna koncentracija	Konačna koncentracija
AllTaq Master Mix	6,25	4x	1x
5-HTTLPR F primer	0,625	10 $\mu\text{M}$	0,25 $\mu\text{M}$
5-HTTLPR R primer	0,625	10 $\mu\text{M}$	0,25 $\mu\text{M}$
Radna otopina DNA	1,0	40 ng/ $\mu\text{L}$	1,6 ng/ $\mu\text{L}$
Voda bez nukleaza	16,5		
<b>Ukupan volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>25,0</b>		

Tablica 10. Uvjeti umnažanja za genotipizaciju polimorfizma 5-HTTLPR

Korak	Temperatura (°C)	Trajanje	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95	2 min	1
Denaturacija	95	5 sek	10
Vežanje početnica	71-61	15 sek	
Elongacija	72	30 sek	
Denaturacija	95	5 sek	30
Vežanje početnica	61	15 sek	
Elongacija	72	30 sek	
Završna elongacija	72	10 min	1
Inkubacija	4	∞	1

### 3.2.2.2. Genotipizacija polimorfizma STin2

Genotipizacija polimorfizma STin2 provedena je umnažanjem polimorfne regije introna 2 gena koji kodira za serotoninški transporter. Razlikuju se tri varijante koje sadrže 9, 10 ili 12 kopija inserta duljine 16 ili 17 bp (Lesch i sur., 1994). Amplikoni nastali umnažanjem ciljane polimorfne regije razdvajaju se uz pomoć agarozne gel elektroforeze na temelju njihove duljine, tj. brzine putovanja kroz agarozni gel. U Tablici 11. navedeni su mogući genotipovi s odgovarajućim očekivanim duljinama umnoženih fragmenata DNA.

Tablica 11. Obrasci umnažanja u genotipizaciji polimorfizma STin2

Genotip	Očekivane duljine fragmenta DNA (pb)
10/10	266
10/12	266 i 299
12/12	299
9/12	249 i 299
9/10	249 i 266
9/9	249

Sastav korištene PCR reakcijske smjese naveden je u Tablici 12., dok su uvjeti umnažanja korišteni za genotipizaciju polimorfizma STin2 navedeni u Tablici 13.

Tablica 12. Sastav PCR reakcijske smjese za genotipizaciju intronskog polimorfizma STin2

Sastav reakcijske smjese	Volumen ( $\mu\text{L}$ ) jedne reakcije	Početna koncentracija	Konačna koncentracija
AllTaq Master Mix	3,8	4x	1x
5-HTT VNTR-17 STin2 F primer	0,38	10 $\mu\text{M}$	0,25 $\mu\text{M}$
5-HTT VNTR-17 STin2 R primer	0,38	10 $\mu\text{M}$	0,25 $\mu\text{M}$
Radna otopina DNA	1,0	40 ng/ $\mu\text{L}$	2,7 ng/ $\mu\text{L}$
Voda bez nukleaza	9,5		
<b>Ukupan volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>15,0</b>		

Tablica 13. Uvjeti umnažanja za genotipizaciju polimorfizma STin2

Korak	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Trajanje	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95	2 min	1
Denaturacija	95	5 sek	45
Vežanje početnica	58	15 sek	
Elongacija	72	10 sek	
Završna elongacija	72	10 min	1
Inkubacija	4	$\infty$	1

### 3.2.3. Digestija restrikcijskom endonukleazom *MspI* za genotipizaciju polimorfizma rs25531

Genotipizacija polimorfizma rs25531 provedena je digestijom PCR produkata preostalih nakon umnažanja i agarozne gel elektroforeze za genotipizaciju polimorfizma 5-HTTLPR, putem restrikcijske endonukleaze *MspI*. Svi ampliconi PCR reakcije za genotipizaciju polimorfizma 5-HTTLPR sadrže barem jedno restrikcijsko mjesto ( $C^{\wedge}CGG$ ), dok L varijante, s insertom duljine 44 pb, mogu imati dodatno restrikcijsko mjesto unutar inserta. U slučaju određene varijante polimorfizma pojedinačnog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) koja na poziciji šestog nukleotida unutar inserta umjesto

adenina ( $L_A$ ) sadrži gvanin ( $L_G$ ), dolazi do dodatnog cijepanja L amplikona (Hu i sur., 2006). Na temelju dobivenog obrasca restrikcijskih fragmenata u agaroznoj gel elektroforezi, moguće je razlikovati  $L_A$  i  $L_G$  varijante. U Tablici 14. navedeni su mogući genotipovi s odgovarajućim očekivanim duljinama pocijepanih fragmenata DNA.

Tablica 14. Obrasci cijepanja u genotipizaciji polimorfizma rs25531

Genotip	Očekivane duljine fragmenta DNA (pb)
S/S	36 i 211
S/ $L_A$	36, 211 i 255
$L_A/L_A$	36 i 255
$L_A/L_G$	36, 83, 172 i 255
S/ $L_G$	36, 83, 172, 211

Reakcijska smjesa korištena za digestiju sastojala se od odgovarajućih volumena Tango pufera, restrikcijske endonukleaze *MspI*, sterilne vode bez nukleaza te odabranih PCR amplikona (heterozigota i homozigota za varijantu L) (Tablica 15.). Reakcija restrikcije odvijala se preko noći (otprilike 17 sati), na 37 °C u laboratorijskom inkubatoru.

Tablica 15. Sastav restrikcijske smjese za genotipizaciju polimorfizma rs25531

Sastav reakcijske smjese	Volumen ( $\mu$ L) jedne reakcije	Početna koncentracija
Tango pufer	2,0	2x
<i>MspI</i> enzim	1,5	10 U/ $\mu$ L
Voda bez nukleaza	1,5	
PCR produkt	15,0	
<b>Ukupan volumen (<math>\mu</math>L)</b>	<b>20,0</b>	

### 3.2.4. Agarozna gel elektroforeza

Agarozna gel elektroforeza je laboratorijska tehnika koja se koristi za razdvajanje električki nabijenih makromolekula poput DNA na temelju njihove veličine i naboja, pod

djelovanjem primijenjenog električnog polja. Molekule DNA negativno su nabijene i putuju prema pozitivno nabijenoj elektrodi, a upotrebom fluorescentnih boja omogućava se njihova vizualizacija prilikom izlaganja zračenju odgovarajuće valne duljine. Manji fragmenti DNA na gelu migriraju brže od onih većih te dolazi do njihovog razdvajanja, a njihova veličina može se odrediti usporedbom njihove migracije s migracijom standarda poznate veličine (ljestvica DNA) (Berg i sur., 2015). Agarozna gel elektroforeza korištena je u svrhu određivanja kvalitete izolata genomske DNA, provjere specifičnosti i uspješnosti umnažanja PCR amplikona te za razdvajanje fragmenata DNA nakon restrikcije i određivanje njihove veličine.

Agarozni gel priprema se u staklenoj tikvici postepenim otapanjem agaroze u odgovarajućem volumenu TAE pufera, pri povišenoj temperaturi. Udio agaroze u TAE puferu za genotipizaciju 5-HTTLPR iznosio je 2,5 %, za genotipizaciju STin2 i rs25531 bio je 3 %, a za provjeru kvalitete izolata DNA iznosio je 0,8 %. Dobivena otopina agaroze ohladi se na 50 °C te joj se, prije nego što nastupi polimerizacija gela, doda propisani volumen boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina, MIDORI<sup>Green</sup>, za koju je valna duljina ekscitacijskog zračenja od 290 nm do 490 nm, a emisijskog 530 nm. Omjer MIDORI<sup>Green</sup> boje i otopine agaroze u TAE puferu za PCR produkte iznosio je 1 µL : 21,25 mL, za produkte restrikcije bio je 1 µL : 10,62 mL, a za izolate DNA iznosio je 1 µL : 27,5 mL. Nakon toga otopina se izlije u plastični kalup s pripremljenim češljevima za jažice i ostavi desetak minuta kako bi se formirao gel pri čemu se pazilo da debljina gela ne iznosi više od 3 mm. Stvrdnuti gel uroni se u pufer, pažljivo se ukloni češalj, a u jažice se nanese uzorci (od 5,0 do 15,0 µL). Prilikom određivanja kvalitete izolata genomske DNA, u 2,0 µL izolata DNA prije stavljanja na gel dodano je 0,5 µL boje za unošenje uzoraka u gel i vizualizaciju njihove migracije (engl. *Loading dye*, 6x) i 2,5 µL DEPC vode (ukupni volumen u jažici iznosio je 5,0 µL). Kao standard korištena je ljestvica DNA od 50 ili 100 pb (5,0 µL). Uvjeti elektroforeze (Tablica 16.), kao što su napon i duljina trajanja, ovisili su o tipu nanesenih uzoraka i postotku agaroze u gelu. Vizualizacija fragmenata DNA provedena je putem UV transiluminatora s emisijom UV zračenja valne duljine 312 nm, što je unutar ekscitacijskog spektra za MIDORI<sup>Green</sup> boju, a gelovi su fotografirani digitalnom kamerom povezanom s računalom (Alliance 4.7, UVitec).



Tablica 16. Uvjeti agarozne gel elektroforeze

Faza	Uvjet	Izolat genomske DNA	5-HTTLPR	STin2	rs25531
1	Trajanje (min)	30	45	10	75
	Napon (V)	60	80	60	80
2	Trajanje (min)	-	-	65	-
	Napon (V)	-	-	80	-

### 3.2.4.1. Optimizacija metode

Analiziran je učinak različitih parametara na kvalitetu rezultata agarozne gel elektroforeze te su određene najpovoljnije postavke metode ispitivanjem sljedećih parametara: količina boje u agaroznom gelu, postotak agaroze u gelu, bojanje gela prije elektroforeze (engl. *pre-staining*) te bojanje gela nakon elektroforeze (engl. *post-staining*).

### 3.2.5. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je program GraphPad Prism 8.3.0. (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD). Otkrivanje stršćih vrijednosti (engl. *outliers*) provedeno je pomoću metode ROUT, dok je normalnost distribucije podataka provjerena D'Agostino-Pearson testom. Za nenormalno distribuirane kontinuirane varijable prikazane su vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona, a za normalno distribuirane srednja vrijednost i standardna devijacija. Kategorijske varijable prikazane su apsolutnim vrijednostima i učestalošću u ukupnoj populaciji. Razlike u kontinuiranim varijablama između muške i ženske spolne skupine ispitane su nesparenim studentovim t-testom za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney testom za nenormalno distribuirane podatke. Razlike u kategorijskim varijablama ispitane su Fischer-ovim egzaktnim testom i Hi-kvadrat testom. Testiranje genetičke ravnoteže u analiziranoj populaciji s obzirom na Hardy-Weinbergov model ravnoteže provedeno je Hi-kvadrat testom. Povezanost antropometrijskih karakteristika novorođenčadi s kontinuiranim potencijalno zbunjujućim varijablama analizirana je korelacijom po Pearsonu za normalno distribuirane varijable ili korelacijom po Spearmanu za nenormalno distribuirane varijable, dok je u slučaju kategorijske potencijalno zbunjujuće varijable, ovisno o normalnosti

distribucije, korišten studentov t-test ili Mann-Whitney test. Razlike u kontinuiranim varijablama između skupina određenog genotipa analizirane su jednosmjernim ANOVA testom (uz korekciju za višestruka testiranja po Tukey-u) za normalno distribuirane podatke ili Kruskal-Wallis testom (uz korekciju za višestruka testiranja po Dunn-u) kod nenormalne distribucije podataka, dok je u slučaju kategorijske varijable korišten Hi-kvadrat test. U slučaju premalog broja sudionika u skupni određenog genotipa ( $N = 0$ ), provedena je dodatna analiza koja je uključivala samo skupine sa zadovoljavajućim brojem sudionika ( $N > 0$ ). Prag statističke značajnosti postavljen je na 0,05.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Demografske i kliničke karakteristike uzorka

Demografski i klinički parametri te raspodjela genotipova istraživane populacije s obzirom na spol novorođenčeta prikazani su u Tablici 17.

Tablica 17. Karakteristike istraživane populacije (N = 187) s obzirom na spol novorođenčeta

Karakteristika	Ženska novorođenčad (N = 80)	Muška novorođenčad (N = 107)	p-vrijednost
<b>MAJKE</b>			
Dob pri porodu, godine	33,82 ± 4,90	33,13 ± 5,34	0,353 <sup>1</sup>
Prvorotkinje / višerotkinje, N (%)	32 (40,0) / 48 (60,0)	42 (39,3) / 65 (60,7)	>0,999 <sup>2</sup>
Pregestacijski indeks tjel. mase, kg m <sup>-2</sup>	22,07 [21,00 – 24,61]	22,89 [20,90 – 26,45]	0,292 <sup>3</sup>
Prirast mase u trudnoći, kg	14,4 ± 5,1	15,0 ± 5,9	0,475 <sup>1</sup>
<b>NOVOROĐENČAD</b>			
Gestacijska dob pri porodu, tjedni	39,2 ± 0,9	39,4 ± 0,8	0,090 <sup>1</sup>
Porođajna masa, g	3328,0 ± 412,6	3604,10 ± 479,1	<0,0001 <sup>1</sup>
Porođajna duljina, cm	48,9 ± 1,6	50,5 ± 1,9	<0,0001 <sup>1</sup>
Ponderalni indeks, g cm <sup>-3</sup>	2,83 ± 0,21	2,79 ± 0,23	0,2631 <sup>1</sup>
<b>Polimorfizam 5-HTTLPR</b>			
Genotipovi, N (%)	S/S	16 (20,0)	0,166 <sup>4</sup>
	S/L	30 (37,5)	
	L/L	34 (42,5)	
Aleli, N (%)	S	62 (38,8)	0,749 <sup>2</sup>
	L	98 (61,2)	
<b>Polimorfizam rs25531</b>			
Genotipovi, N (%)	S/S	16 (20,0)	0,339 <sup>4</sup>
	S/L <sub>G</sub>	2 (2,5)	
	S/L <sub>A</sub>	28 (35,0)	
	L <sub>G</sub> /L <sub>G</sub>	0 (0,0)	
	L <sub>A</sub> /L <sub>G</sub>	6 (7,5)	
	L <sub>A</sub> /L <sub>A</sub>	28 (35,0)	
Aleli, N (%)	S	62 (38,8)	0,925 <sup>4</sup>
	A	90 (56,2)	
	G	8 (5,0)	
<b>Polimorfizam STin2</b>			
Genotipovi, N (%)	12/12	30 (37,5)	0,239 <sup>4</sup>
	12/10	34 (42,5)	
	10/10	14 (17,5)	
	12/9	2 (2,5)	
	10/9	0 (0,0)	
	12	96 (60,0)	
Aleli, N (%)	10	62 (38,8)	0,448 <sup>4</sup>
	9	2 (1,2)	
	7	7 (3,3)	

Za nenormalno distribuirane kontinuirane varijable prikazane su vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona, a normalno distribuirane kontinuirane varijable prikazane su srednjom vrijednošću i standardnom devijacijom. Za kategorijske varijable prikazane su apsolutne vrijednosti (broj sudionika, N) i učestalosti u ukupnoj populaciji (%). Statistički značajne p-vrijednosti masno su otisnute.

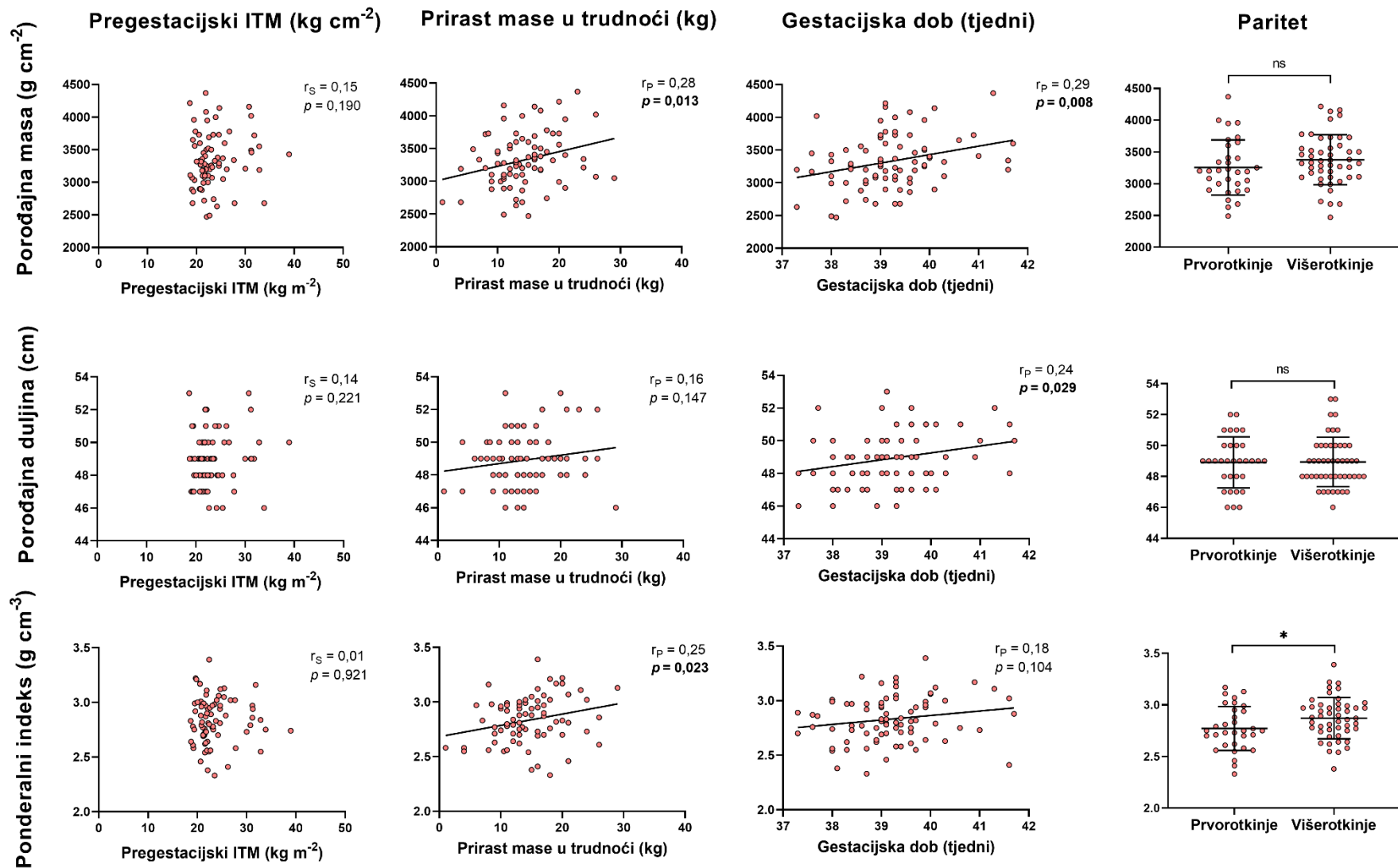
<sup>1</sup> Nespareni studentov t-test, <sup>2</sup> Fischerov egzaktni test, <sup>3</sup> Mann-Whitney test, <sup>4</sup> Hi-kvadrat test.

Karakteristike 187 sudionika uključenih u ovo istraživanje prikazane su u Tablici 17. Istraživani populacijski uzorak uključivao je 80 (42,7%) ženske i 107 (57,3%) muške novorođenčadi te su zbog raspodjele po spolu koja nije bila u potpunosti jednolika sve naknadne analize provedene u svakoj spolnoj skupini zasebno. Kod varijabli od interesa (antropometrijske karakteristike djeteta i genotip) koje se nisu statistički značajno razlikovale između muške i ženske novorođenčadi, dodatno su provedene i analize u ukupnom uzorku. Specifično, analiza povezanosti ponderalnog indeksa s genotipom kao i odstupanja opaženih od očekivanih frekvencija genotipova provedene su zasebno u svakoj spolnoj skupini te u ukupnom uzorku. Vrijednosti antropometrijskih parametara novorođenčeta: porođajne mase, duljine i ponderalnog indeksa, bile su normalno distribuirane i u skladu s hrvatskim prosjekom (Kolčić i sur., 2005; Roje i sur., 2004). Ženska i muška novorođenčad nisu se statistički značajno razlikovala po dobi majke pri porodu, paritetu majki, pregestacijskom ITM majki, prirastu mase majki u trudnoći, gestacijskoj dobi novorođenčadi pri porodu te ponderalnom indeksu. S druge strane, u porođajnoj masi i duljini opažena je statistički značajna razlika ovisna o spolu. Razlika u porođajnoj masi i duljini između ženske i muške djece nije bila statistički značajna kada su te vrijednosti izražene putem ponderalnog indeksa, odnosno, statusa uhranjenosti novorođenčeta.

