

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

JELENA NIKOLIĆ

**IZRAŽAJ SEROTONINSKIH RECEPTORA U PLUĆIMA ČOVJEKA TIJEKOM
FETALNOG RAZVOJA**

Doktorski rad

Split, 2026.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

JELENA NIKOLIĆ

**IZRAŽAJ SEROTONINSKIH RECEPTORA U PLUĆIMA ČOVJEKA TIJEKOM
FETALNOG RAZVOJA**

Doktorski rad

Split, 2026.

Rad je izrađen na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Natalije Filipović

Objavljeni znanstveni rad na kojem se temelji doktorska tema:

Nikolić, J.; Vukojević, K.; Šoljić, V.; Mišković, J.; Orlović Vlaho, M.; Saraga-Babić, M.; Filipović, N. Expression Patterns of Serotonin Receptors 5-HT1A, 5-HT2A, and 5-HT3A during Human Fetal Lung Development. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 2965.

ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nataliji Filipović na podršci, te na iskazanom trudu i pomoći tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Katarini Vukojević na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za daljnje školovanje i napredovanje u ključnim momentima.

Zahvaljujem svim prijateljima, kolegama i dobrim ljudima koji su na bilo koji način bili uključeni u ovaj dio mog životnog puta.

Hvala cijeloj mojoj obitelji na neizmornoj podršci i ljubavi koja je temelj svakog mog uspjeha.

Posebno hvala mojim roditeljima koji su uvijek davali sve od sebe kako bi mi omogućili da postanem osoba kakva sam sada.

I na kraju, željela bih zahvaliti svojoj ljubavi prema znanosti što me vodila i gurala naprijed tijekom svih izazova za vrijeme doktorskog studija i dala mi snagu da ih uspješno prebrodim.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Razvoj ljudskih pluća.....	1
1.1.1.	Embrionalna faza	3
1.1.2.	Pseudoglandularna faza	5
1.1.3.	Kanalikularna faza	8
1.1.4.	Sakularna faza.....	8
1.1.5.	Alveolarna faza	9
1.2.	Serotonin	10
1.2.1.	Otkriće serotonina.....	11
1.2.2.	Metabolizam serotonina.....	12
1.3.	Serotoninski receptori	15
1.3.1.	Podjela serotoninskih receptora	15
1.3.2.	Metabotropni receptori.....	18
1.3.3.	Ionotropni receptori	24
1.4.	Uloga serotonina i njegovih receptora u plućima	26
2.	CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	30
3.	MATERIJALI I METODE	32
3.1.	Biološki materijal.....	33
3.2.	Postupci.....	34
3.2.1.	Priprema uzoraka za histološku analizu.....	34
3.2.2.	Imunohistokemija	34
3.3.	Prikupljanje i analiza podataka	37
3.4.	Izolacija RNA i qRT-PCR	37
3.5.	Statistička analiza.....	39
4.	REZULTATI.....	40
4.1.	Izražaj 5-HT1A receptora u različitim strukturama pluća tijekom fetalnog razvoja kod čovjeka	44

4.2.	Izražaj 5-HT _{2A} receptora u različitim strukturama pluća tijekom fetalnog razvoja kod čovjeka	49
4.3.	Izražaj 5-HT _{3A} receptora u različitim strukturama pluća tijekom fetalnog razvoja kod čovjeka	54
4.4.	Izražaj serotoninskih receptora u pneumocitima tijekom alveolarne faze.....	58
4.5.	Izražaj glasničke RNA serotoninskih receptora tijekom fetalnog razvoja pluća – real time qPCR analiza	59
5.	RASPRAVA	61
6.	ZAKLJUČCI.....	67
7.	SAŽETAK.....	70
8.	LAIČKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU	73
9.	SUMMARY	75
10.	LAY SUMMARY	78
11.	LITERATURA.....	80
12.	ŽIVOTOPIS	94

POPIS KRATICA I OZNAKA

5-HT – serotonin, 5-hidroksitriptamin (eng. *serotonin, 5-hydroxytryptamine*)