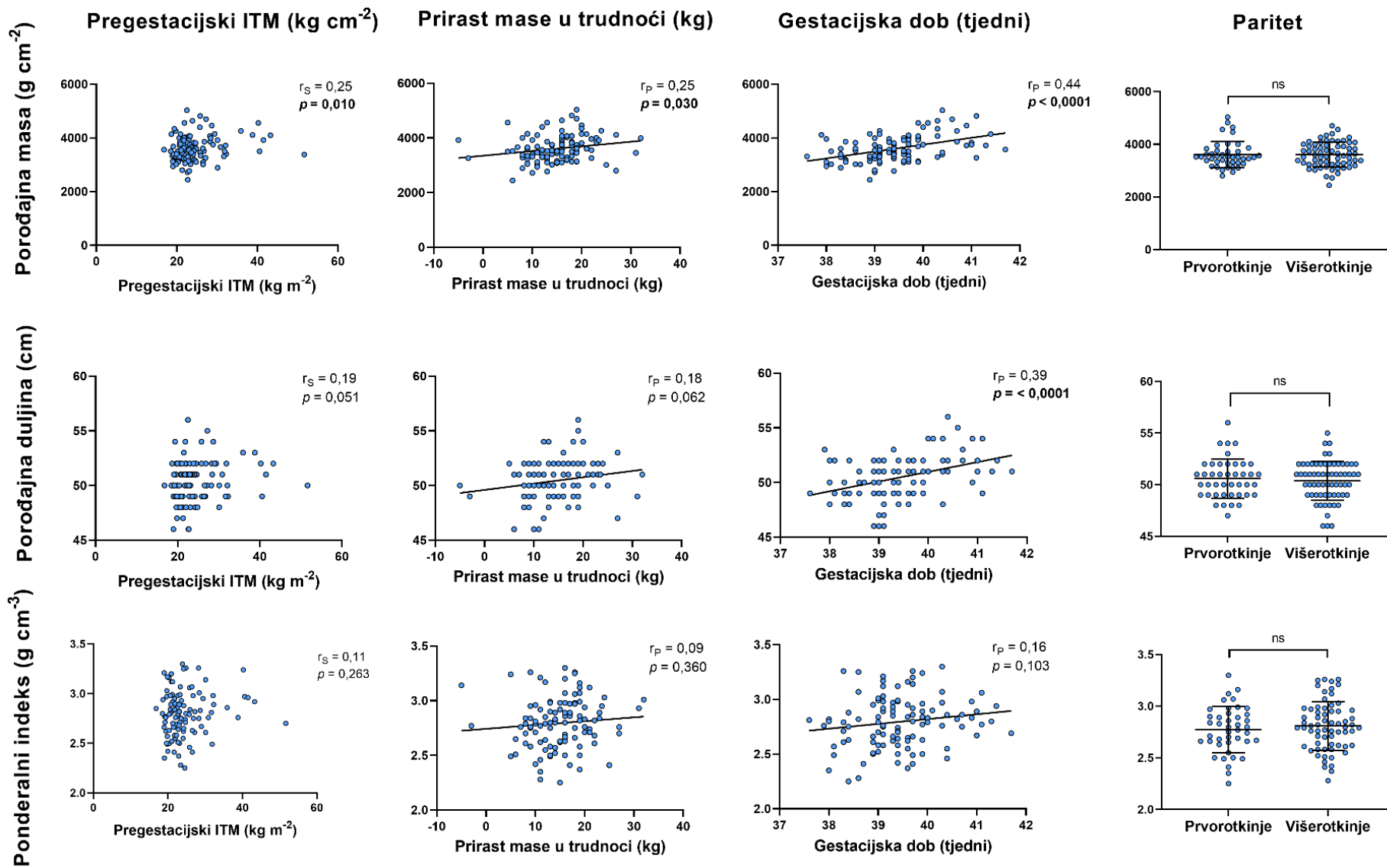
#### **4.1.1. Povezanost majčinih i djetetovih karakteristika s antropometrijskim karakteristikama novorođenčeta**

Kako bi se provjerio utjecaj potencijalno zbunjujućih varijabli majke i novorođenčeta: majčinog pregestacijskog ITM, prirasta mase u trudnoći, pariteta te gestacijske dobi novorođenčeta, na antropometrijske karakteristike novorođenčeta, provedene su analize u kojima su korelirane antropometrijske karakteristike novorođenčeta s navedenim potencijalno zbunjujućim varijablama, zasebno u svakoj spolnoj skupini novorođenčadi. U slučaju pariteta uspoređene su prvoroćkinje i višeroćkinje, s obzirom na antropometrijske karakteristike novorođenčeta, zasebno u svakoj spolnoj skupini novorođenčadi. Kod ženske novorođenčadi opažena je statistički značajna povezanost porođajne mase s prirastom majčine mase u trudnoći te s gestacijskom dobi, kao i značajna povezanost porođajne duljine s gestacijskom dobi te ponderalnog indeksa sa svim potencijalno zbunjujućim varijablama, osim s majčinim pregestacijskim ITM (Slika 3A.). Porođajna masa muške novorođenčadi bila je značajno povezana sa svim potencijalno zbunjujućim varijablama, osim s paritetom, dok je porođajna duljina muške novorođenčadi bila povezana samo s gestacijskom dobi. Ponderalni indeks nije bio statistički značajno povezan ni s jednom od zbunjujućih varijabli (Slika 3B.).

A. ŽENSKA NOVOROĐENČAD (N = 80)



B. MUŠKA NOVOROĐENČAD (N = 107)



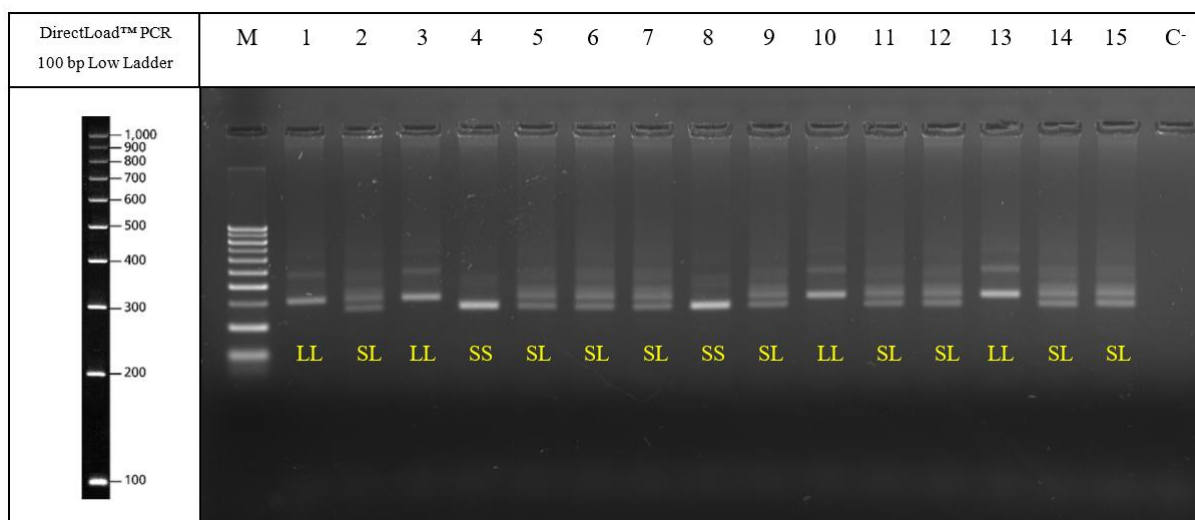
Slika 3. Povezanost pregestacijskog ITM, prirasta mase u trudnoći, pariteta i gestacijske dobi, prikazanih na osi x, s antropometrijskim karakteristikama novorođenčeta (porođajna masa i duljina te ponderalni indeks), prikazanima na osi y, kod (A) ženske i (B) muške novorođenčadi. Točke na grafu predstavljaju pojedine sudionike pri čemu su muški i ženski sudionici (novorođenčad) prikazani različitom bojom. Normalno distribuirane varijable analizirane su korelacijom po Pearsonu, a nenormalno korelacijom po Spearmanu. ITM, indeks tjelesne mase; ns, engl. *non-significant*,  $r_P$ , Pearsonov koeficijent korelacije;  $r_S$ , Spearmanov koeficijent korelacije. Statistički značajne vrijednosti su podebljane.

#### **4.2. Genotipizacija polimorfizama 5-HTTLPR, rs25531, STin2**

Genotipizacija polimorfizama 5-HTTLPR i STin2 provedena je PCR metodom prema uvjetima navedenima u Tablicama 9., 10., 12. i 13., a polimorfizma rs25531 digestijom 5-HTTLPR PCR amplikona restriksijskom endonukleazom *MspI* prema uvjetima navedenima u Tablici 15. Specifičnost i uspješnost umnažanja PCR amplikona provjerena je agaroznom gel elektroforezom čiji su sastav i uvjeti navedeni u Tablici 16. Genotip uzoraka određen je očitavanjem duljine PCR amplikona uspoređujući ih s DNA ljestvicom. Interpretaciju rezultata genotipiziranja provele su i potvrdile najmanje dvije osobe.

##### **4.2.1. 5-HTTLPR**

Duljine PCR amplikona pojedinih 5-HTTLPR genotipova prikazane su u Tablici 8., dok je reprezentativni rezultat elektroforeze 5-HTTLPR PCR amplikona na 2,5 %-tnom agaroznom gelu prikazan na Slici 4. Homozigotni uzorci genotipa S/S imaju dvije kopije S kalupa duljine 250 bp, dok uzorci L/L genotipa imaju dvije kopije L kalupa duljine 293 bp. Heterozigotni uzorci genotipa S/L imaju po jednu kopiju S i L kalupa, tj. na agaroznoj gel elektroforezi vidljive su dvije vrpce duljina 250 i 293 bp.

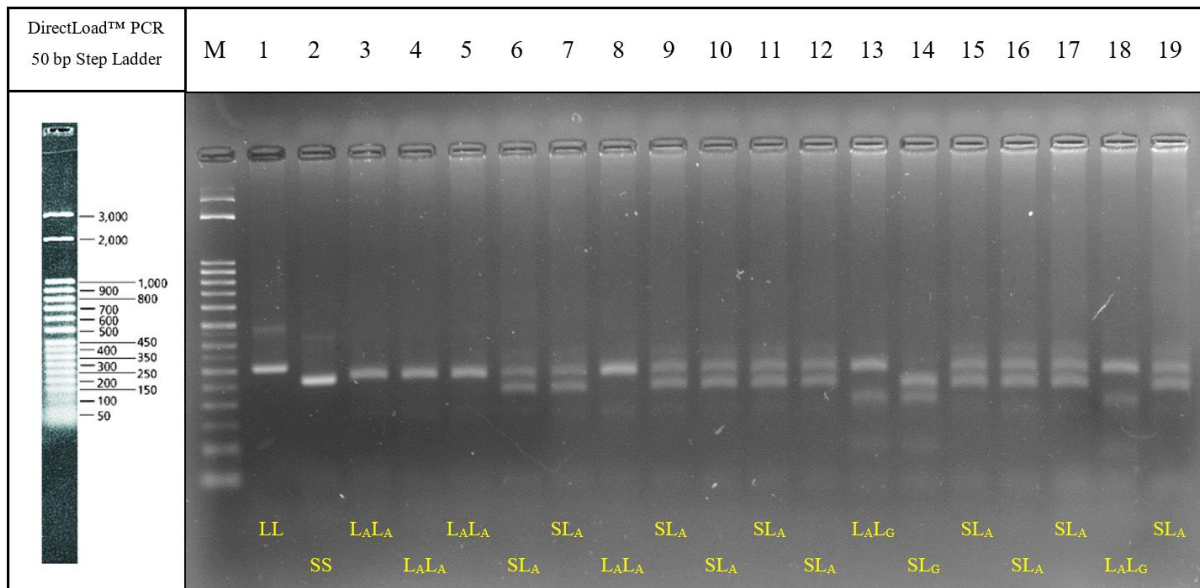


Slika 4. Prikaz 2,5%-tne agarozne gel elektroforeze PCR amplikona korištenih za genotipizaciju polimorfizma 5-HTTLPR. M = DNA ljestvica (DirectLoad™ PCR 100 bp Low Ladder), linije 1-15 = uzorci, C<sup>-</sup> = negativna kontrola. Pripadajući 5-HTTLPR genotip (S/S, S/L, L/L) naznačen je za svaki uzorak.

#### 4.2.2 rs25531

Tri alela rs25531 polimorfizma, S, L<sub>A</sub>, L<sub>G</sub>, daju šest mogućih kombinacija parova alela, tj. šest genotipova: S/S, S/L<sub>A</sub>, S/L<sub>G</sub>, L<sub>A</sub>/L<sub>A</sub>, L<sub>A</sub>/L<sub>G</sub> i L<sub>G</sub>/L<sub>G</sub>. Duljine produkata restrikcijske digestije pojedinih rs25531 genotipa prikazane su u Tablici 14., dok je reprezentativni prikaz elektroforeze produkata restrikcijske digestije na 3 %-tnom agaroznom gelu prikazan na Slici 5. Uz produkte restrikcijske digestije, na agarozni gel naneseni su i nedigestirani 5-HTTLPR PCR ampliconi L/L i S/S genotipa koji su korišteni kao referentni uzorci.

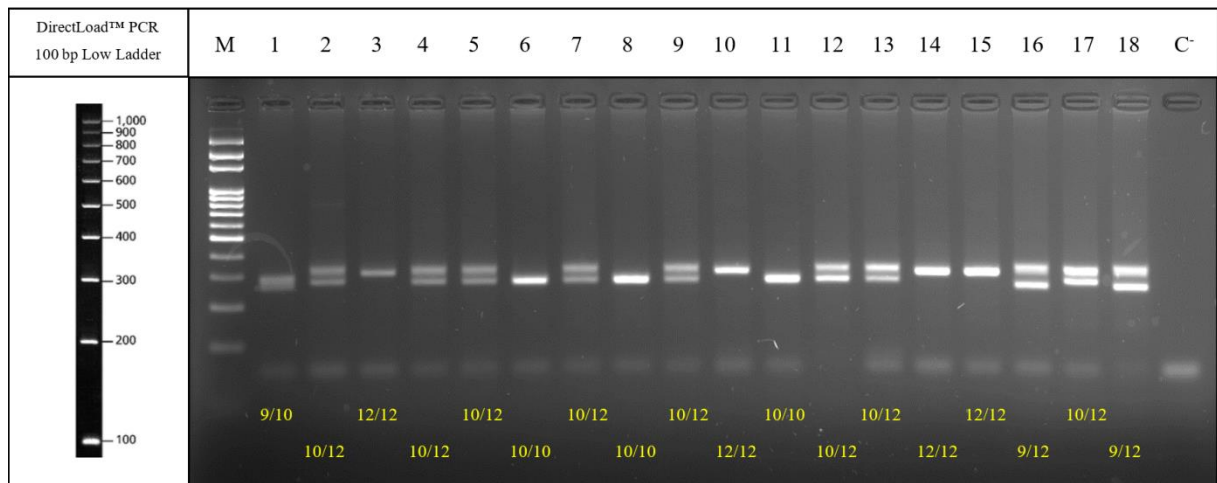




Slika 5. Prikaz 3%-tne agarozne gel elektroforeze 5-HTTLPR PCR amplikona i produkata restrikcijske digestije korištenih za genotipizaciju polimorfizma rs25531. M = DNA ljestvica (DirectLoad™ PCR 50 bp DNA Step Ladder), linije 1 i 2 = nedigestirani 5-HTTLPR PCR ampliconi LL i SS genotipa, linije 3-19 = produkti restrikcije. Pripadajući rs25531 genotip (S/S, S/L<sub>A</sub>, S/L<sub>G</sub>, L<sub>A</sub>/L<sub>A</sub>, L<sub>A</sub>/L<sub>G</sub>) naznačen je za svaki uzorak.

#### 4.2.3. STin2

Kombiniranjem tri glavna alela prisutna u ljudskoj populaciji, STin2.9, STin2.10 i STin2.12, nastaje šest mogućih kombinacija parova alela, tj. šest genotipova: 9/9, 9/10, 9/12, 10/10, 10/12 i 12/12.. Duljine PCR amplikona pojedinih STin2 genotipa prikazane su u Tablici 11., dok je reprezentativni prikaz elektroforeze STin2 PCR amplikona na 3 %-tnom agaroznom gelu prikazan na Slici 6.



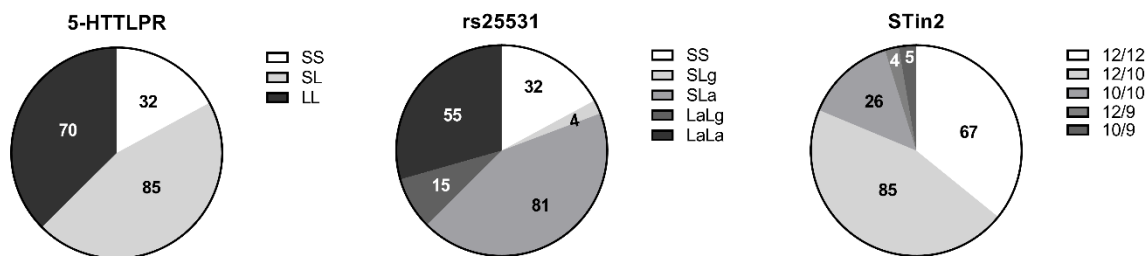
Slika 6. Prikaz 2,5%-tne agarozne gel elektroforeze PCR amplikona korištenih za genotipizaciju polimorfizma STin2. M = DNA ljestvica (DirectLoad™ PCR 100 bp Low Ladder), linije 1-18 = PCR amplikona, C<sup>-</sup> = negativna kontrola. Pripadajući STin2 genotip (9/10, 9/12, 10/10, 10/12, 12/12) naznačen je za svaki uzorak.

#### 4.3. Analiza odstupanja frekvencije genotipova od Hardy-Weinbergovog načela ravnoteže

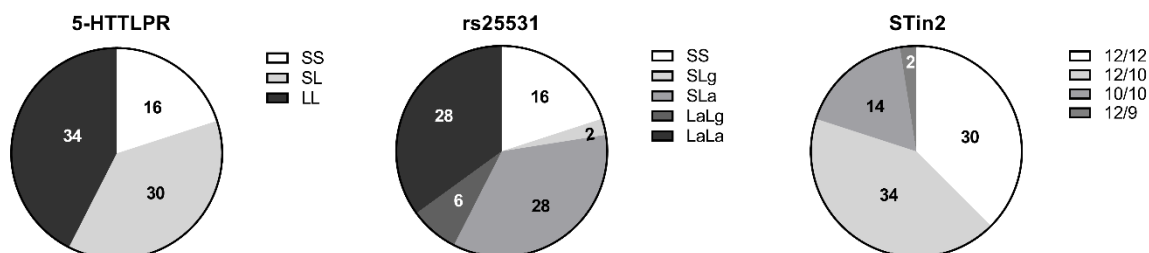
Za svaki polimorfizam u genu *SLC6A4*: 5-HTTLPR, rs25531 i STin2, određeno je odstupanje opaženih od očekivanih frekvencija pojedinih genotipova po Hardy-Weinbergovom modelu ravnoteže. Navedena analiza provedena je u ukupnom uzorku te u svakoj spolnoj skupini novorođenčadi zasebno. Kod sva 3 polimorfizma opažene frekvencija nisu statistički značajno odstupale od očekivanih, ni u ukupnom uzorku, ni u svakoj spolnoj skupini novorođenčadi zasebno. Drugim riječima, ni kod jednog od analiziranih polimorfizama nije uočeno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže, neovisno o spolu sudionika. U analiziranom populacijskom uzorku nije zabilježena pojava genotipa L<sub>G</sub>/L<sub>G</sub> (kod polimorfizma rs25531) te genotipa 9/9 (kod polimorfizma STin2). Raspodjela 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 genotipova u ukupnom uzorku te u svakoj spolnoj skupini novorođenčadi zasebno prikazana je na Slici 7.

## Raspodjela genotipova kod polimorfizama u genu *SLC6A4*

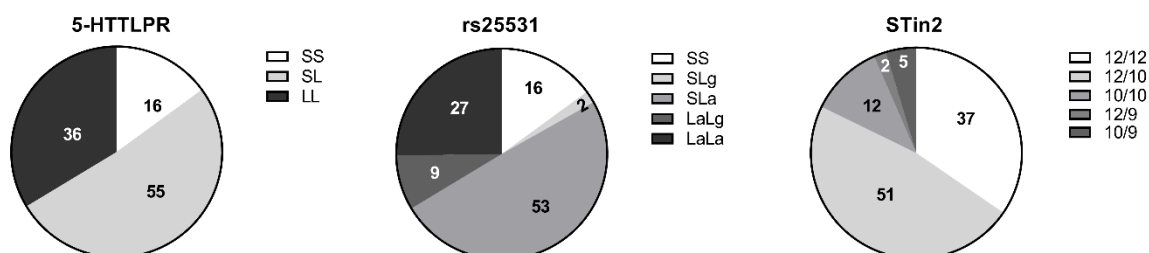
### A. U UKUPNOM UZORKU, N = 187



### B. KOD ŽENSKE NOVOROĐENČADI, N = 80



### C. KOD MUŠKE NOVOROĐENČADI, N = 107



Slika 7. Kružni dijagrami za polimorfizme: 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 u genu *SLC6A4* u (A) ukupnom uzorku, (B) kod ženske novorođenčadi te (C) kod muške novorođenčadi. Kružni isječci različitih boja prikazuju skupinu sudionika određenog genotipa (objašnjenog u legendi pored svakog dijagrama) čiji je broj naveden iznad kružnog isječka. Površina isječka odgovara udjelu sudionika određenog genotipa u ukupnom uzorku gdje površina cijelog kruga odgovara cijelom analiziranom uzorku (cijeli analizirani uzorak odnosi se na: (A) ukupni uzorak, (B) skupinu ženske novorođenčadi te (C) skupinu muške novorođenčadi).

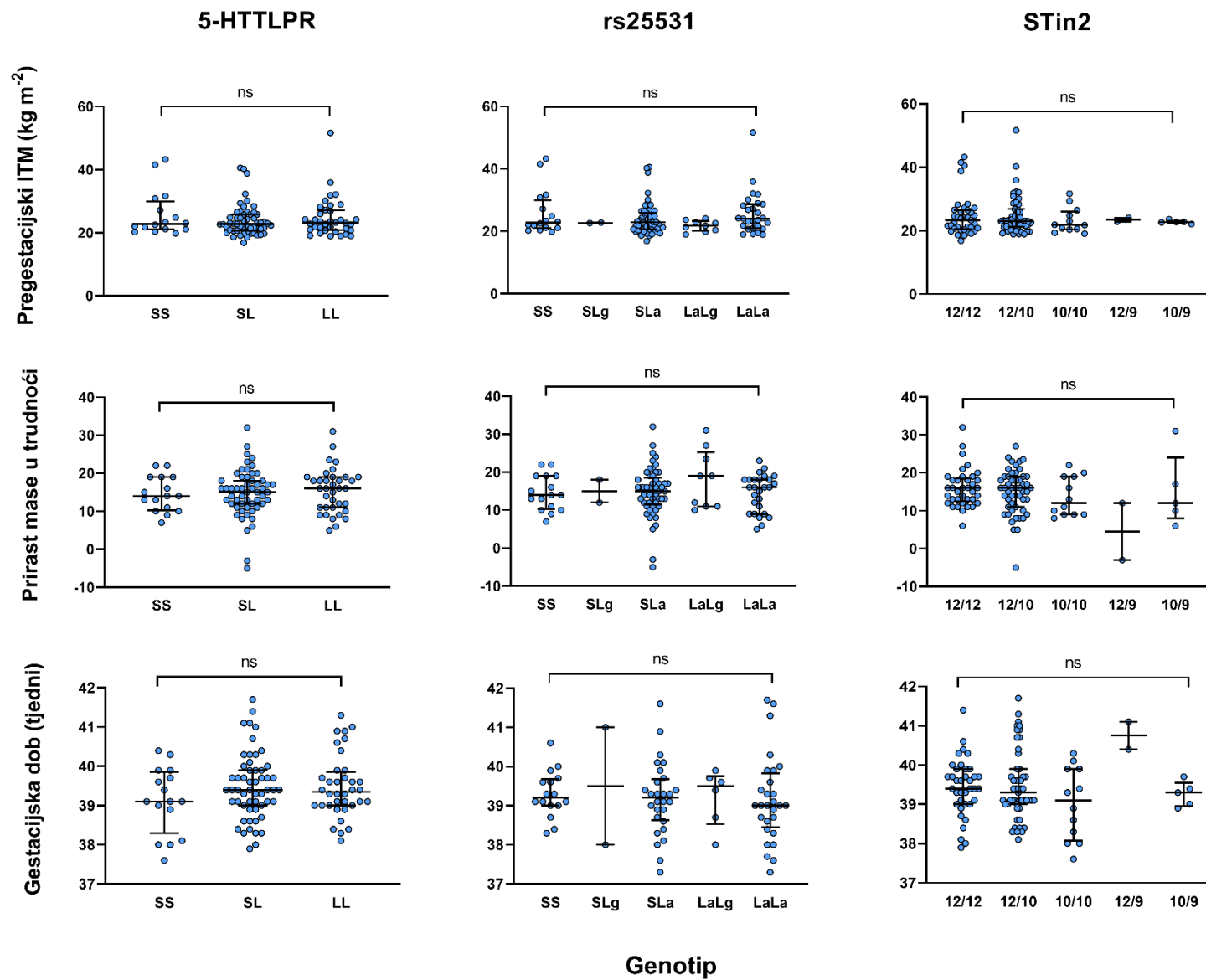
#### **4.4. Povezanost polimorfizama 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 u genu *SLC6A4* s karakteristikama majke i novorođenčeta za koje je pokazana povezanost s antropometrijskim karakteristikama novorođenčeta**

Zbog uočene značajne povezanosti potencijalno zbunjujućih varijabli: prirasta majčine mase u trudnoći, pariteta i gestacijske dobi novorođenčeta, s antropometrijskim parametrima ženske novorođenčadi, provedena je usporedba genotipnih skupina s obzirom na navedene zbunjujuće varijable, za svaki od polimorfizama. Istovjetna analiza provedena je i u muškoj skupini novorođenčadi, ali s obzirom na potencijalno zbunjujuće varijable koje su se pokazale značajno povezanima s antropometrijskim parametrima muške novorođenčadi: pregestacijski ITM, prirast majčine mase u trudnoći, gestacijska dob novorođenčeta.

Ni kod jednog od tri polimorfizma u genu *SLC6A4* nije uočena statistički značajna razlika između novorođenčadi različitog genotipa, u slučaju svih analiziranih potencijalno zbunjujućih varijabli, bez obzira na spol novorođenčeta (Slika 8.). Ovaj rezultat ukazuje na to da se ranije opažena povezanost antropometrijskih karakteristika novorođenčeta s potencijalno zbunjujućim varijablama može zanemariti u usporedbi sudionika različitog genotipa po porođajnoj masi i duljini te ponderalnom indeksu.



B. MUŠKA NOVOROĐENČAD



Slika 8. Usporedba skupina različitih genotipova za polimorfizme 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 s obzirom na (A) pregestacijski ITM i paritet majke te gestacijsku dob novorođenčeta kod ženske novorođenčadi (prikazana ružičastom bojom), te (B) pregestacijski ITM, prirast mase u trudnoći i gestacijsku dob novorođenčeta kod muške novorođenčadi (prikazana plavom bojom). Za kontinuirane varijable (pregestacijski ITM, prirast mase u trudnoći, gestacijsku dob novorođenčeta) prikazana je raspodjela sudionika pojedinog genotipa s istaknutim medijanom i interkvartilnim rasponom pri čemu točke na grafu predstavljaju pojedine sudionike. Kategorijska varijabla (paritet) prikazana je grafovima sa stupcima u kojima pojedini stupac prikazuje određenu skupinu genotipa, a visina stupca odgovara broju sudionika. Kontinuirane varijable analizirane su jednosmjernim ANOVA testom uz korekciju po Tukey-u za višestruka testiranja za normalno distribuirane podatke ili Kruskal-Wallis testom uz korekciju po Dunn-u za višestruka testiranja kod nenormalne distribucije podataka. Kategorijske varijable analizirane su Hi-kvadrat testom. Statistička značajnost istaknuta je iznad svakog grafa. ITM, indeks tjelesne mase; ns, engl. *non-significant*.

#### **4.5. Povezanost polimorfizama 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 s antropometrijskim karakteristikama novorođenčeta: porođajnom masom i duljinom te ponderalnim indeksom**

Glavni cilj ovog istraživanja bio je proučiti povezanost polimorfizama 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 u genu za serotoninški transporter *SLC6A4* s antropometrijskim karakteristikama novorođenčeta: porođajnom masom i duljinom te ponderalnim indeksom. U tu svrhu, novorođenčad je grupirana u skupine s obzirom na genotip te su skupine novorođenčadi uspoređene jednosmjernom ANOVA-om ili Kruskal-Wallis testom s obzirom na navedene antropometrijske karakteristike. Navedena usporedba provedena je zasebno za svaki od polimorfizama. S obzirom na statistički značajnu razliku u porođajnoj masi i duljini između ženske i muške novorođenčadi, testiranje razlike između skupina različitog genotipa za te antropometrijske karakteristike provedeno je zasebno u ženskoj (N=80), odnosno, muškoj (N=107) novorođenčadi. U slučaju ponderalnog indeksa, uz zasebne analize u svakoj spolnoj skupini, provedena je i dodatna analiza na ukupnom uzorku (N=187). U slučaju rijetkih genotipova: S/L<sub>G</sub> kod polimorfizma rs25531 te 12/9 i 10/9 kod polimorfizma STin2, provedene su i dodatne analize koje nisu uključivale skupine novorođenčadi navedenih rijetkih genotipova

i rezultati se kvalitativno nisu promijenili, osim u slučaju porođajne duljine kod muške novorođenčadi. Naime, nakon isključenja S/L<sub>G</sub> skupine s vrlo malim brojem ispitanika (N=2), u muškoj spolnoj skupini umjesto neparametrijskog proveden je parametrijski test te je *post-hoc* Tukey testom zabilježena statistički značajna razlika u porođajnoj duljini između različitih rs25531 genotipnih skupina, specifično, između ispitanika S/L<sub>A</sub> i L<sub>A</sub>/L<sub>G</sub> genotipova ( $p = 0,009$ ).

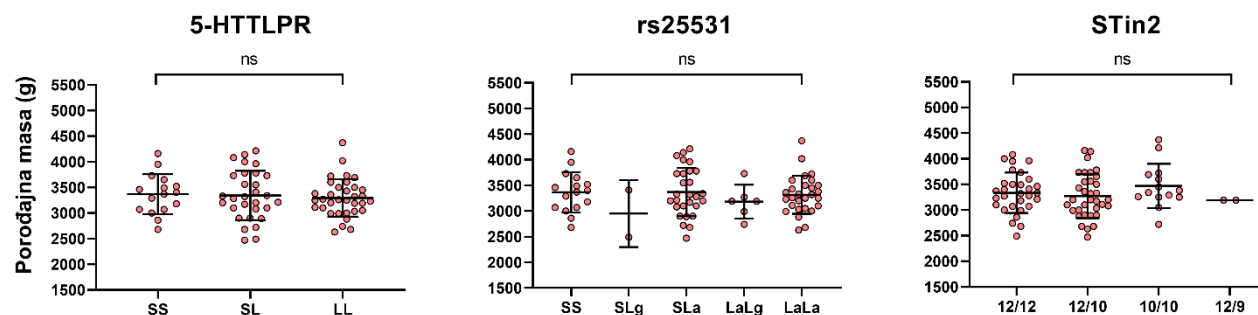
Na Slici 9. prikazani su rezultati analize koji uključuju genotip i porođajnu masu. Ni kod jednog od analiziranih polimorfizama nije uočena statistički značajna razlika u porođajnoj masi između novorođenčadi različitog genotipa, ni u jednoj spolnoj skupini. Također, ni u slučaju porođajne duljine nisu uočene statistički značajne razlike između skupina novorođenčadi različitog genotipa, ni kod jednog polimorfizma u genu *SLC6A4*, bez obzira na spol novorođenčadi (Slika 10.).

S druge strane, ponderalni indeks novorođenčadi se statistički značajno razlikovao između novorođenčadi različitog genotipa za STin2 polimorfizam (Slika 11.). Pri tome je novorođenčad STin2 genotipa za koji je karakterističan manji broj ponavljanja (aleli s 9 i 10 ponavljanja) bila povećanog ponderalnog indeksa u odnosu na novorođenčad s većim brojem ponavljanja (alel 12). Navedena statistička značajnost opažena je u ukupnom uzorku i u skupini ženske, ali ne i kod muške novorođenčadi. U slučaju ostalih polimorfizama, 5-HTTLPR, rs25531, nije uočen efekt genotipa na ponderalni indeks novorođenčadi, ni u jednoj spolnoj skupini, ni u ukupnom uzorku.

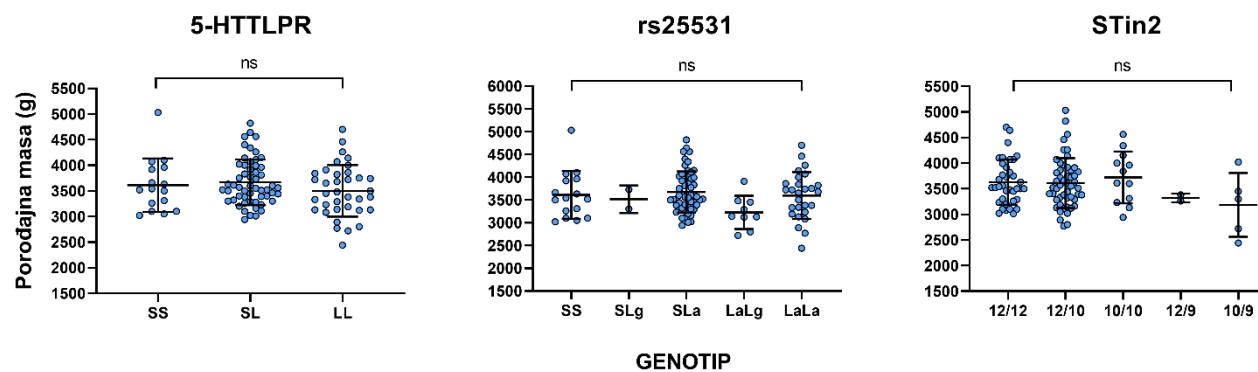


## POROĐAJNA MASA

### A. ŽENSKA NOVOROĐENČAD (N=80)



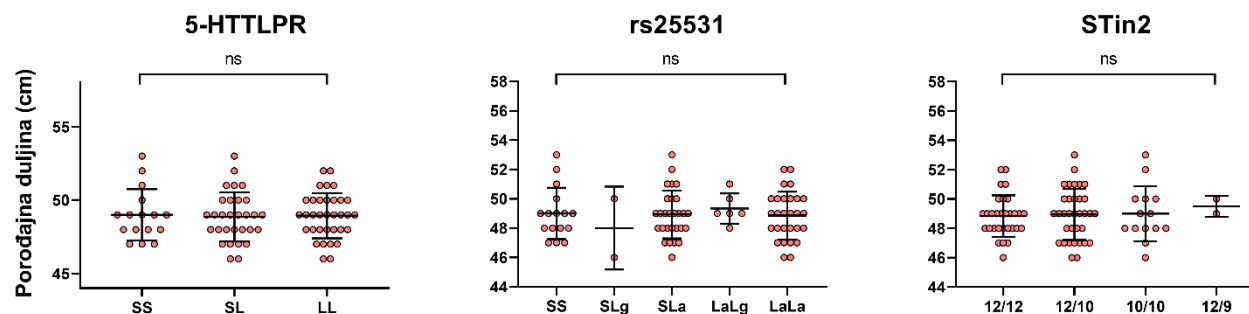
### B. MUŠKA NOVOROĐENČAD (N=107)



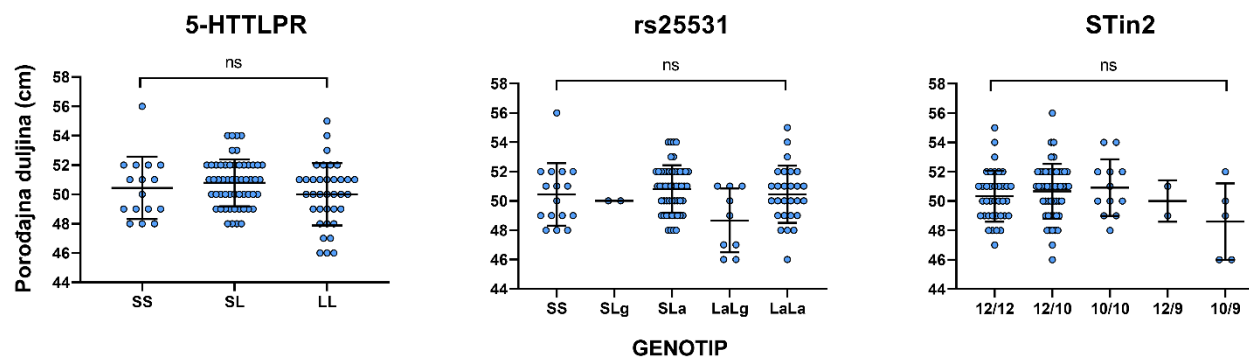
Slika 9. Razlike u porođajnoj masi između skupina novorođenčadi različitog genotipa za polimorfizme: 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 kod (A) ženske (prikazana ružičastom bojom) i (B) muške novorođenčadi (prikazana plavom bojom). Za svaku genotipnu skupinu istaknute su srednja vrijednost i standardna devijacija pri čemu točke na grafu predstavljaju pojedine sudionike. Razlike između skupina testirane su jednosmjernim ANOVA testom uz korekciju po Tukey-u za višestruka testiranja za normalno distribuirane podatke ili Kruskal-Wallis testom uz korekciju po Dunn-u za višestruka testiranja kod nenormalne distribucije podataka. Statistička značajnost istaknuta je iznad grafa. ns, engl. *non-significant*.

## POROĐAJNA DULJINA

### A. ŽENSKA NOVOROĐENČAD (N=80)



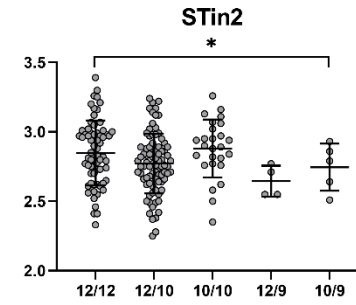
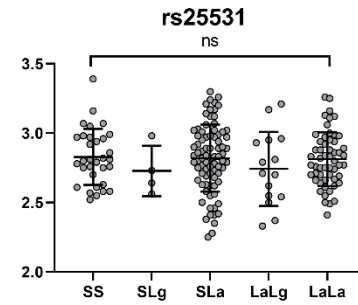
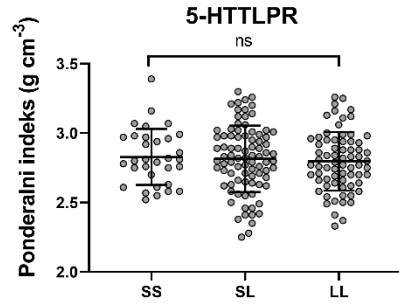
### B. MUŠKA NOVOROĐENČAD (N=107)



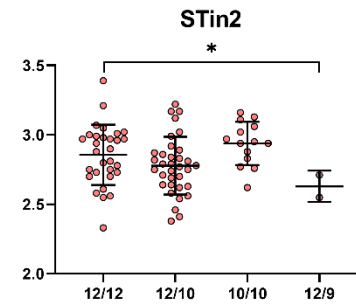
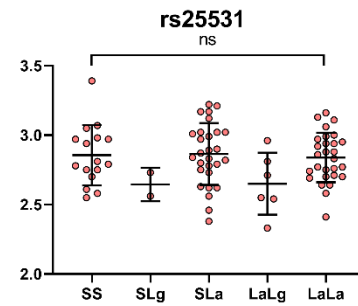
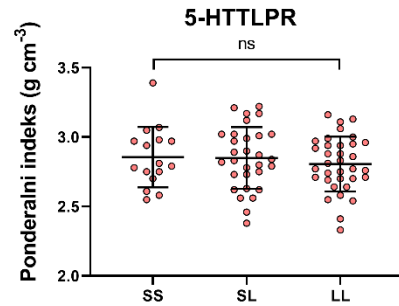
Slika 10. Razlike u porođajnoj duljini između skupina novorođenčadi različitog genotipa za polimorfizme: 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 kod (A) ženske (prikazana ružičastom bojom) i (B) muške novorođenčadi (prikazana plavom bojom). Za svaku genotipnu skupinu istaknute su srednja vrijednost i standardna devijacija pri čemu točke na grafu predstavljaju pojedine sudionike. Razlike između skupina testirane su jednosmjernim ANOVA testom uz korekciju po Tukey-u za višestruka testiranja za normalno distribuirane podatke ili Kruskal-Wallis testom uz korekciju po Dunn-u za višestruka testiranja kod nenormalne distribucije podataka. Statistička značajnost istaknuta je iznad grafa. ns, engl. *non-significant*.