5-HT3R – 5-HT3 receptori

5-HIAA – 5-hidroksiindooctena kiselina (eng. *5-hydroxyindoleacetic acid*)

5-HTP – 5-hidroksitriptofan (eng. *5-hydroxytryptophan*)

AADC – dekarboksilaza aromatskih aminokiselina (eng. *aromatic amino acid decarboxylase*)

AC – adenilat ciklaza (eng. *adenylate cyclase*)

ANOVA – analiza varijance (eng. *analysis of variance*)

ATP – adenzin trifosfat (eng. *adenosine triphosphate*)

BMP-4 – koštani morfogenetski protein 4 (eng. *bone morphogenetic protein 4*)

cAMP – ciklički adenzin monofosfat (eng. *cyclic adenosine monophosphate*)

CNS – središnji živčani sustav (eng. *central nervous system*)

DAG – diacil-glicerol (eng. *diacylglycerol*)

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol (eng. *4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

ECD – izvanstanična domena (eng. *extracellular domain*)

ECM – izvanstanični matriks (eng. *extracellular matrix*)

ENS – crijevni živčani sustav (eng. *enteric nervous system*)

FGF-10 – fibroblastni čimbenik rasta 10 (eng. *fibroblast growth factor 10*)

GDP – gvanozin difosfat (eng. *guanosine diphosphate*)

GI – gastrointestinal (eng. *gastrointestinal*)

GTP – gvanozin trifosfat (eng. *guanosine triphosphate*)

GPCR – receptor povezan s G-proteinom (eng. *G protein coupled receptor*)

ICAM-1 – intercelularna adhezijska molekula 1 (eng. *intercellular adhesion molecule 1*)

ICD – unutarstanična domena (eng. *intracellular domain*)

IL-6 – interleukin 6 (eng. *interleukin 6*)

IP3 – inozitol trifosfat (eng. *inositol trisphosphate*)

LSD – dietilamid liserginske kiseline (eng. *lysergic acid diethylamide*)

MAO – monoamin oksidaza (eng. *monoamine oxidase*)

MAPK – protein kinaza aktivirana mitogenom (eng. *mitogen-activated protein kinase*)

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (eng. *messenger ribonucleic acid*)

nAChR – nikotinski acetilkolinski receptor (eng. *nicotinic acetylcholine receptor*)

NEBs – neuroepitelna tjelešca (eng. *neuroepithelial bodies*)

NF- κ B – nuklearni faktor kappa B (pojačivač lakog lanca imunoglobulina u aktiviranim B-stanicama) (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

PAH – plućna arterijska hipertenzija (eng. *pulmonary arterial hypertension*)

PA-SMC – glatke mišićne stanice plućne arterije (eng. *pulmonary artery smooth muscle cells*)

PBS – fiziološka otopina puferirana s fosfatom (eng. *phosphate-buffered saline*)

PFA – paraformaldehid (eng. *paraformaldehyde*)

PIP3 – fosfatidil-inozitol-4,5-trifosfat (eng. *phosphatidylinositol 4,5-triphosphate*)

PKA – protein kinaza A (eng. *protein kinase A*)

PKC – protein kinaza C (eng. *protein kinase C*)

PLC – fosfolipaza C (eng. *phospholipase C*)

PNECs – pulmonalne neuroendokrine stanice (eng. *pulmonary neuroendocrine cells*)

PNS – periferni živčani sustav (eng. *peripheral nervous system*)

qRT-PCR – kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (eng. *Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR*)

(R)-DOI – (R)-2,5-dimetoksi-4-jodoamfetamin (eng. *(R)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine*)

RNA – ribonukleinska kiselina (eng. *ribonucleic acid*)

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (eng. *reactive oxygen species*)

SERT – serotonininski transporter (eng. *serotonin transporter*)

SMC – glatke mišićne stanice (eng. *smooth muscle cells*)