## PONDERALNI INDEKS ( $\text{g cm}^{-3}$ )

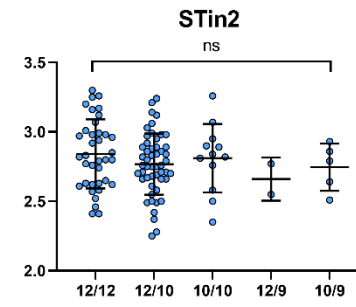
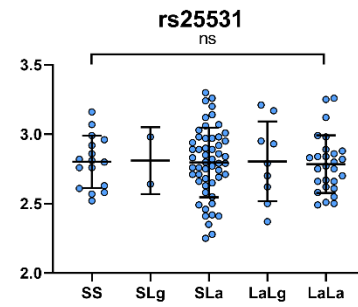
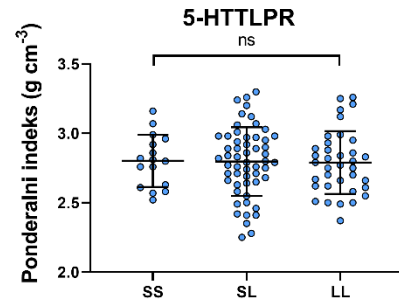
### A. UKUPNI UZORAK (N=187)



### B. ŽENSKA NOVOROĐENČAD (N=80)



### C. MUŠKA NOVOROĐENČAD (N=107)



GENOTIP

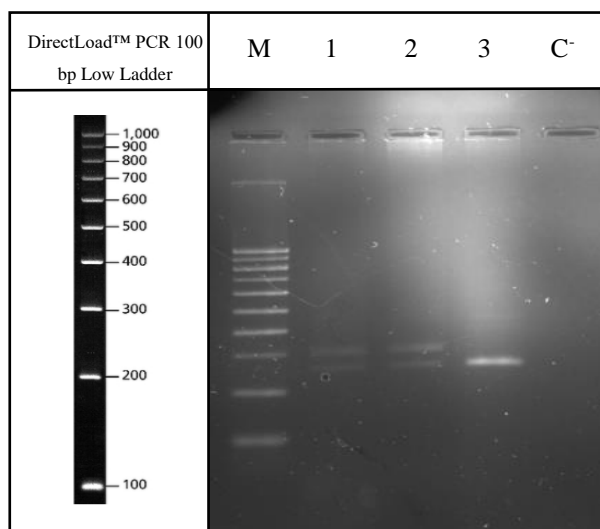
Slika 11. Razlike u ponderalnom indeksu između skupina novorođenčadi različitog genotipa za polimorfizme: 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 kod (A) sve novorođenčadi (B) ženske (prikazana ružičastom bojom) i (C) muške novorođenčadi (prikazana plavom bojom). Za svaku genotipnu skupinu istaknute su srednja vrijednost i standardna devijacija pri čemu točke na grafu predstavljaju pojedine sudionike. Razlike između skupina testirane su jednosmjernim ANOVA testom uz korekciju po Tukey-u za višestruka testiranja za normalno distribuirane podatke ili Kruskal-Wallis testom uz korekciju po Dunn-u za višestruka testiranja kod nenormalne distribucije podataka. Statistička značajnost istaknuta je iznad svakog grafa gdje \* označava  $p$  vrijednost  $< 0,05$ . ns, engl. *non-significant*.

## **4.6. Optimizacija metode za genotipizaciju polimorfizma 5-HTTLPR**

### **4.6.1. Optimizacija PCR reakcije**

#### **4.6.1.1. Utjecaj količine DNA i vrsta tkiva iz kojeg je izolirana DNA**

Količina početnog DNA kalupa u PCR reakcijskoj smjesi jedan je od faktora koji može utjecati na uspješnost reakcije umnažanja. Prema određenim protokolima, preporučuje se korištenje između 50 i 250 ng genomske DNA u PCR reakcijskim smjesama ukupnog volumena 50  $\mu$ L ([www.barricklab.org](http://www.barricklab.org)). Odabir optimalne količine početnog DNA kalupa od ključne je važnosti s obzirom na to da je korištenjem vrlo malih količina DNA smanjena vjerojatnost prijanjanja početnica na ciljno mjesto te povećana vjerojatnost gubitka samog uzorka uslijed kemijske ili enzimske razgradnje. S druge strane, previsoke količine početnog DNA kalupa mogu dovesti do smanjene sinteze DNA uslijed otežane difuzije *Taq* polimeraze u relativno malom prostoru reakcijske posude ([www.caister.com](http://www.caister.com)). Kako bi se odredila optimalna količina početnog DNA kalupa, provedena je usporedba efikasnosti reakcije umnažanja korištenjem 40 ng (reakcija 1) i 80 ng (reakcija 2) genomske DNA izolirane iz tkiva posteljice istog ispitanika (Slika 12.). U svrhu ispitivanja potencijalnog utjecaja vrste tkiva na efikasnost reakcije umnažanja, u PCR reakcijsku smjesu 3 dodano je 40 ng genomske DNA izolirane iz krvi pupkovine drugog ispitanika i uspoređeno s rezultatima reakcije 1. Sve PCR reakcijske smjese bile su istih volumena i sastava (Slika 12.).

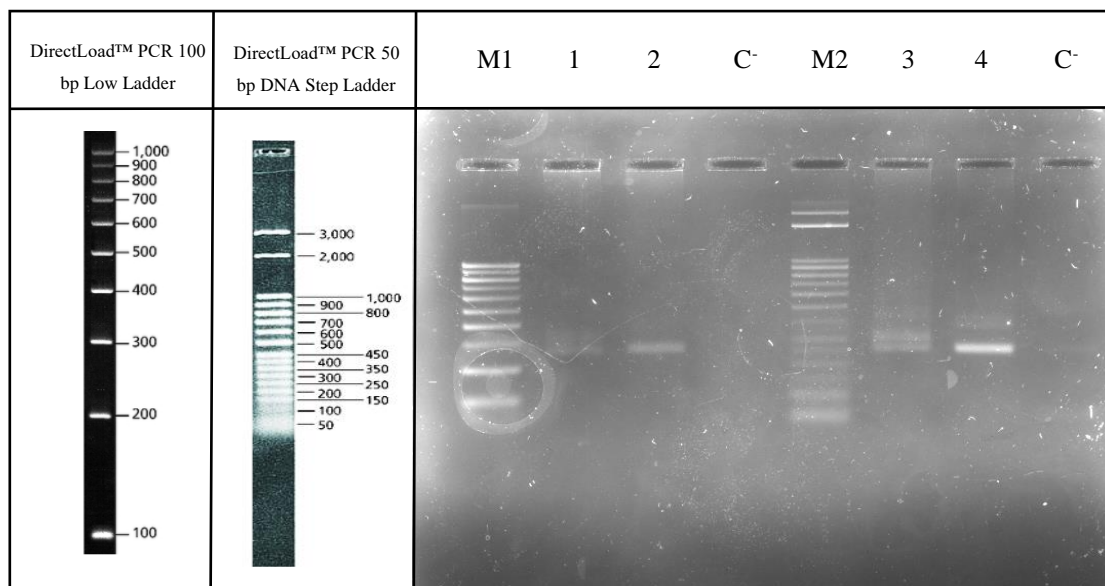


Slika 12. Prikaz 2,5%-tne agarozne gel elektroforeze PCR amplikona korištenih za optimizaciju PCR metode za genotipizaciju polimorfizma 5-HTTLPR. M = DNA ljestvica (DirectLoad™ PCR 100 bp Low Ladder), linija 1 = reakcija 1: 40 ng kalupa genomske DNA izolirane iz tkiva posteljice, linija 2 = reakcija 2: 80 ng kalupa genomske DNA izolirane iz tkiva posteljice, linija 3 = reakcija 3: 40 ng kalupa genomske DNA izolirane iz krvi, C<sup>-</sup> = negativna kontrola.

Usporedbom intenziteta vrpce PCR amplikona reakcija 1 i 2, vidljivo je kako veća količina kalupa DNA u PCR reakcijskoj smjesi nije rezultirala jačim intenzitetom signala vrpce na gel elektroforezi, već je intenzitet obje vrpce bio približno jednak (Slika 12.). S obzirom na zamijećeni rezultat, odlučeno je prilikom provedbe reakcije umnažanja koristiti 40 ng početnog DNA kalupa, umjesto 80 ng, kako bi se uštedjela i očuvala ograničena količina pohranjenih DNA izolata. Vrpca PCR amplikona reakcije 3, u čiju je PCR reakcijsku smjesu dodano 40 ng genomske DNA izolirane iz krvi pupkovine, jačeg je intenziteta od onog iz reakcija 1 i 2 u kojima je korištena genomska DNA izolirana iz tkiva posteljice. Razlog tome je različit genotip uzoraka, a ne tip tkiva iz kojeg je izolirana DNA. U reakciji 3 je korišten uzorak genotipa S/S koji ima dvije kopije S kalupa koje se iz tog razloga umnažaju u dva puta većoj mjeri nego što je to slučaj kod heterozigotnih S/L uzoraka 1 i 2 koji imaju samo jednu kopiju kalupa S i kalupa L (Slika 12.). Stoga, razlika u intenzitetu vrpce reakcija 1 i 3 proizlazi iz različitih genotipova, a ne iz razlike u vrsti ispitanih tkiva. Uzevši u obzir navedena opažanja, iz praktičnih je razloga tkivo posteljice okvalificirano kao pogodniji izbor.

#### 4.6.1.2. Utjecaj PCR uređaja

Različiti PCR uređaji međusobno se mogu razlikovati po stupnju točnosti i preciznosti koji, primjerice, može biti odraz sposobnosti kontrole i održavanja ispravne i ujednačene temperature tijekom pojedinih faza PCR reakcije (www.thermofisher.com, a). Iz tog razloga, ispitan je utjecaj različitih PCR uređaja na efikasnost reakcije umnažanja. PCR reakcije istih uzoraka, pri istim postavkama umnažanja provedene su u dva različita PCR uređaja, T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) te Thermal Cycler GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Usporedba efikasnosti umnažanja 5-HTTLPR PCR amplikona korištenjem dva različita PCR uređaja prikazana je na Slici 13.



Slika 13. Prikaz 2,5%-tne agarozne gel elektroforeze PCR amplikona korištenih za optimizaciju PCR metode za genotipizaciju polimorfizma 5-HTTLPR. M1 = DNA ljestvica (DirectLoad™ PCR 100 bp Low Ladder), linije 1 i 2 = reakcija umnažanja provedena pomoću PCR uređaja Thermal Cycler GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), M2 = DNA ljestvica (DirectLoad™ PCR 50 bp DNA Step Ladder), linije 3 i 4 = reakcija umnažanja provedena pomoću PCR uređaja T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories), C<sup>-</sup> = negativna kontrola.

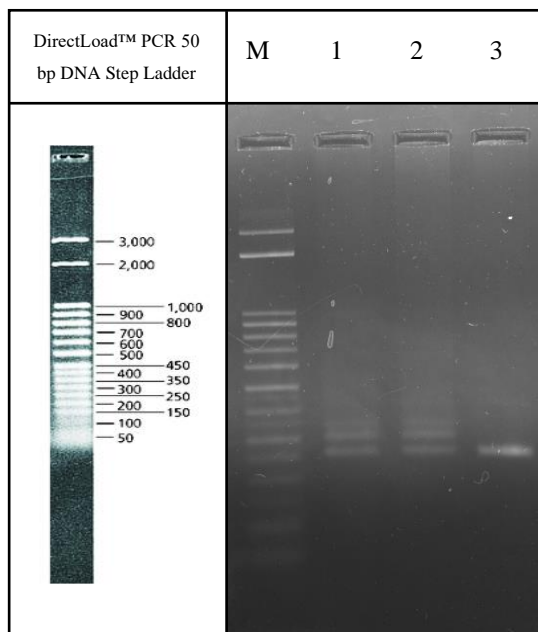
Usporedbom dobivenih rezultata, vidljivo je kako su vrpce PCR amplikona uzoraka 1 i 2 značajno slabijeg intenziteta, nego vrpce PCR amplikona uzoraka 3 i 4, te da je iz tog razloga očitavanje genotipova uzoraka 1 i 2 uvelike otežano (Slika 13.). Reakcija umnažanja uz

korištenje Thermal Cycler GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) PCR uređaja, pri istim postavkama umnažanja, manje je efikasna nego reakcija umnažanja provedena pomoću T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) PCR uređaja, stoga je odlučeno u daljnjem radu koristiti potonji PCR uređaj.

#### 4.6.1.3. Utjecaj uvjeta PCR reakcije

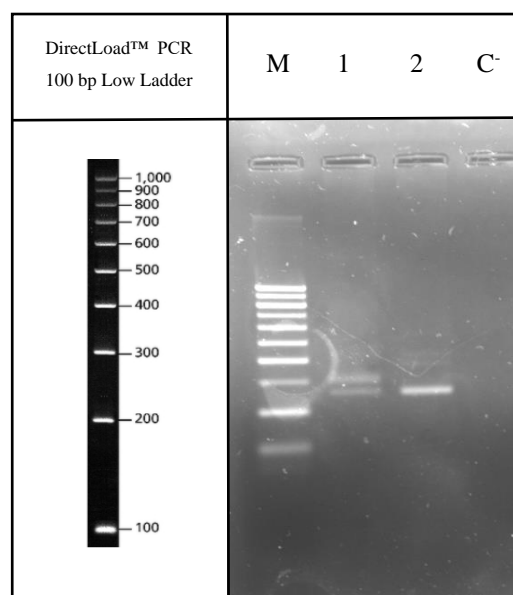
Duljina trajanja i temperatura svakog pojedinog koraka reakcije umnažanja mogu se modificirati kako bi se optimizirala proizvodnja željenog PCR amplikona (Lorenz, 2012). Inicijalne reakcije umnažanja rezultirale su nezadovoljavajućim stupnjem intenziteta PCR amplikona i nespecifičnom amplifikacijom približne veličine 350 bp (Slika 14.), stoga je odlučeno modificirati određene postavke reakcije umnažanja: duljinu trajanja faze elongacije (1) i broj ciklusa umnažanja (2).

U inicijalnim eksperimentima vrijeme elongacije iznosilo je 30 sekundi, a broj ciklusa umnažanja je bio 30 (Slika 14.).



Slika 14. Prikaz 2,5%-tne agarozne gel elektroforeze PCR amplikona u optimizaciji PCR metode za genotipizaciju polimorfizma 5-HTTLPR. M = DNA ljestvica (DirectLoad™ PCR 50 bp DNA Step Ladder), linije 1-3 = 5-HTTLPR PCR amplikoni s prisutnom nespecifičnom amplifikacijom približne veličine 350 bp). Vrijeme elongacije: 30 sekundi, broj ciklusa: 30.

(1) **Inicijalno trajanje elongacije** je produljeno na 35 sekundi. Tijekom faze elongacije reakcije umnažanja dolazi do produljenja oligonukleotidnih početnica i sinteze željenih PCR amplikona. Vrijeme trajanja faze elongacije ovisi o brzini kojom DNA polimeraza sintetizira lanac DNA i duljini ciljnog fragmenta DNA, a neadekvatan iznos trajanja vremena elongacije može dovesti do pojave nespecifične amplifikacije ili do izostanka ciljane amplifikacije (www.bio-rad.com; www.thermofisher.com, b). Produljenjem vremena elongacije s 30 (Slika 14.) na 35 sekundi (Slika 15.) postignut je zadovoljavajući intenzitet signala specifičnih PCR amplikona te je znatno umanjeno stupanje pojave nespecifičnih amplifikacija. Iz tog razloga je u daljnjem radu odlučeno koristiti vrijeme elongacije od 35 sekundi.

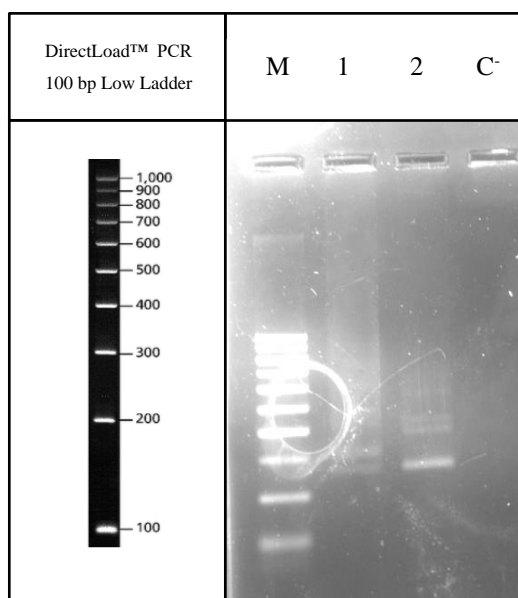


Slika 15. Prikaz 2,5%-tne agarozne gel elektroforeze PCR amplikona u optimizaciji PCR metode za genotipizaciju polimorfizma 5-HTTLPR. M = DNA ljestvica (DirectLoad™ PCR 100 bp Low Ladder), linije 1-2 = uzorci, C<sup>-</sup> = negativna kontrola. Vrijeme elongacije: 35 sekundi, broj ciklusa: 30.

(2) Osim trajanja faze elongacije, inicijalna reakcija s 30 ciklusa umnažanja (Slika 14.) modificirana je tako da je **broj ciklusa umnažanja** povećan na 35 (Slika 16.). Povećanje broja ciklusa umnažanja rezultira većom količinom nastalih PCR amplikona što pridonosi njihovoj boljoj vizualizaciji na gel elektroforezi i olakšava određivanje genotipova uzoraka. Međutim, preveliko povećanje broja ciklusa često rezultira povećanjem broja neželjenih amplifikacija (Lorenz, 2012). Povećanje broja ciklusa uzrokovalo je pojavu nespecifičnog umnažanja



vidljivog u obliku kontinuiranih „mrlja“ (engl. *smear*) iznad specifičnih fragmenata DNA. Uz to, specifična amplifikacija bila je slabija, najvjerojatnije zato što se tijekom reakcije umnažanja nisu preferencijalno umnažali ciljani fragmenti DNA, već i oni nespecifični. S obzirom na to da navedenim povećanjem broja ciklusa nije ostvaren zadovoljavajući učinak, broj ciklusa umnažanja u daljnjem radu podešen je na inicijalnih 30.



Slika 16. Prikaz 2,5%-tne agarozne gel elektroforeze PCR amplikona u optimizaciji PCR metode za genotipizaciju polimorfizma 5-HTTLPR. M = DNA ljestvica (DirectLoad™ PCR 100 bp Low Ladder), 1-2 = uzorci, C<sup>-</sup> = negativna kontrola. Vrijeme elongacije: 30 sekundi, broj ciklusa: 35.

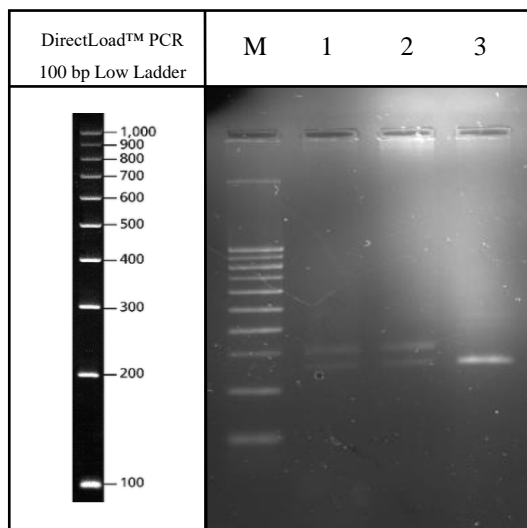
#### 4.6.2. Optimizacija postupka agarozne gel elektroforeze

Postavke agarozne gel elektroforeze korištene prilikom genotipizacije promotorskog polimorfizma 5-HTTLPR preuzete su iz literature (Blažević i sur., 2017; Hranilović i sur., 2000) uz određene izmjene. Analiziran je učinak različitih parametara na kvalitetu rezultata agarozne gel elektroforeze te su određene najpovoljnije postavke metode ispitivanjem sljedećih parametara: (1) količina boje u agaroznom gelu, (2) postotka agaroze u gelu.

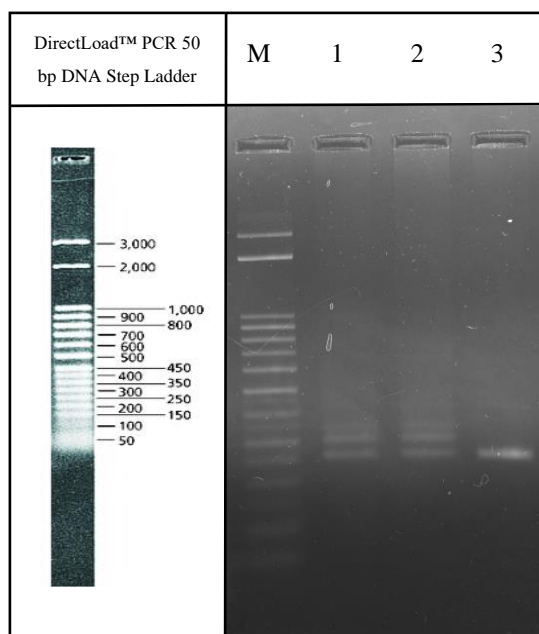
(1) Tijekom pripreme agaroznog gela, prije nego što nastupi polimerizacija gela, ohlađenoj otopini agaroze dodaje se propisani volumen **boje za vizualizaciju** nukleinskih kiselina (MIDORI<sup>Green</sup> Advance Safe) (engl. *pre-staining*). Povećanjem korištenog volumena

boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina pokušao se dodatno povećati intenzitet signala PCR amplikona i produkata restrikcijske digestije na agaroznom gelu. Za tu svrhu, uspoređen je dobiveni intenzitet signala fragmenata DNA korištenjem 0,75 i 1,5  $\mu$ L boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina po 15 mL agaroznog gela (Slike 17. i 18.). Povećanjem volumena boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina postignut je jači intenzitet signala PCR amplikona, ali i nespecifičnih fragmenata u amplifikaciji DNA (Slika 18.). Iz tog razloga, veća količina boje (1,5  $\mu$ L/15 mL agaroznog gela) za vizualizaciju nukleinskih kiselina korištena je samo za vizualizaciju produkata restrikcijske digestije, ali ne i za vizualizaciju PCR amplikona.

(2) Odabir **koncentracije agaroznog gela** prvenstveno ovisi o veličini DNA fragmenata koji se analiziraju. Niske koncentracije agaroznog gela koriste se za odvajanje velikih fragmenata DNA, dok visoke koncentracije omogućuju razdvajanje manjih fragmenata DNA ([www.qiagen.com/us](http://www.qiagen.com/us)). U inicijalnom protokolu za vizualizaciju PCR amplikona predviđena je 3 %-tna koncentracija agaroznog gela te je sa spomenutom koncentracijom gela postignut zadovoljavajuć stupanj vizualizacije fragmenata DNA (Slika 17.). Međutim, iz praktičnih razloga, testirana je i niža koncentracija agaroznog gela od 2,5 % (Slika 18.). Korištenjem agaroznog gela koncentracije 2,5 %, u usporedbi s gelom koncentracije 3 %, postignut je donekle niži, ali ipak zadovoljavajući stupanj razlučivanja fragmenata DNA što je vidljivo na primjeru DNA ljestvice (DirectLoad™ PCR 50 bp DNA Step Ladder) čiji su fragmenti DNA na prikazu agarozne gel elektroforeze jasno razdvojeni, iako njihova razlika u duljini iznosi samo 50 bp (Slika 18.). Korištenjem agaroznog gela niže koncentracije (2,5 %), u usporedbi s gelom više koncentracije (3 %), postupak pripreme gela višestruko je olakšan i ubrzan, a dobiveni se gel odlikovao visokim stupnjem homogenosti.

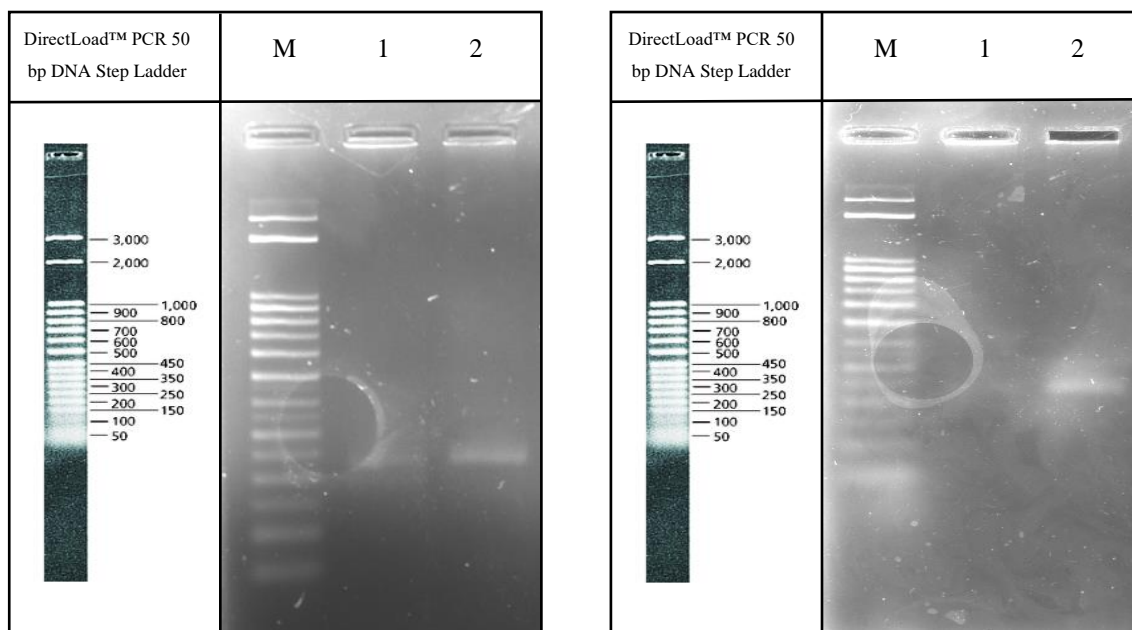


Slika 17. Prikaz 2,5%-tne agarozne gel elektroforeze 5-HTTLPR PCR amplikona korištenih u optimizaciji postupka agarozne gel elektroforeze. M = DNA ljestvica (DirectLoad™ PCR 100 bp Low Ladder), linije 1-3 = PCR amplikoni. Koncentracija agaroznog gela (3 %), volumen boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina MIDORI<sup>Green</sup> Advance Safe (0,75 µL/15 mL agaroznog gela).



Slika 18. Prikaz agarozne gel elektroforeze 5-HTTLPR PCR amplikona korištenih u optimizaciji postupka agarozne gel elektroforeze. M = DNA ljestvica (DirectLoad™ PCR 50 bp DNA Step Ladder), linije 1-3 = PCR amplikoni, koncentracija agaroznog gela (2,5 %), volumen boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina MIDORI<sup>Green</sup> Advance Safe (1,5 µL/15 mL agaroznog gela).

S namjerom povećanja intenziteta dobivenih DNA vrpca isprobana je i *post-staining* metoda u kojoj se gel za elektroforezu boji u otopini za vizualizaciju DNA nakon elektroforeze i razdvajanja fragmenata DNA na gelu. Bojanje agaroznog gela nakon elektroforeze provedeno je inkubacijom gela u otopini koja se sastojala od 20 mL TAE pufera i 4  $\mu$ L boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina MIDORI<sup>Green</sup> Advance Safe, na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 h. Prikaz 2,5%-tne agarozne gel elektroforeze produkata restrikcijske digestije vizualiziranih bojanjem gela prije i nakon elektroforeze prikazan je na Slici 19. Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako bojanjem gela nakon elektroforeze, u usporedbi s bojanjem prije elektroforeze, nije postignut bolji stupanj vizualizacije vrpca, već je najvjerojatnije došlo do difundiranja fragmenata DNA izvan gela. Iz tog razloga, *post-staining* metoda bojanja nukleinskih kiselina nije korištena u daljnjem radu.



Slika 19. Prikaz 2,5%-tne agarozne gel elektroforeze produkata restrikcijske digestije 5-HTTLPR PCR amplikona korištenih u optimizaciji postupka agarozne gel elektroforeze. M = DNA ljestvica (DirectLoad<sup>™</sup> PCR 50 bp DNA Step Ladder), linije 1, 2 = uzorci. Lijevi prikaz – *pre-staining* metoda bojanja nukleinskih kiselina; desni prikaz – *post-staining* metoda bojanja nukleinskih kiselina.

## 5. RASPRAVA

Glavni cilj ovog istraživanja bio je ispitati potencijalnu povezanost polimorfizama gena za serotoninški prijenosnik, *SLC6A4*, s antropometrijskim karakteristikama novorođenčadi. Analizirana su ukupno tri polimorfizma gena *SLC6A4*, promotorski polimorfizam duljine 5-HTTLPR, polimorfizam zamjene pojedinačnog nukleotida rs25531 te intronski polimorfizam varijabilnog broja ponavljanja STin2. Promatrane antropometrijske karakteristike uključivale su porođajnu masu i duljinu te ponderalni indeks novorođenčadi. Prije same analize, provjeren je utjecaj potencijalno zbunjujućih varijabli majke i novorođenčeta: majčinog pregestacijskog ITM, prirasta mase u trudnoći, pariteta te gestacijske dobi novorođenčeta, na antropometrijske karakteristike novorođenčeta. U slučaju porođajne mase i duljine nisu uočene statistički značajne razlike između skupina novorođenčadi različitog genotipa, niti kod jednog analiziranog polimorfizma, bez obzira na spol novorođenčadi. Statistički značajna razlika u ponderalnom indeksu između novorođenčadi različitog genotipa za STin2 polimorfizam opažena je u ukupnom uzorku i u skupini ženske, ali ne i muške novorođenčadi. U slučaju polimorfizama 5-HTTLPR i rs25531 nije zabilježena statistički značajna razlika u ponderalnom indeksu između skupina novorođenčadi različitog genotipa, niti u jednoj spolnoj skupini, niti u ukupnom uzorku.

Testiranje genetičke ravnoteže u analiziranom uzorku populacije s obzirom na Hardy-Weinbergov model ravnoteže provedeno je u svakoj spolnoj skupini zasebno, kao i u ukupnom uzorku. Hardy-Weinbergov princip opisuje kako se učestalosti genotipova ili alela u određenoj populaciji ne mijenjaju između generacija, u odsustvu evolucijskih mehanizama poput prirodne selekcije, mutacija, migracija i dr. Statističko odstupanje od Hardy-Weinbergovog modela ravnoteže ukazuje na to kako je došlo do kršenja određenih pretpostavki teorema te bi dobivene rezultate analize iz takvih populacija trebalo tumačiti s oprezom (Waples, 2014). U slučaju sva tri analizirana polimorfizma u svakoj spolnoj skupini zasebno, kao i u ukupnom uzorku, opažene frekvencije genotipova nisu statistički značajno odstupale od očekivanih. Za 5-HTTLPR polimorfizam, učestalost genotipova L/L, S/L i S/S u ukupnom uzorku (N=187) iznosila je 37,4 %, 45,5 % i 17,1 %, redom. Frekvencije L i S alela u ukupnom uzorku iznosile su 60,2 % i 39,8 %, redom. Nije zabilježena statistički značajna razlika u frekvenciji spomenutih genotipova i alela između muške i ženske spolne skupine ( $p = 0,166$ ;  $p = 0,749$ ). Dobiveni rezultati u skladu su s dosad zabilježenom distribucijom genotipova i alela polimorfizma 5-HTTLPR unutar hrvatske populacije (Culej i sur., 2020; Blažević i sur., 2017; Culej i sur., 2014; Štefulj i sur., 2010; Noskova i sur., 2008; Hranilović i sur., 2003). U trialelnoj klasifikaciji

5-HTTLPR polimorfizma, koja uključuje razliku sudionika i s obzirom na rs25531 polimorfizam, utvrđene frekvencije genotipova S/S, S/L<sub>G</sub>, S/L<sub>A</sub>, L<sub>A</sub>/L<sub>G</sub> i L<sub>A</sub>/L<sub>A</sub> u ukupnom uzorku iznosile su 17,1, 2,1, 43,3, 8 i 29,5 %, redom, dok su frekvencije alela S, L<sub>A</sub> i L<sub>G</sub> iznosile 39,8, 55,1 i 5,1 %, redom. Nije zabilježena statistički značajna razlika u frekvenciji genotipova rs25531 polimorfizma i alela između muške i ženske spolne skupine ( $p = 0,339$ ;  $p = 0,925$ ). Genotip L<sub>G</sub>/L<sub>G</sub> nije zabilježen u analiziranom uzorku populacije (N=187). Navedeni rezultati u skladu su s dostupnim podacima o hrvatskoj i bjelačkoj populaciji (Blažević i sur., 2017; Hu i sur., 2006). Naime, Hu i sur. bilježe kako je omjer alela S:L<sub>A</sub>:L<sub>G</sub> u bjelačkoj populaciji iznosio 4:5:1 što ukazuje na relativno nisku frekvenciju L<sub>G</sub> alela u odnosu na S i L<sub>A</sub> alele. Također, poznato je kako je alel L<sub>G</sub> učestaliji u afričkoj i azijskoj, nego u europskoj populaciji (Murdoch i sur., 2013; Hu i sur., 2006). Blažević i sur. u svojem istraživanju provedenom na uzorku novorođenčadi pretežito hrvatskog porijekla (N=50) bilježe frekvencije genotipova (S/S (8 %), S/L<sub>A</sub> (48 %), L<sub>A</sub>/L<sub>G</sub> (6 %) i L<sub>A</sub>/L<sub>A</sub> (38 %)) usporedive s onima dobivenim ovim istraživanjem. Autori nisu zabilježili niti jedan uzorak L<sub>G</sub>/L<sub>G</sub> genotipa, ali niti S/L<sub>G</sub> genotipa (Blažević i sur., 2017). Ovakvi nalazi upućuju na vrlo nisku zastupljenost L<sub>G</sub>/L<sub>G</sub> i S/L<sub>G</sub> genotipova u hrvatskoj populaciji što je potvrđeno rezultatima dobivenima u sklopu ovog diplomskog rada gdje su frekvencije navedenih genotipova iznosile 0 i 2,1 %, redom. Za intronski STin2 polimorfizam, utvrđena učestalost genotipova 12/12, 12/10, 10/10, 12/9 i 10/9 u ukupnom uzorku iznosila je 35,8, 45,5, 13,9, 2,1 i 2,7 %, redom, dok su frekvencije alela STin2.12, STin2.10 i STin2.9 iznosile 59,6, 38 i 2,4 %, redom. Nije zabilježena statistički značajna razlika u frekvenciji STin2 genotipova i alela između muške i ženske spolne skupine ( $p = 0,239$ ;  $p = 0,448$ ). Genotip 9/9 nije zabilježen u ukupnom uzorku populacije, dok su uzorci genotipa 10/9 zabilježeni samo u muškoj spolnoj skupini. Rezultati analize provedene na uzorku zdravih kontrolnih ispitanika hrvatskog/južnoslavenskog porijekla (N=299), upućuju na gotovo istovjetan trend raspodjele STin2 genotipova i alela (12/12 (41 %), 12/10 (41 %), 10/10 (13 %), 12/9 (3 %) i 10/9 (2 %); STin2.12 (63 %), STin2.10 (35 %) i STin2.9 (2 %)), pri čemu autori nisu zabilježili niti jedan uzorak genotipa 9/9 (Hranilović i sur., 2003). Niska frekvencija alela STin2.9 zabilježena je i u drugim istraživanjima provedenima na ispitanicima hrvatskog porijekla. Blažević i sur. u svojem istraživanju nisu zabilježili pojavu genotipova 9/9 i 10/9, dok su Štefulj i sur. u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika (N=170) naveli pojavu samo alela STin2.12 i STin2.10, ali ne i STin2.9 (Blažević i sur., 2017; Štefulj i sur., 2010). Poznato je kako je učestalost alela STin2.9 u europskim populacijama niska, dok je na globalnoj razini frekvencija alela STin2.12 u velikoj većini slučajeva veća od frekvencije alela STin2.10 (Murdoch i sur., 2013).

Rast i razvoj fetusa određeni su ponajprije gestacijskom dobi fetusa, ali i određenim genetičkim i okolišnim čimbenicima (Roje i sur., 2004). Poznato je kako određene karakteristike majki mogu utjecati na antropometrijske parametre novorođenčadi (De Carvalho Padilha i sur., 2009). Karakteristike majki analizirane u sklopu ovog istraživanja bile su dob pri porodu, paritet, pregestacijski ITM te prirast mase u trudnoći. Za navedene karakteristike majki, kao i za gestacijsku dob pri porodu, nije zabilježena značajna statistička razlika ovisna o spolu novorođenčadi. Vrijednosti antropometrijskih parametara novorođenčadi, porođajne mase, duljine i ponderalnog indeksa, bile su normalno distribuirane i u skladu s hrvatskim prosjekom (Kolčić i sur., 2005; Roje i sur., 2004). Između ženske i muške spolne skupine novorođenčadi opažena je statistički značajna razlika u porođajnoj masi i duljini ( $p < 0,0001$ ). Takvi rezultati su očekivani s obzirom na to kako je u prosjeku muška novorođenčad većih dimenzija nego ženska novorođenčad (Soljačić Vraneš i Djaković, 2015; Kolčić i sur., 2005). Međutim, vrijednosti porođajne mase i duljine same po sebi ne definiraju jasno razliku između normalnog i neuravnoteženog fetalnog rasta (Landmann i sur., 2006). Za tu svrhu uvriježena je upotreba ponderalnog indeksa kao antropometrijske mjere koja međusobno povezuje i stavlja u omjer porođajnu masu i duljinu te se smatra boljim mjerilom uhranjenosti novorođenčadi u usporedbi s porođajnom masom i duljinom kao samostalnim parametrima. U ovom istraživanju nije opažena razlika u vrijednosti ponderalnog indeksa između ženske i muške novorođenčadi ( $p = 0,263$ ) što je u skladu s rezultatima ranijih istraživanja u kojima se pokazalo kako spol novorođenčadi nema statistički značajan utjecaj na proporcionalnost fetalnog rasta (Landmann i sur., 2006, Roje i sur., 2004). Drugim riječima, iako se muška i ženska novorođenčad u istraživanoj populaciji razlikuju po vrijednostima porođajne mase i duljine, same proporcije tijela iskazane ponderalnim indeksom novorođenčadi ne ovise o spolu.

Zbunjujuće varijable (engl. *confounding variables*) jesu varijable koje koreliraju, pozitivno ili negativno, i s ovisnom i s nezavisnom varijablom nekog istraživanja. Prisutnost nepoznatih zbunjujućih varijabli koje nisu uključene u analizu može dovesti do krive procjene odnosa između nezavisnih i zavisnih varijabli: lažno pozitivnih ili negativnih rezultata te do pristranosti analize rezultata (engl. *bias*) (Pourhoseingholi i sur., 2012). U ovom istraživanju, utjecaj potencijalno zbunjujućih varijabli majke i novorođenčeta: majčinog pregestacijskog ITM, prirasta mase u trudnoći, pariteta i gestacijske dobi novorođenčeta, na antropometrijske karakteristike novorođenčeta, određen je provjerom korelacije antropometrijskih karakteristika novorođenčadi s navedenim potencijalno zbunjujućim varijablama, u svakoj spolnoj skupini novorođenčadi zasebno. Navedene varijable okarakterizirane su kao potencijalno zbunjujuće s

obzirom na ranija istraživanja koja ukazuju na to da bi spomenute varijable mogle imati statistički značajan utjecaj na porođajnu masu i duljinu te ponderalni indeks novorođenčadi, zbog čega bi mogle potencijalno interferirati u analizi podataka (Ali i sur., 2020; Elhddad i sur., 2014; Jerić i sur., 2013; De Carvalho Padilha i sur., 2009; Miletić i sur., 2007; Roje i sur., 2004). Za potencijalno zbunjujuće varijable za koje je utvrđen statistički značajan stupanj korelacije s antropometrijskim karakteristikama novorođenčadi, kao što su prirast majčine mase u trudnoći, paritet i gestacijska dob novorođenčeta u ženskoj spolnoj skupini te pregestacijski ITM, prirast majčine mase u trudnoći i gestacijska dob novorođenčeta u muškoj spolnoj skupini novorođenčadi, provjerena je i moguća povezanost s polimorfizmima 5-HTTLPR, rs25531 i STin2. Ni za jednu potencijalno zbunjujuću varijablu nije utvrđena razlika između skupina određenog genotipa, bez obzira na analizirani polimorfizam ili spol novorođenčeta. Iz tog razloga, prethodno opažena povezanost antropometrijskih karakteristika novorođenčadi i potencijalno zbunjujućih karakteristika majki i novorođenčadi mogla se zanemariti prilikom usporedbe sudionika određenog genotipa po porođajnoj masi i duljini te ponderalnom indeksu.