SSRI – selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (eng. *selective serotonin reuptake inhibitors*)

TGF- β – transformirajući faktor rasta beta (eng. *fibroblast growth factor beta*)

TM – transmembranska domena (eng. *transmembrane domain*)

TNF- α – faktor nekroze tumora-alfa (eng. *tumor necrosis factor-alpha*)

TPH – triptofan hidroksilaza (eng. *tryptophan hydroxylase*)

TPH1 – triptofan hidroksilaza 1 (eng. *tryptophan hydroxylase 1*)

TPH2 – triptofan hidroksilaza 2 (eng. *tryptophan hydroxylase 2*)

Shh – Sonic Hedgehog protein (eng. *Sonic Hedgehog protein*)

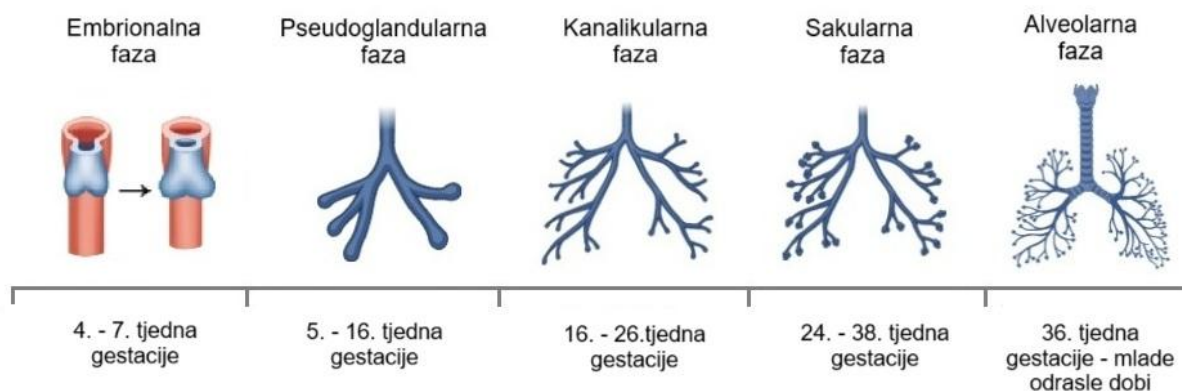
VCAM-1 – vaskularna adhezijska molekula 1 (eng. *vascular cell adhesion molecule 1*)

1. UVOD

1.1. Razvoj ljudskih pluća

Pluća imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze organizma putem učinkovite izmjene plinova između atmosferskog zraka i krvi, čime omogućuju održivost aerobnog života (1, 2). Njihov razvoj je složen i visoko koordiniran proces koji započinje u ranom embrionalnom razdoblju i proteže se sve do postnatalnog života. Uključuje niz morfoloških, staničnih i molekularnih promjena koje rezultiraju stvaranjem funkcionalnog organa sposobnog za izmjenu plinova. Kako bi se ta funkcija učinkovito ostvarila, plućno tkivo je organizirano u dva međusobno isprepletena, visoko razgranata tubularna sustava: jedan služi za provođenje zraka kroz dišne putove, dok drugi omogućuje protok krvi kroz vaskularnu mrežu (1). Da bi se postigla optimalna površina za difuziju plinova, pluća razvijaju kompleksnu arhitekturu sastavljenu od te dvije međusobno isprepletene sustavne mreže – dišnog i vaskularnog stabla (3).

Razvoj pluća započinje u ranoj embriogenezi i odvija se kroz pet sukcesivnih, ali djelomično preklapajućih faza: embrionalnu, pseudoglandularnu, kanalikularnu, sakularnu i alveolarnu (**Slika 1**) (4-6). Svaka od ovih faza okarakterizirana je specifičnim razvojnim događajima, koji uključuju proliferaciju i diferencijaciju stanica, grananje dišnog epitela, formiranje vaskularne mreže te sazrijevanje alveola (6).