Utvrđivanje potencijalne povezanosti polimorfizama 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 s antropometrijskim karakteristikama novorođenčadi provedeno je zasebno za svaki od polimorfizama grupiranjem novorođenčadi u skupine određenog genotipa i usporedbom navedenih skupina s obzirom na porođajnu masu i duljinu te ponderalni indeks. Analiza prikupljenih podataka provedena je zasebno u ženskoj (N=80) i muškoj (N=107) spolnoj skupini s obzirom na utvrđenu statistički značajnu razliku u porođajnoj masi i duljini između ženske i muške novorođenčadi ( $p < 0,0001$ ), dok je u slučaju ponderalnog indeksa, uz zasebne analize u svakoj spolnoj skupini, provedena i dodatna analiza na ukupnom uzorku (N=187). U slučaju porođajne mase, nije uočena statistička značajna razlika između genotipnih skupina novorođenčadi ni u jednoj spolnoj skupini, ni kod jednog analiziranog polimorfizma gena *SLC6A4*. Slični rezultati dobiveni su i za porođajnu duljinu gdje također nije zabilježena statistička značaja razlika između skupina novorođenčadi različitog genotipa kod sva tri analizirana polimorfizma, bez obzira na spol novorođenčadi. Zanimljivo, iako prvotnom analizom povezanosti polimorfizma rs25531 i antropometrijskih karakteristika novorođenčadi nije zabilježen statistički značajan efekt, u muškoj spolnoj skupini je *post-hoc* Tukey testom, nakon isključivanja skupine genotipa S/L<sub>G</sub> s vrlo malim brojem ispitanika (N=2), dobivena statistički značajna razlika u porođajnoj duljini između različitih rs25531 skupina, specifično, između ispitanika genotipova S/L<sub>A</sub> i L<sub>A</sub>/L<sub>G</sub> ( $p = 0,009$ ). S druge strane, statistički značajna razlika u ponderalnom indeksu između novorođenčadi različitog genotipa za STin2



polimorfizam opažena je u ukupnom uzroku i u skupini ženske, ali ne i muške novorođenčadi. U slučaju polimorfizama 5-HTTLPR i rs25531 nije zabilježena statistička značajna razlika u ponderalnom indeksu između skupina novorođenčadi različitog genotipa, niti u jednoj spolnoj skupini, niti u ukupnom uzorku. Rezultati povezanosti promotorskog polimorfizma 5-HTTLPR s porođajnom masom novorođenčadi u skladu su s rezultatima koje bilježe Conley i Rauscher (Conley i Rauscher, 2013). U istraživanju na parovima jednojajčanih i dvojajčanih blizanaca nisu pronašli utjecaj 5-HTTLPR polimorfizma na razlike u porođajnoj masi unutar parova blizanaca, niti na individualnoj razini. Međutim, kao jedan od nedostataka istraživanja navode kako za određen broj ispitanika podaci o porođajnoj masi nisu u potpunosti prikupljeni što je nepovoljno utjecalo na veličinu analiziranog uzorka i statističku snagu istraživanja (Conley i Rauscher, 2013). S druge strane, različita istraživanja (Dias i sur., 2016; Üçeyler i sur, 2010) ukazuju na medijatorsku ulogu fizičke aktivnosti u povezanosti 5-HTTLPR polimorfizma s masom pri čemu se rezultati navedenih istraživanja ne podudaraju u potpunosti. U istraživanju na SERT<sup>-/-</sup> miševima (Üçeyler i sur, 2010), snižena ekspresija transportera SERT, koja je u populacijskim istraživanjima povezana sa S alelom (Iurescia i sur, 2016), bila je u vezi s pretilošću uslijed smanjene fizičke aktivnosti. U drugom je istraživanju (Dias i sur., 2016) prekomjerna tjelesna masa opažena kod fizički neaktivnih nositelja L alela, koji se povezuje s povišenom ekspresijom transportera SERT (Iurescia i sur, 2016). Iz navedenih istraživanja mogla bi se pretpostaviti veza 5-HTTLPR genotipa s fizičkom aktivnošću i tjelesnom masom te moguća kompenzacijska uloga fizičke aktivnosti u ublažavanju efekata genotipa. Ipak, ovu pretpostavku nije bilo moguće provjeriti u tumačenju rezultata dobivenih na našem uzroku novorođenčadi jer se fizička aktivnost nije mogla uzeti u obzir kao mogući posrednik u vezi između 5-HTTLPR genotipa i tjelesne mase. S druge strane, Oberlander i sur. zamijetili su određen utjecaj polimorfizma 5-HTTLPR na porođajnu masu novorođenčadi koja je prenatalno bila izložena SSRI terapiji čiji je krajnji efekt analogan sniženoj ekspresiji serotoninskog transportera, a koja se također povezuje sa S alelom (Iurescia i sur, 2016). U ovom istraživanju navodi se kako je novorođenčad S/L genotipa imala značajno niže vrijednosti porođajne mase u usporedbi s novorođenčadi ostalih genotipova. Pored toga, kada je utjecaj gestacijske dobi uzet u obzir, navode kako su vrijednosti porođajne mase novorođenčadi S/S genotipa koja je prenatalno bila izložena SSRI terapiji bile značajno više u usporedbi s porođajnom masom novorođenčadi koja nije bila izložena spomenutoj terapiji (Oberlander i sur., 2008). Iz navedenog bi se mogao pretpostaviti aditivni efekt alela S i SSRI terapije na porođajnu masu. Ispitivanja o potencijalnoj povezanosti polimorfizma zamjene pojedinačnog nukleotida rs25531 s antropometrijskim vrijednostima novorođenčadi također su zabilježena u literaturi.

Rezultati prikazani u poglavlju 4.5. u skladu su s rezultatima koje bilježe Mueller i sur. koji navode kako se porođajne mase novorođenčadi grupirane u skupine prema razini genotipom određene transkripcijske aktivnosti gena *SLC6A4* nisu statistički značajno razlikovale (L<sub>G</sub>/L<sub>G</sub>, S/L<sub>G</sub>, S/S: 3345 ± 433 g; S/L<sub>A</sub>, L<sub>A</sub>/L<sub>G</sub>: 3532 ± 437 g; L<sub>A</sub>/L<sub>A</sub>: 3501 ± 386 g). Međutim, s obzirom na to da raspodjela genotipova unutar analiziranog uzorka ispitanika (N=126) nije bila u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, autori naglašavaju kako bi dobivene rezultate trebalo tumačiti s oprezom (Mueller i sur., 2010). Povezanost intronskog polimorfizma varijabilnog broja ponavljanja tandemskih sljedova STin2 i antropometrijskih karakteristika novorođenčadi dosad nije ispitana. Određena istraživanja provedena na populacijama djece i odraslih nisu uočila značajnu poveznicu između iznosa tjelesne mase i različitih genotipova polimorfizma STin2 (Uzun i sur., 2015), dok druga istraživanja navode povezanost alela STin2.10 te haplotipa L10 s prekomjernom tjelesnom masom i pretilošću te zaštitni učinak haplotipa S12 od nastanka pretilosti (Manco i sur., 2020; Dias i sur., 2016). U okviru ovog diplomskog rada nije zabilježen efekt STin2 polimorfizma na porođajnu masu i duljinu novorođenčadi u muškoj i ženskoj spolnoj skupini. Ipak, sagledavanjem apsolutnih vrijednosti porođajne mase u ženskoj, a naročito u muškoj spolnoj skupini te porođajne duljine u muškoj spolnoj skupini, može se zamijetiti kako novorođenčad s barem jednim alelom STin2.9 (genotipovi 12/9 i 10/9) ima niže vrijednosti porođajnih masa i duljina nego novorođenčad ostalih genotipova, iako ne statistički značajno. Na nedovoljno visoku razinu statističke značajnosti ovog nalaza mogla je utjecati činjenica kako su ispitanici genotipova 12/9 i 10/9 u analiziranom uzorku populacije zastupljeni u relativno malom broju te činjenica kako u ženskoj spolnoj skupini nisu uopće zabilježeni ispitanici genotipa 10/9. S druge strane, statistički značajna razlika u ponderalnom indeksu između novorođenčadi različitog genotipa za STin2 polimorfizam, opažena u ukupnom uzorku ( $p = 0,026$ ) i u skupini ženske ( $p = 0,024$ ), ali ne i muške novorođenčadi, je na granici značajnosti. Iz tog razloga, kao i zbog vrlo niske zastupljenosti pojedinih genotipova, dobiveni rezultati bi se, prema mogućnostima, trebali potvrditi na većem broju ispitanika.

Prevalencija prekomjerne tjelesne mase i pretilosti u konstantnom je porastu posljednjih nekoliko desetljeća te predstavlja jedan od vodećih javnozdravstvenih problema na globalnoj razini. Prekomjerna tjelesna masa glavni je čimbenik rizika za nastanak niza kroničnih bolesti, poput kardiovaskularnih bolesti koje su vodeći uzrok smrti diljem svijeta. Prekomjerna tjelesna masa također može dovesti do razvoja dijabetesa i ostalih povezanih stanja, ali i do poremećaja mišićno-koštanog sustava poput osteoartritisa te do nastanka nekih vrsta tumora. Rizik razvoja navedenih nezaraznih (engl. *noncommunicable*) bolesti znatno se povećava i kada osoba ima

tek neznatan višak kilograma te postaje ozbiljniji s povećanjem ITM (who.int.; Musić Milanović i Bukal, 2018). Prepoznavanje potencijalnih bioloških, genskih, okolišnih i ostalih faktora rizika koji dovode do nastanka debljine, s ciljem predviđanja nastanka, prevencije i liječenja, od iznimne je važnosti (Ogunbode i sur., 2011). Serotonin predstavlja multifunkcionalnu signalnu molekulu uključenu u širok raspon fizioloških funkcija, ali i patoloških stanja. Sve veći broj dokaza ukazuje na njegovu ulogu u nastanku pretilosti i drugih metaboličkih poremećaja (Yabut i sur., 2019; Crane i sur., 2015; Namkung i sur., 2015). Poznato je kako centralni serotonin sudjeluje u održavanju energijske homeostaze tako da snižava unos energije smanjenjem apetita te povećava potrošnju energije aktivacijom smeđeg masnog tkiva putem simpatičkog živčanog sustava (Namkung i sur., 2015). S druge strane, periferni serotonin ima ključnu ulogu u regulaciji homeostaze glukoze i lipida djelujući na različite organe i tipove stanica. Pokazalo se kako serotonin proizveden u  $\beta$  stanicama gušterače potiče izlučivanje inzulina, dok onaj proizveden u crijevima djeluje na jetru tako da promiče glukoneogenezu te zaustavlja unos glukoze u jetru (El-Merahbi i sur., 2015; Sumara i sur., 2012; Paulmann i sur., 2009). Osim toga, pojačana serotonin signalizacija u bijelom masnom tkivu potiče lipolizu te smanjuje unos glukoze i proizvodnju adiponektina (El-Merahbi i sur., 2015; Sumara i sur., 2012; Uchida-Kitajima i sur., 2008). S obzirom na to da transporter SERT ima veliku ulogu u regulaciji serotonin aktivnosti, razumijevanje i razjašnjavanje njegove uloge u regulaciji energijske ravnoteže i patofiziologiji pretilosti od ključne je važnosti. Niz istraživanja provedenih na miševima (Zha i sur., 2017; Üçeyler i sur., 2010; Chen i sur., 2001) i ljudima (Giannaccini i sur., 2013; Lewis i sur., 2010; Oberlander i sur., 2008) potvrđuje njegovu neizostavnu, ali i još uvijek nedovoljno istraženu ulogu kao jednog od značajnih faktora uključenih u regulaciju tjelesne mase.

Genotipizacija polimorfizama 5-HTTLPR, rs25531 i STin2 provedena je po protokolu preuzetom iz literature (Blažević i sur., 2017; Hranilović i sur., 2000) uz određene izmjene. Postupak optimizacije metode obuhvaćao je modifikaciju PCR reakcije i postupka agarozne gel elektroforeze. Pokazalo se kako povećanje količine korištenog kalupa genomske DNA u PCR reakciji, kao i korištenje različitih vrsta tkiva iz kojih je izolirana genomska DNA, nije utjecalo na povećanje efikasnosti same reakcije umnažanja. S druge strane, zamijećena je značajna razlika u efikasnosti PCR reakcija između različitih PCR uređaja. Pored toga, izmjenom uvjeta PCR reakcije i povećanjem trajanja vremena elongacije postignut je zadovoljavajući intenzitet signala specifičnih PCR amplikona te je znatno umanjen stupanj pojave nespecifičnih amplifikacija, dok je povećanje broja ciklusa umnažanja rezultiralo slabijom specifičnom

amplifikacijom i pojavom nespecifičnog umnažanja. Optimizacija postupka agarozne gel elektroforeze obuhvaćala je utvrđivanje optimalnog volumena boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina, kao i utvrđivanje optimalne koncentracije agaroznog gela. Pri tome je povećana količina boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina korištena samo za vizualizaciju produkata restrikcijske digestije kod kojih je povećanjem volumena boje postignut jači intenzitet signala. Za vizualizaciju PCR amplikona korišten je manji volumen boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina zbog pojave prevelikog intenziteta signala nespecifičnih fragmenata i pozadinskog obojenja do kojih dolazi zbog korištenja prevelike koncentracije boje. Inicijalno predviđena koncentracija agaroznog gela smanjena je iz praktičnih razloga, dok je u isto vrijeme uspješno zadržan zadovoljavajući stupanj razdvajanja i vizualizacije fragmenata DNA. Naposljetku, utvrđeno je kako se *post-staining* metoda (bojanje gela nakon agarozne gel elektroforeze u otopini boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina) nije pokazala superiornijom u odnosu na *pre-staining* metodu (boja za vizualizaciju nukleinskih kiselina nalazi se u sastavu agaroznog gela). Prilikom elektroforeze PCR amplikona, primijećeno je kako veličine PCR amplikona ne odgovaraju očekivanim vrijednostima, već su fragmenti DNA na gelu bili pozicionirani tako da su izgledali približno 30 bp dulji od očekivanih vrijednosti. Potencijalno objašnjenje opaženog je da specifičan nukleotidni sastav u dobivenim PCR amplikonima utječe na njihovu migraciju u gelu. Naime, nukleotidna sekvenca 5-HTTLPR PCR amplikona iznimno je bogata ponavljajućim GC nukleotidnim parovima te je iz tog razloga vrlo vjerojatna mogućnost nastanka sekundarnih DNA struktura, a time i sporija migracija takvih fragmenata DNA kao posljedica interakcija s porama gela (Blažević i sur., 2017; Lee i sur., 2012). Takva pretpostavka mogla bi se potencijalno ispitati provedbom elektroforeze PCR amplikona u denaturirajućim uvjetima kako bi se pobliže mogla utvrditi migracija fragmenata DNA bez prisustva i utjecaja sekundarnih struktura u DNA.

Provedeno istraživanje ima nekoliko prednosti. Prvo, skupina ispitanika u ovom istraživanju je dobro definirana i regrutirana s istog geografskog područja koje je naseljeno etnički homogenim stanovništvom pretežno hrvatskog podrijetla. Drugo, provedena je iscrpna analiza prikupljenih bioloških uzoraka koja je uključivala genotipizaciju sveukupno tri različita polimorfizma gena *SLC6A4*, promotorskog polimorfizma duljine, polimorfizma zamjene pojedinačnog nukleotida i intronskog polimorfizma varijabilnog broja ponavljanja tandemskih sljedova. Pri tome je funkcionalna važnost i povezanost navedenih polimorfizama s antropometrijskim varijablama novorođenčeta koje su u fokusu ovog istraživanja potkrepljena ranijim istraživanjima i stručnom literaturom. Uz to, temeljito prikupljeni klinički podaci

ispitanika koji su obuhvaćali detaljan opis majčinih karakteristika te antropometrijskih karakteristika novorođenčadi omogućili su provedbu opširne i sistematične analize statističke značajnosti dobivenih nalaza. Treće, definiranjem i prihvaćanjem određenih isključnih kriterija, kao što su višeplodna trudnoća, dijagnoza gestacijskog dijabetesa mellitusa, preniska vrijednost majčinog pregestacijskog ITM, intrauterina restrikcija rasta te prijevremeni porođaj, izvršen je probir ukupnog broja uzoraka uključenog u analizu kojim je dobiven homogen populacijski uzorak što je pozitivno utjecalo na vjerodostojnost i relevantnost dobivenih rezultata. Pored toga, nepristranoj analizi podataka jednako je doprinijela i opširna analiza utjecaja potencijalno zbunjujućih varijabli koje su obuhvaćale različite karakteristike novorođenčeta, ali i majke, poput gestacijske dobi pri porodu, pariteta, pregestacijskog ITM te prirasta mase u trudnoći. S druge strane, određeni aspekti provedenog istraživanja mogli bi se unaprijediti. U prvome redu, nakon prihvaćanja zadanih isključnih kriterija, inicijalni broj ispitanika (N=328) značajno je reduciran (N=187) te je taj efekt dodatno potenciran dihotomizacijom analiziranog uzorka populacije na žensku (N=80) i mušku (N=107) spolnu skupinu što se, posljedično, negativno odrazilo na samu statističku snagu istraživanja. Povećanje ukupnog broja ispitanika pridonijelo bi vjerodostojnosti samih rezultata. Nastavno na to, zamijećena neuniformnost raspodjele ispitanika s obzirom na spol, kao i odsutnost određenih skupina genotipova u ukupnom uzorku ili uzorku pojedinih spolnih skupina, mogle bi se prevenirati i korigirati na analogan način. Naposljetku, u okviru ovog rada nisu ispitani utjecaji nepoznatih potencijalno zbunjujućih varijabli, poput pušenja i/ili konzumacije alkohola za vrijeme trudnoće. S obzirom na određene naznake iz literature kako konzumacija alkoholnih pića i/ili duhanskih proizvoda za vrijeme trudnoće može značajno utjecati na antropometrijske karakteristike novorođenčadi (Vila Candel i sur., 2015; Virji, 1991), testiranje spomenutih varijabli moglo bi doprinijeti boljem razumijevanju i kvalitetnijoj interpretaciji podataka i rezultata. Međutim, navedene varijable u okviru ovog rada ipak nisu uzete u obzir jer su podaci o konzumaciji alkohola i duhanskih proizvoda prikupljeni za premali broj ispitanika što bi se moglo nepovoljno odraziti na statističku snagu istraživanja. S obzirom na sve navedeno, ukazuje se potreba za provođenjem dodatnih populacijskih istraživanja na većem broju ispitanika, ali i studija o mehanizmu kojim bi spomenuti polimorfizmi, kao i ostali čimbenici, mogli utjecati na razinu ekspresije gena *SLC6A4*. Također, korelacijska analiza ne implicira nužno i kauzalnost, tj. legitimna ekstrapolacija uzročno-posljedične veze između dvije ili više varijabli isključivo na temelju njihove korelacije nije moguća, stoga su za povećanje vjerodostojnosti eventualno opaženih genetičkih ili drugih povezanosti ključna biološka *in vitro* i *in vivo* istraživanja. Pored toga, kao mogući prijedlog za nadogradnju postojećeg i definiranje budućih istraživanja također se može

navesti ispitivanje povezanosti epigenetičke regulacije ekspresije i antropometrijskih karakteristika novorođenčadi, s obzirom na određene naznake u literaturi o predominantnoj ulozi epigenetičkih nad genetičkim mehanizmima regulacije ekspresije gena *SLC6A4* (Blažević i sur., 2017; Iurescia i sur., 2017). Takav pristup mogao bi objasniti dosad zabilježeno nepodudaranje rezultata dobiveno različitim istraživanjima izravnog odnosa genotipa i fenotipa (Trujillo-Hernández i Flores-Peña, 2021; Iurescia i sur., 2017). Zaključno, razumijevanje bioloških i ostalih čimbenika koji utječu na antropometrijske karakteristike novorođenčadi moglo bi doprinijeti razvoju programa rane intervencije i strategije praćenja visokorizičnih pojedinaca s ciljem prevencije razvoja energijske neravnoteže i pratećih komorbiditeta tijekom daljnjeg životnog vijeka.

## 6. ZAKLJUČCI

**Uzorak novorođenčadi u ovom istraživanju (N=187) bio je reprezentativan za hrvatsku populaciju s obzirom na antropometrijske parametre novorođenčadi.** Zabilježene vrijednosti porođajne mase, duljine i ponderalnog indeksa novorođenčadi normalno su distribuirane i u skladu s hrvatskim prosjekom.

**Istraživani populacijski uzorak bio je u genetičkoj ravnoteži.**

U slučaju sva tri analizirana polimorfizma gena *SLC6A4* opažene frekvencije genotipova nisu statistički značajno odstupale od očekivanih, tj. nije uočeno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže, bez obzira na spol novorođenčadi.

Utvrđene frekvencije genotipova i alela polimorfizama 5-HTTLPR (L/L (37,4 %), S/L (45,5 %), S/S (17,1 %); L (60,2 %), S (39,8 %)), rs25531 (S/S (17,1 %), S/L<sub>G</sub> (2,1 %), S/L<sub>A</sub> (43,3 %), L<sub>A</sub>/L<sub>G</sub> (8 %), L<sub>A</sub>/L<sub>A</sub> (29,5 %); S (39,8 %), L<sub>A</sub> (55,1 %) L<sub>G</sub> (5,1 %)) i STin2 (12/12 (35,8 %), 12/10 (45,5 %), 10/10 (13,9 %), 12/9 (2,1 %), 10/9 (2,7 %); STin2.12 (59,6 %), STin2.10 (38 %), STin2.9 (2,4 %)) u skladu su s dosad zabilježenom distribucijom unutar hrvatske populacije. Genotip L<sub>G</sub>/L<sub>G</sub> polimorfizma rs25531 i genotip 9/9 polimorfizma STin2 nisu zabilježeni u ukupnom uzorku populacije, dok je genotip 10/9 polimorfizma STin2 zabilježen samo u muškoj spolnoj skupini.

**Antropometrijske karakteristike novorođenčadi bile su povezane s različitim karakteristikama majke (pregestacijski ITM, prirast majčine mase u trudnoći, paritet) i novorođenčeta (spol i gestacijska dob) koje su, iz tog razloga, uzete u obzir u analizi.**

U ženskoj spolnoj skupini ponderalni indeks i porođajna masa bili su statistički značajno povezani s prirastom mase u trudnoći, dok je s paritetom bio povezan samo ponderalni indeks. U muškoj spolnoj skupini je samo porođajna masa bila statistički značajno povezana s karakteristikama majke: pregestacijskim ITM-om i prirastom mase u trudnoći.

Ni kod jednog od tri analizirana polimorfizma gena *SLC6A4* nije uočena statistički značajna razlika između novorođenčadi različitog genotipa, u slučaju svih analiziranih potencijalno zbunjujućih varijabli, bez obzira na spol novorođenčeta. Iz tog razloga se prethodno opažena

povezanost antropometrijskih karakteristika novorođenčadi i potencijalno zbunjujućih karakteristika majki i novorođenčadi mogla zanemariti u daljnjoj analizi podataka.

**Porodajna masa i duljina novorođenčadi, ali ne i ponderalni indeks, ovise o spolu i gestacijskoj dobi novorođenčadi. Ponderalni indeks novorođenčadi je prikladnija statistička veličina za procjenu uhranjenosti od porodajne mase i duljine.**

Ženska i muška novorođenčad su se statistički značajno razlikovala u porodajnoj masi i duljini, ali ne i u ponderalnom indeksu. U obje spolne skupine gestacijska je dob bila značajno pozitivno korelirana s porodajnom masom i duljinom, ali ne i ponderalnim indeksom.

**U istraživanom uzorku novorođenčadi porodajna masa i duljina nisu bile povezane ni s jednim polimorfizmom u genu *SLC6A4*, bez obzira na spol novorođenčadi.**

Nije uočena statistička značajna razlika između skupina novorođenčadi različitog genotipa, ni u jednoj spolnoj skupini, ni kod jednog analiziranog polimorfizma gena *SLC6A4*. Nakon isključivanja skupine genotipa S/L<sub>G</sub> s vrlo malim brojem ispitanika (N=2), u muškoj spolnoj skupini dobivena je statistički značajna razlika u porodajnoj duljini između različitih rs25531 skupina, specifično, između ispitanika genotipova S/L<sub>A</sub> i L<sub>A</sub>/L<sub>G</sub> (p = 0,009).

**Ponderalni indeks novorođenčadi bio je statistički značajno povezan s polimorfizmom STin2 pri čemu je navedena korelacija ovisila o spolu novorođenčeta. Polimorfizmi 5-HTTLPR i rs25531 nisu bili povezani s ponderalnim indeksom, bez obzira na spol novorođenčeta.**

Statistički značajna razlika u ponderalnom indeksu između novorođenčadi različitog genotipa za polimorfizam STin2 opažena je u ukupnom uzorku (N=187) i u skupini ženske (N=80), ali ne i muške novorođenčadi (N=107). Navedena razlika granično je značajna čemu je doprinio mali broj sudionika u pojedinim skupinama genotipa. U slučaju polimorfizama 5-HTTLPR i rs25531 nije zabilježena statistička značajna razlika u ponderalnom indeksu između skupina novorođenčadi različitog genotipa, niti u jednoj spolnoj skupini, niti u ukupnom uzorku.



**Povećanje ukupnog broja ispitanika, epigenetička istraživanja te studije molekularnih mehanizama pridonijele bi vjerodostojnosti dobivenih rezultata.**

S obzirom na znanstvenu literaturu te nepodudaranja rezultata različitih istraživanja, očekuje se tek manji učinak genotipa na antropometrijske karakteristike novorođenčadi što doprinosi smanjenju statističke snage istraživanja. Osim toga, zbog podjela ukupnog uzorka na skupine određenog genotipa te na spolne skupine, finalni broj uzoraka za pojedine analize bio je smanjen što je negativno utjecalo na vjerodostojnost tih analiza. Pojedine skupine genotipa bile su zastupljene s vrlo malim brojem ispitanika, a neke nisu bile uopće ni prisutne u istraživanom uzorku. U svrhu povećanja statističke snage istraživanja i značajnosti pojedinih rezultata, bilo bi potrebno povećati broj sudionika, pri čemu bi u obzir trebalo uzeti spol i reprezentativnost uzorka. Također, istraživanja epigenetičke regulacije ekspresije gena *SLC6A4*, kao i molekularnih mehanizama u podlozi utjecaja genotipa na antropometrijske karakteristike novorođenčadi, moglo bi objasniti dosad zabilježeno nepodudaranje rezultata različitih istraživanja odnosa genotipa i antropometrijskih karakteristika u ljudi.

**Efikasnost PCR reakcije ovisila je o PCR uređaju, povećanju trajanja vremena elongacije i broju ciklusa umnažanja, ali ne i o količini kalupa genomske DNA i tipu tkiva iz kojeg je izolirana DNA.**

**Povećanje volumena boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina uzrokovalo je povećan intenzitet signala fragmenata DNA u agaroznom gelu pri čemu isti nije ovisio o bojanju gela prije ili nakon agarozne gel elektroforeze.**

**Razumijevanje molekularnih čimbenika povezanih s antropometrijskim karakteristikama novorođenčadi moglo bi doprinijeti prevenciji metaboličkih poremećaja i pratećih komorbiditeta u odrasloj dobi.**

## 7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

5-HT	5-hidroksitriptamin
5-HTTLPR	engl. <i>5-HT transporter linked polymorphic region</i>
AADC	engl. <i>aromatic-L-amino-acid decarboxylase</i>
AP2	engl. <i>activator protein 2</i>
bp	engl. <i>base pair</i>
CpG	engl. <i>cytosine-phosphate-guanine</i>
CTCF	engl. <i>CCTC-binding factor</i>
DAT	engl. <i>dopamine transporter</i>
DEPC	engl. <i>diethyl pyrocarbonate</i>
GI	Gastrointestinalni
IBS	engl. <i>irritable bowel syndrome</i>
IL	Interleukin
ITM	Indeks tjelesne mase
kb	Kilo baza
MAO	Monoaminooksidaza
miR	MikroRNA
NaSSA	Noradrenergički i specifični serotoninergički antidepresivi
NET	engl. <i>norepinephrine transporter</i>
ns	engl. <i>non-significant</i>
OR	engl. <i>odds ratio</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
rcf	engl. <i>relative centrifugal force</i>

rp	Pearsonov koeficijent korelacije
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i>
rs	Spearmanov koeficijent korelacije
SARI	engl. <i>serotonin antagonist and reuptake inhibitors</i>
SERT	engl. <i>serotonin transporter</i>
SLC6A4	engl. <i>solute carrier family 6 member 4</i>
SNP	engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>
SNRI	engl. <i>serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors</i>
SPARI	engl. <i>serotonin partial agonist reuptake inhibitor</i>
SSRI	engl. <i>selective serotonin reuptake inhibitor</i>
SIPPS	Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina
STin2	engl. <i>serotonin transporter intron 2</i>
TAE	Tris-acetat-EDTA
TCA	Triciklički antidepresivi
TPH	engl. <i>tryptophan hydroxylase</i>
VNTR	engl. <i>variable number tandem repeat</i>
YB-1	engl. <i>Y-box binding protein 1</i>

## 8. LITERATURA

Ali K, Quarashi SA, Sultana S, Rahman Z. Observation of Birth Weight of Babies in relation on maternal age, parity and gestational age in Tertiary Level Hospital. *Bangladesh J Med Sci*, 2020, 19, 291–5.

Ali FR, Vasiliou SA, Haddley K, Paredes UM, Roberts JC, Miyajima F, et al. Combinatorial interaction between two human serotonin transporter gene variable number tandem repeats and their regulation by CTCF. *J Neurochem*, 2010, 112, 296–306.

*Analysing DNA*, [www.qiagen.com/us](http://www.qiagen.com/us), pristupljeno 1.6.2023.

*Aromatic-L-amino-acid decarboxylase*, <https://www.expasy.org/> (b); pristupljeno 1.11.2021.

Atkins P, de Paula J, Keeler J. *Atkins' Physical Chemistry*, 11th edition. Oxford, Oxford University Press, 2018, str. 421, 422.

Bah J, Westberg L, Baghaei F, Henningsson S, Rosmond R, Melke J, et al. Further exploration of the possible influence of polymorphisms in HTR2C and 5HTT on body weight. *Metabolism*, 2010, 59, 1156–63.

Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ Jr, Stryer L. *Biochemistry*, 8th edition. New York, W. H. Freeman & Company, 2015, str. 71, 137, 138.

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

Bogdanović D. (2022) Hitni psihijatrijski sindromi izazvani lijekovima. Specijalistički rad. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu.

Bonnet G, Gómez-Abellán P, Vera B, Sánchez-Romera JF, Hernández-Martínez AM, Sookoian S, et al. Serotonin-transporter promoter polymorphism modulates the ability to control food intake: Effect on total weight loss. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61, 1700494.

Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* 13th edition. McGraw Hill Education, 2018, str. 225.

Chen JJ, Li Z, Pan H, Murphy DL, Tamir H, Koepsell H, et al. Maintenance of Serotonin in the Intestinal Mucosa and Ganglia of Mice that Lack the High-Affinity Serotonin Transporter:

Abnormal Intestinal Motility and the Expression of Cation Transporters. *J Neurosci*, 2001, 21, 6348–61.

Cheng P, Zhang J, Wu Y, Liu W, Zhu J, Chen Z, et al. 5-HTTLPR polymorphism and depression risk in Parkinson's disease: an updated meta-analysis. *Acta Neurol Belg*, 2021, 121, 933–40.

Conley D, Rauscher E. Genetic Interactions with Prenatal Social Environment: Effects on Academic and Behavioral Outcomes. *J Health Soc Behav*, 2013, 54, 109–27.

Cooper A, Woulfe D, Kilic F. Post-translational modifications of serotonin transporter. *Pharmacol Res*, 2018, 140, 7–13.

Crane JD, Palanivel R, Mottillo EP, Bujak AL, Wang H, Ford RJ, et al. Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat Med*, 2015, 21, 166–72.

Culej, J, Nikolac Gabaj, N, Štefanović, M, Karlović, D. Prediction of Schizophrenia Using MAOA-uVNTR Polymorphism: A Case–Control Study. *Indian J Psychiatry* 2020, 62, 80–86.

Culej J, Štefanović M, Čelap I, Nikolac N, Karlović D. Serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) in Croatian population. *Mol Biol Rep*, 2014, 42, 553–8.

De Carvalho Padilha P, Accioly E, Chagas C, Portela E, Da Silva CL. Birth Weight Variation According to Maternal Characteristics and Gestational Weight Gain in Brazilian Women. *Nutr Hosp*, 2009, 24, 207–212.

De Ponti F. Pharmacology of serotonin: what a clinician should know. *Gut*, 2004, 53, 1520–1535.

Di Giammartino DC, Nishida K, Manley JL. Mechanisms and Consequences of Alternative Polyadenylation. *Mol Cell*. 2011, 43, 853–66.

Dias H, Muc M, Padez C, Manco L. Association of polymorphisms in 5-HTT (SLC6A4) and MAOA genes with measures of obesity in young adults of Portuguese origin. *Arch Physiol Biochem*, 2016, 122, 8–13.

Elhddad AS, Fairlie F, Lashen H. Impact of gestational weight gain on fetal growth in obese normoglycemic mothers: a comparative study. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2014, 93, 771–7.

El-Merahbi R, Löffler M, Mayer A, Sumara G. The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. *FEBS Letters*, 2015, 589, 1728–1734.

Feinn R, Nellissery M, Kranzler HR. Meta-analysis of the association of a functional serotonin transporter promoter polymorphism with alcohol dependence. *Am J Med Genet*, 2005, 133B, 79–84.

Francetić I i sur. Farmakoterapijski priručnik. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 676-689.

Fuemmeler BF, Agurs-Collins TD, McClernon FJ, Kollins SH, Kail ME, Bergen AW, et al. Genes Implicated in Serotonergic and Dopaminergic Functioning Predict BMI Categories. *Obesity*, 2008, 16, 348–55.

Gadow KD, DeVincent CJ, Siegal VI, Olvet DM, Kibria S, Kirsch SF, et al. Allele-specific associations of 5-HTTLPR/rs25531 with ADHD and autism spectrum disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013, 40, 292–7.

Gao Z, Yuan H, Sun M, Wang Z, He Y, Liu D. The association of serotonin transporter gene polymorphism and geriatric depression: A meta-analysis. *Neurosci Lett*, 2014, 578, 148–52.

Giannaccini G, Betti L, Palego L, Marsili A, Santini F, Pelosini C, et al. The expression of platelet serotonin transporter (SERT) in human obesity. *BMC Neurosci*, 2013, 14, 128.

Gluck ME. Stress response and binge eating disorder. *Appetite*, 2006, 46, 26–30.

Gomes CKF, Vieira-Fonseca T, Melo-Felippe FB, de Salles Andrade JB, Fontenelle LF, Kohlrausch FB. Association analysis of *SLC6A4* and *HTR2A* genes with obsessive-compulsive disorder: Influence of the STin2 polymorphism. *Compr Psychiatry*, 2018, 82, 1–6.

Gonda X, Fountoulakis KN, Juhasz G, Rihmer Z, Lazary J, Laszik A, et al. Association of the s allele of the 5-HTTLPR with neuroticism-related traits and temperaments in a psychiatrically healthy population. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2008, 259, 106–13.

Gressier F, Calati R, Balestri M, Marsano A, Alberti S, Antypa N, et al. The 5-HTTLPR Polymorphism and Posttraumatic Stress Disorder: A Meta-Analysis: 5-HTTLPR and PTSD: A Meta-Analysis. *J Trauma Stress*, 2013, 26, 645–53.

Heils A, Teufel A, Petri S, Stöber G, Riederer P, Bengel D, et al. Allelic Variation of Human Serotonin Transporter Gene Expression. *J Neurochem*, 1996, 66, 2621–4.

Hranilović D, Schwab SG, Jernej B, Knapp M, Lerer B, Albus M, et al. Serotonin transporter gene and schizophrenia: evidence for association/linkage disequilibrium in families with affected siblings. *Mol Psychiatry*, 2000, 5, 91–5.

Hranilović D, Štefulj J, Furac, I, Kubat M, Balija M, Jernej B. Serotonin transporter gene promoter (5-HTTLPR) and intron 2 (VNTR) polymorphisms in Croatian suicide victims. *Biol Psychiatry*, 2003, 54, 884–889.

Hranilović D, Štefulj J, Schwab S, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Jernej B, et al. Serotonin transporter promoter and intron 2 polymorphisms: relationship between allelic variants and gene expression. *Biol Psychiatry*, 2004, 55, 1090–4.

Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, et al. Serotonin Transporter Promoter Gain-of-Function Genotypes Are Linked to Obsessive-Compulsive Disorder. *Am J Hum Genet*, 2006, 78, 815–26.

Ikegame T, Hidaka Y, Nakachi Y, Murata Y, Watanabe R, Sugawara H, et al. Identification and functional characterization of the extremely long allele of the serotonin transporter-linked polymorphic region. *Transl Psychiatry*, 2021, 11, 119.

Iordanidou M, Tavridou A, Petridis I, Arvanitidis KI, Christakidis D, Vargemezis V, et al. The serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) is associated with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta*, 2010, 411, 167–71.

Iurescia S, Seripa D, Rinaldi M. Role of the 5-HTTLPR and SNP Promoter Polymorphisms on Serotonin Transporter Gene Expression: a Closer Look at Genetic Architecture and *In Vitro* Functional Studies of Common and Uncommon Allelic Variants. *Mol Neurobiol*, 2016, 53, 5510–26.

Iurescia S, Seripa D, Rinaldi M. Looking Beyond the 5-HTTLPR Polymorphism: Genetic and Epigenetic Layers of Regulation Affecting the Serotonin Transporter Gene Expression. *Mol Neurobiol*, 2017, 54, 8386–403.

Jerić M, Roje D, Medić N, Strinić T, Mestrović Z, Vulić M. Maternal pre-pregnancy underweight and fetal growth in relation to institute of medicine recommendations for gestational weight gain. *Early Hum Dev*, 2013, 89, 277–81.

Jiang H, Qiao F, Xu X, Yang Y, Bai Y, Jiang L. Meta-analysis confirms a functional polymorphism (5-HTTLPR) in the serotonin transporter gene conferring risk of bipolar disorder in European populations. *Neurosci Lett*, 2013, 549, 191–6.

Jonnakuty C, Gragnoli C. What do we know about serotonin? *J Cell Physiol*, 2008, 217, 301–306.

Kabir AA, Whelton PK, Khan MM, Gustat J, Chen W. Association of symptoms of depression and obesity with hypertension: the Bogalusa Heart Study. *Am J Hypertens*, 2006, 19, 639–45.

Karlović D. Neurokemija ponašanja s osnovama psihofarmakologije. Zagreb, Medicinska naklada, 2016, str. 108-110, 116.

Katzung BG. Temeljna i klinička farmakologija. Trkulja V, Šalković-Petrišić M, Klarica M, urednici za hrvatsko izdanje, Zagreb, Medicinska naklada, 2020, str. 541.

Kishi T, Elmquist JK. Body weight is regulated by the brain: a link between feeding and emotion. *Mol Psychiatry*, 2005, 10, 132–46.

Klenova E, Scott AC, Roberts J, Shamsuddin S, Lovejoy EA, Bergmann S, Bubb VJ, Royer HD, Quinn JP. YB-1 and CTCF differentially regulate the 5-HTT polymorphic intron 2 enhancer which predisposes to a variety of neurological disorders. *J Neurosci*, 2004, 24, 5966–73.

Kohen R, Cain KC, Mitchell PH, Becker K, Buzaitis A, Millard SP, et al. Association of serotonin transporter gene polymorphisms with poststroke depression. *Arch Gen Psychiatry*, 2008, 65, 1296–302.

Kolčić I, Polašek O, Biloglav Z, Ivanišević M, Pfeifer D, Smolej-Narančić N, et al. Birth weight of healthy newborns in Zagreb area, Croatia. *Coll Antropol*, 2005, 29, 257–62.

Kong E, Sucic S, Monje FJ, Reisinger SN, Savalli G, Diao W, et al. STAT3 controls IL6-dependent regulation of serotonin transporter function and depression-like behavior. *Sci Rep*, 2015, 5, 9009.

Lan MY, Chang YY, Chen WH, Kao YF, Lin HS, Liu JS. Serotonin transporter gene promoter polymorphism is associated with body mass index and obesity in non-elderly stroke patients. *J Endocrinol Invest*, 2009, 32, 119–22.



- Landmann E, Reiss I, Misselwitz B, Gortner L. Ponderal index for discrimination between symmetric and asymmetric growth restriction: Percentiles for neonates from 30 weeks to 43 weeks of gestation. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2006, 19, 157–60.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J Vis Exp* 2012, 62, 3923.
- Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, et al. Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm*, 1994, 95, 157–162.
- Lesch KP, Mössner R. Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? *Biol Psychiatry*, 1998, 44, 179–92.
- Lesch KP, Wolozin BL, Estler HC, Murphy DL, Riederer P. Isolation of a cDNA encoding the human brain serotonin transporter. *J Neural Transm Gen Sect*, 1993, 91, 67–72.
- Lewis AJ, Galbally M, Opie G, Buist A. Neonatal growth outcomes at birth and one month postpartum following in utero exposure to antidepressant medication. *Aust N Z J Psychiatry*, 2010, 44, 482–7.
- Lin Z, Canales JJ, Björgvinsson T, Thomsen M, Qu H, Liu QR, Torres GE, Barak Caine S. Monoamine Transporters: Vulnerable and Vital Doorkeepers. U: Progress in Molecular Biology and Translational Science, Elsevier; 2011, vol. 98, str. 1–46.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. Molecular Cell Biology, 5th edition. New York, W. H. Freeman, 2003, str. 375.
- Lorenz, TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp*, 2012, 63, 3998.
- Lovejoy EA, Scott AC, Fiskerstrand CE, Bubb VJ, Quinn JP. The serotonin transporter intronic VNTR enhancer correlated with a predisposition to affective disorders has distinct regulatory elements within the domain based on the primary DNA sequence of the repeat unit. *Eur J Neurosci*, 2003, 17, 417–20.
- Lucki I. The Spectrum of Behaviors Influenced by Serotonin. *Biol psychiatry*, 1998, 44, 151–162.

Manco L, Machado-Rodrigues AM, Padez C. Association study of common functional genetic polymorphisms in *SLC6A4* (5-HTT) and MAOA genes with obesity in portuguese children. *Arch Physiol Biochem*, 2020, 1–6.

Matthes S, Bader M. Peripheral Serotonin Synthesis as a New Drug Target. *Trends Pharmacol Sci*, 2018, 39, 560–572.

Mergen H, Karaaslan Ç, Mergen M, Deniz Özsoy E, Özata M. LEPR, ADBR3, IRS-1 and 5-HTT Genes Polymorphisms do not Associate with Obesity. *Endocr J*, 2007, 54, 89–94.

Miletić T, Stoini E, Mikulandra F, Tadin I, Roje D, Milić N. Effect of Parental Anthropometric Parameters on Neonatal Birth Weight and Birth Length. *Coll Antropol*, 2007, 31, 993–997.

Miller R, Wanklerl M, Stalder T, Kirschbaum C, Alexander N. The serotonin transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) and cortisol stress reactivity: a meta-analysis. *Mol Psychiatry*, 2013, 18, 1018–24.

Miranda RCK, Genro JP, Campagnolo PDB, Mattevi VS, Vitolo MR, Almeida S. Biallelic and triallelic approaches of 5-HTTLPR polymorphism are associated with food intake and nutritional status in childhood. *J Nutr Biochem*, 2017, 43, 47–52.

*Monoamine oxidase*, <https://www.expasy.org/> (c); pristupljeno 9.11.2021.

Moya PR, Wendland JR, Salemme J, Fried RL, Murphy DL. miR-15a and miR-16 regulate serotonin transporter expression in human placental and rat brain raphe cells. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2013, 16, 621–9.

Mueller A, Brocke B, Fries E, Lesch KP, Kirschbaum C. The role of the serotonin transporter polymorphism for the endocrine stress response in newborns. *Psychoneuroendocrinology*, 2010, 35, 289–96.

Murdoch JD, Speed WC, Pakstis AJ, Heffelfinger CE, Kidd KK. Worldwide Population Variation and Haplotype Analysis at the Serotonin Transporter Gene *SLC6A4* and Implications for Association Studies. *Biol Psychiatry*, 2013, 74, 879–89.

Murphy D, Lerner A, Rudnick G, Lesch K-P. Serotonin Transporter: Gene, Genetic Disorders, and Pharmacogenetics. *Mol Interv*. 2004, 4, 109–23.

Murphy DL, Lesch KP. Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9, 85–96.

Musić Milanović S, Bukal D. Epidemiologija debljine – javnozdravstveni problem. *Medicus*, 2018, 27, 7–13.

Namkung J, Kim H, Park S. Peripheral Serotonin: a New Player in Systemic Energy Homeostasis. *Mol Cells*, 2015, 38, 1023–8.

Nichols DE, Nichols CD. Serotonin Receptors. *Chem Rev*, 2008, 108, 1614–1641.

Noskova, T, Pivac, N, Nedic, G, Kazantseva, A, Gaysina, D, Faskhutdinova, G, et al. Ethnic differences in the serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) in several European populations. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2008, 32, 1735–1739.

Oberlander TF, Bonaguro RJ, Misri S, Papsdorf M, Ross CJD, Simpson EM. Infant serotonin transporter (*SLC6A4*) promoter genotype is associated with adverse neonatal outcomes after prenatal exposure to serotonin reuptake inhibitor medications. *Mol Psychiatry*, 2008, 13, 65–73.

*Obesity and overweight*, <https://www.who.int/> ; pristupljeno 4.8.2022.

Ogilvie AD, Battersby S, Bubb VJ, Fink G, Harmar AJ, Goodwin GM, et al. Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *Lancet*, 1996, 347, 731–3.

Ogunbode AM, Ladipo MMA, Ajayi IO, Fatiregun AA. Obesity: An emerging disease. *Niger J Clin Pract*, 2011, 14, 390.

Palma-Gudiel H, Fañanás L. An integrative review of methylation at the serotonin transporter gene and its dialogue with environmental risk factors, psychopathology and 5-HTTLPR. *Neurosci Biobehav Rev*, 2016, 72, 190–209.

Paulmann N, Grohmann M, Voigt JP, Bert B, Vowinckel J, Bader M, et al. Intracellular Serotonin Modulates Insulin Secretion from Pancreatic  $\beta$ -Cells by Protein Serotonylation. *PLoS Biol*, 2009, 7, e1000229.

*PCR Cycling Parameters—Six Key Considerations for Success*; [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com) (b), pristupljeno 25.5.2023.

*PCR Troubleshooting*, [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com), pristupljeno 25.5.2023.

*PCR Troubleshooting*, [www.caister.com](http://www.caister.com), pristupljeno 11.5.2023.

Peralta-Leal V, Leal-Ugarte E, Meza-Espinoza JP, Dávalos-Rodríguez IP, Bocanegra-Alonso A, Acosta-González RI, et al. Association of a serotonin transporter gene (*SLC6A4*) 5-HTTLPR polymorphism with body mass index categories but not type 2 diabetes mellitus in Mexicans. *Genet Mol Biol*, 2012, 35, 589–93.

Pourhoseingholi MA, Baghestani AR, Vahedi M. How to control confounding effects by statistical analysis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2012, 5, 79–83.

Pratuangdejkul J, Nosoongnoen W, Guérin GA, Loric S, Conti M, Launay JM, et al. Conformational dependence of serotonin theoretical pK<sub>a</sub> prediction. *Chem Phys Lett*, 2006, 420, 538–44.

Ramamoorthy S, Ramamoorthy JD, Prasad PD, Bhat GK, Mahesh VB, Leibach FH, et al. Regulation of the Human Serotonin Transporter by Interleukin-1 $\beta$ . *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 216, 560–7.

Roje D, Banovic I, Tadin I, Vucinović M, Capkun V, Barisic A, et al. Gestational age-the most important factor of neonatal ponderal index. *Yonsei Med J*, 2004, 45, 273–80.

Rosenfeld CS. Placental serotonin signaling, pregnancy outcomes, and regulation of fetal brain development. *Biol Reprod*, 2020, 102, 532–538.

Say YH. The association of insertions/deletions (INDELs) and variable number tandem repeats (VNTRs) with obesity and its related traits and complications. *J Physiol Anthropol*, 2017, 36, 25.

*Sažetak opisa svojstava lijeka Amitriptilin Sandoz*, <https://www.halmed.hr/> (a) ; pristupljeno 3.8.2022.

*Sažetak opisa svojstava lijeka Cipraleks*, <https://www.halmed.hr/> (b) ; pristupljeno 3.8.2022.

Schepers R, Markus CR. The interaction between 5-HTTLPR genotype and ruminative thinking on BMI. *Br J Nutr*, 2017, 118, 629–37.

*SLC6A4*, <https://www.proteinatlas.org/> ; pristupljeno 21.1.2022.

*SLC6A4 solute carrier family 6 member 4 [Homo sapiens (human)]*, 2022., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (a); pristupljeno 21.1.2022.

Soljačić Vraneš H, Djaković I. Length and weight of newborns in Croatia from 1985 to 2009. *Wien Klin Wochenschr*, 2015, 127, 685–90.

Sookoian S, Gemma C, García SI, Fernández Gianotti T, Dieuzeide G, Roussos A, et al. Short Allele of Serotonin Transporter Gene Promoter Is a Risk Factor for Obesity in Adolescents. *Obesity*, 2007, 15, 271–6.

Sookoian S, Gianotti TF, Gemma C, Burgueño A, Pirola CJ. Contribution of the Functional 5-HTTLPR Variant of the *SLC6A4* Gene to Obesity Risk in Male Adults. *Obesity*, 2008, 16, 488–91.

*Standard Polymerase Chain Reaction (PCR)*, 2023., <https://barricklab.org/>, pristupljeno 11.5.2023.

Steiger H. Eating disorders and the serotonin connection: state, trait and developmental effects. *J Psychiatry Neurosci*, 2004, 29, 20–9.

*STIN2-VNTR serotonin transporter intronic VNTR enhancer [Homo sapiens (human)]*, 2022., - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (b), pristupljeno 28.8.2022.

Stoltenberg SF, Anderson C, Nag P, Anagnopoulos C. Association between the serotonin transporter triallelic genotype and eating problems is moderated by the experience of childhood trauma in women. *Int J Eat Disord*, 2012, 45, 492–500.

Sumara G, Sumara O, Kim JK, Karsenty G. Gut-Derived Serotonin Is a Multifunctional Determinant to Fasting Adaptation. *Cell Metab*, 2012, 16, 588–600.

Šagud M, Mihaljević-Peješ A, Jakovljević M. Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina. *MEDICUS*, 2002, 11, 165–170.

Štefulj, J, Bordukalo-Nikšić, T, Hećimović, H, Demarin, V, Jernej, B. Epilepsy and Serotonin (5HT): Variations of 5HT-Related Genes in Temporal Lobe Epilepsy. *Neurosci Lett*, 2010, 478, 29–31.

*Thermal Cycler Features—Six Key Considerations*, <https://www.thermofisher.com/> (a), pristupljeno 17.5.2023.

Trujillo-Hernández PE, Flores-Peña Y. Excess weight and depression associated with serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR): a systematic review. *Enfermeria Glob*, 62, 666–677.

*Tryptophan 5-monooxygenase*, <https://www.expasy.org/> (a); pristupljeno 1.11.2021.

Üçeyler N, Schütt M, Palm F, Vogel C, Meier M, Schmitt A, et al. Lack of the serotonin transporter in mice reduces locomotor activity and leads to gender-dependent late onset obesity. *Int J Obes*, 2010, 34, 701–11.

Uchida-Kitajima S, Yamauchi T, Takashina Y, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Ueki K, et al. 5-Hydroxytryptamine 2A receptor signaling cascade modulates adiponectin and plasminogen activator inhibitor 1 expression in adipose tissue. *FEBS Lett*, 2008, 582, 3037–44.

Uzun M, Saglar E, Kucukyildirim S, Erdem B, Unlu H, Mergen H. Association of VNTR polymorphisms in *DRD4*, *5-HTT* and *DAT1* genes with obesity. *Arch Physiol Biochem*, 2015, 121, 75–9.

Vila Candel R, Soriano-Vidal FJ, Hevilla Cucarella E, Castro-Sánchez E, Martin-Moreno JM. Tobacco use in the third trimester of pregnancy and its relationship to birth weight. A prospective study in Spain. *Women Birth*, 2015, 28, e134–9.

Virji SK. The relationship between alcohol consumption during pregnancy and infant birthweight: An epidemiologic study. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1991, 70, 303–8.

Visiers I, Weinstein H, Rudnick G, Stephan MM. A Second Site Rescue Mutation Partially Restores Functional Expression to the Serotonin Transporter Mutant V382P. *Biochemistry*, 2003, 42, 6784–93.

Vulturar R, Chiş A, Ungureanu L, Miu AC. Respiratory sinus arrhythmia and serotonin transporter promoter gene polymorphisms: Taking a triallelic approach makes a difference. *Psychophysiol*, 2012, 49, 1412–6.

Wang D, Szyf M, Benkelfat C, Provençal N, Turecki G, Caramaschi D, et al. Peripheral *SLC6A4* DNA methylation is associated with *in vivo* measures of human brain serotonin synthesis and childhood physical aggression. *PLoS One*, 2012, 7, e39501.

Wang Y, Li Y, Enhebayaer, Guan H. The association between 5-HTTLPR/rs25531 polymorphisms and behavior problems in Mongolian children. *Int J Clin Exp Med*, 2018, 11, 6863–74.

Waples, RS. Testing for Hardy–Weinberg Proportions: Have We Lost the Plot? *J Hered*, 2015, 106, 1–19.

Xu F, Wang B, Yao J. Association between the *SLC6A4* gene and schizophrenia: an updated meta-analysis. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2019, 15, 143–55.

Yabut JM, Crane JD, Green AE, Keating DJ, Khan WI, Steinberg GR. Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule. *Endocr Rev*, 2019, 40, 1092–107.

Zha W, Ho HTB, Hu T, Hebert MF, Wang J. Serotonin transporter deficiency drives estrogen-dependent obesity and glucose intolerance. *Sci Rep*, 2017, 7, 1137.

Zhang LJ, Zeng XT, Zhao MJ, He DF, Liu JY, Liu MY. The important effect of 5-HTTLPR polymorphism on the risk of depression in patients with coronary heart disease: a meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord*, 2020, 20, 141.

## 9. SAŽETAK / SUMMARY

### 9.1. Sažetak

Serotonin je multifunkcionalna signalna molekula uključena u širok raspon fizioloških funkcija, a posebno se ističe njegova uloga u regulaciji energetske ravnoteže organizma. Serotoninska signalizacija u velikoj je mjeri modulirana serotoninskim transporterom, transmembranskim proteinom kroz koji serotonin ulazi u stanicu čime se terminira serotoninski signal. Određeni polimorfizmi gena *SLC6A4* koji kodira za serotoninski transporter povezuju se s intenzitetom transkripcije navedenog gena te s podložnosti razvoja pretilosti i povezanih komorbiditeta. Glavni cilj istraživanja bio je pobliže ispitati potencijalnu povezanost polimorfizama gena *SLC6A4* s antropometrijskim karakteristikama novorođenčadi, uzimajući u obzir mogući utjecaj različitih karakteristika novorođenčadi i majki. Genomska DNA izolirana je iz tkiva posteljice, a genotipizacija promotorskog polimorfizma 5-HTTLPR te intronskog polimorfizma STin2 provedena je pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR), dok je genotipizacija polimorfizma zamjene pojedinačnih nukleotida rs25531 provedena digestijom dobivenih 5-HTTLPR PCR produkata restriksijskom endonukleazom *MspI*. U okviru istraživanja proveden je i postupak optimizacije metode koji je obuhvaćao modifikaciju metoda PCR i agarozne gel elektroforeze. Utvrđene frekvencije genotipova i alela analiziranih polimorfizama bile su u skladu s dosad zabilježenom distribucijom u hrvatskoj populaciji. Opažen je statistički značajan učinak spola i gestacijske dobi novorođenčadi na porođajnu masu i duljinu, ali ne i na ponderalni indeks. Zabilježena je statistički značajna razlika u ponderalnom indeksu između novorođenčadi različitog genotipa za polimorfizam STin2, u ukupnom uzroku i u skupini ženske, ali ne i muške novorođenčadi. Razumijevanje bioloških i ostalih čimbenika koji utječu na antropometrijske karakteristike novorođenčadi moglo bi doprinijeti razvoju programa rane intervencije i prevencije metaboličkih poremećaja i pratećih komorbiditeta tijekom daljnjeg životnog vijeka.



## 9.2. Summary

Serotonin is a multifunctional signaling molecule involved in a wide range of physiological functions, with a particularly prominent role in regulating the body's energy balance. Serotonin signaling is largely modulated by the serotonin transporter, a transmembrane protein through which serotonin enters the cell, what leads to termination of the serotonin signaling. Certain polymorphisms of the *SLC6A4* gene, coding for the serotonin transporter, are associated with the intensity of transcription of this gene and with its susceptibility to the development of obesity and related comorbidities. The main goal of this study was to investigate the potential association of *SLC6A4* gene polymorphisms with neonatal anthropometric characteristics, taking into account the possible influence of different neonatal and maternal characteristics. Genomic DNA was isolated from placental tissue and genotyping of the 5-HTTLPR promoter polymorphism and STin2 intron polymorphism was performed by polymerase chain reaction (PCR), while genotyping of the single nucleotide polymorphism rs25531 was performed by digestion of the obtained 5-HTTLPR PCR products with restriction endonuclease *MspI*. A method optimisation procedure was carried out as part of the study, which included modification of the PCR and agarose gel electrophoresis methods. The determined frequencies of the genotypes and alleles of the analyzed polymorphisms were in accordance with the previously observed in the Croatian population. A statistically significant effect of sex and gestational age of the newborns on birth weight and length, but not on the ponderal index, was observed. A statistically significant difference in the ponderal index was found between newborns of different genotypes for the STin2 polymorphism, both in the total sample and in the group of female, but not male newborns. Understanding the underlying influence of biological and other factors on the neonatal anthropometric characteristics could contribute to the development of programs of early intervention and prevention of metabolic disorders and accompanying comorbidities later in life.

**10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION  
CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Povezanost polimorfizama gena za serotoninski prijenosnik s antropometrijskim karakteristikama novorođenčadi

Azra Kugić

#### SAŽETAK

Serotonin je multifunkcionalna signalna molekula uključena u širok raspon fizioloških funkcija, a posebno se ističe njegova uloga u regulaciji energijske ravnoteže organizma. Serotoninska signalizacija u velikoj je mjeri modulirana serotoninskim transporterom, transmembranskim proteinom kroz koji serotonin ulazi u stanicu čime se terminira serotoninski signal. Određeni polimorfizmi gena *SLC6A4* koji kodira za serotoninski transporter povezuju se s intenzitetom transkripcije navedenog gena te s podložnosti razvoja pretilosti i povezanih komorbiditeta. Glavni cilj istraživanja bio je pobliže ispitati potencijalnu povezanost polimorfizama gena *SLC6A4* s antropometrijskim karakteristikama novorođenčadi, uzimajući u obzir mogući utjecaj različitih karakteristika novorođenčadi i majki. Genomska DNA izolirana je iz tkiva posteljice, a genotipizacija promotorskog polimorfizma 5-HTTLPR te intronskog polimorfizma STin2 provedena je pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR), dok je genotipizacija polimorfizma zamjene pojedinačnih nukleotida rs25531 provedena digestijom dobivenih 5-HTTLPR PCR produkata restriksijskom endonukleazom *MspI*. U okviru istraživanja proveden je i postupak optimizacije metode koji je obuhvaćao modifikaciju metoda PCR i agarozne gel elektroforeze. Utvrđene frekvencije genotipova i alela analiziranih polimorfizama bile su u skladu s dosad zabilježenom distribucijom u hrvatskoj populaciji. Opažen je statistički značajan učinak spola i gestacijske dobi novorođenčadi na porođajnu masu i duljinu, ali ne i na ponderalni indeks. Zabilježena je statistički značajna razlika u ponderalnom indeksu između novorođenčadi različitog genotipa za polimorfizam STin2, u ukupnom uzroku i u skupini ženske, ali ne i muške novorođenčadi. Razumijevanje bioloških i ostalih čimbenika koji utječu na antropometrijske karakteristike novorođenčadi moglo bi doprinijeti razvoju programa rane intervencije i prevencije metaboličkih poremećaja i pratećih komorbiditeta tijekom daljnjeg životnog vijeka.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 82 stranice, 19 grafičkih prikaza, 17 tablica i 131 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Serotonin, serotoninski prijenosnik, energijska ravnoteža, 5-HTTLPR, rs25531, STin2

Mentori: **Dr. sc. Ivona Bećeheli**, *poslijedoktorand Instituta Ruđer Bošković.*  
**Dr. sc. Toma Keser**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivona Bećeheli**, *poslijedoktorand Instituta Ruđer Bošković.*  
**Dr. sc. Toma Keser**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Najda Rudman**, *poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2023.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Biochemistry and Molecular Biology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### The association of serotonin transporter gene polymorphisms with neonatal anthropometric characteristics

Azra Kugić

#### SUMMARY

Serotonin is a multifunctional signaling molecule involved in a wide range of physiological functions, with a particularly prominent role in regulating the body's energy balance. Serotonin signaling is largely modulated by the serotonin transporter, a transmembrane protein through which serotonin enters the cell, what leads to termination of the serotonin signaling. Certain polymorphisms of the *SLC6A4* gene, coding for the serotonin transporter, are associated with the intensity of transcription of this gene and with its susceptibility to the development of obesity and related comorbidities. The main goal of this study was to investigate the potential association of *SLC6A4* gene polymorphisms with neonatal anthropometric characteristics, taking into account the possible influence of different neonatal and maternal characteristics. Genomic DNA was isolated from placental tissue and genotyping of the 5-HTTLPR promoter polymorphism and STin2 intron polymorphism was performed by polymerase chain reaction (PCR), while genotyping of the single nucleotide polymorphism rs25531 was performed by digestion of the obtained 5-HTTLPR PCR products with restriction endonuclease *MspI*. A method optimisation procedure was carried out as part of the study, which included modification of the PCR and agarose gel electrophoresis methods. The determined frequencies of the genotypes and alleles of the analyzed polymorphisms were in accordance with the previously observed in the Croatian population. A statistically significant effect of sex and gestational age of the newborns on birth weight and length, but not on the ponderal index, was observed. A statistically significant difference in the ponderal index was found between newborns of different genotypes for the STin2 polymorphism, both in the total sample and in the group of female, but not male newborns. Understanding the underlying influence of biological and other factors on the neonatal anthropometric characteristics could contribute to the development of programs of early intervention and prevention of metabolic disorders and accompanying comorbidities later in life.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 82 pages, 19 figures, 17 tables and 131 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Serotonin, serotonin transporter, energy homeostasis, 5-HTTLPR, rs25531, STin2

Mentors: **Ivona Bećeheli, Ph.D.**, *Postdoctoral Fellow, Ruđer Bošković Institute*  
**Toma Keser, Ph.D.**, *Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Ivona Bećeheli, Ph.D.**, *Postdoctoral Fellow, Ruđer Bošković Institute*  
**Toma Keser, Ph.D.**, *Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
**Najda Rudman, Ph.D.** *Postdoctoral Fellow, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: July 2023.