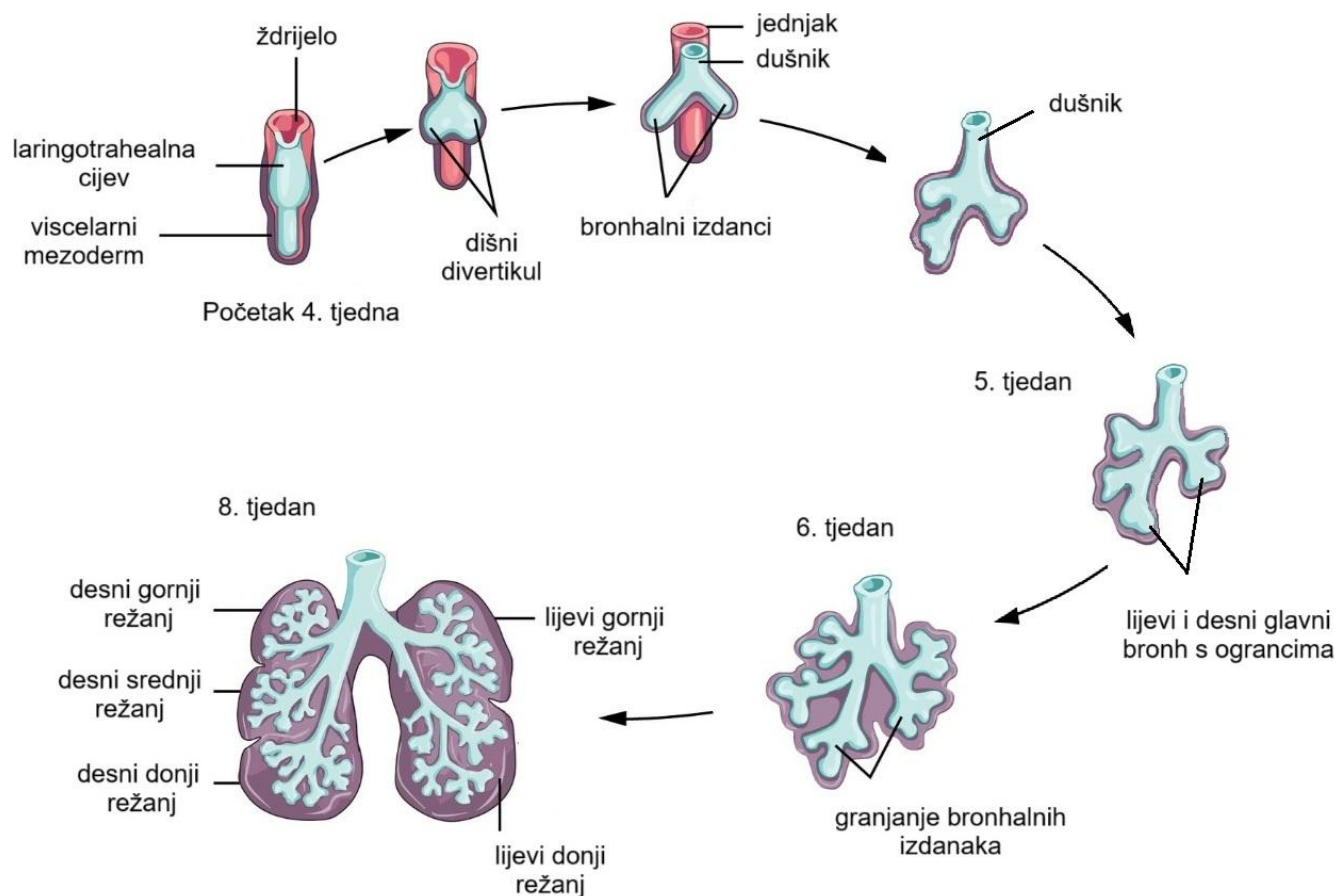
Slika 1. Razvojne faze pluća. Slika izrađena u programu BioRender prema referenci Schittny JC. Development of the lung. Cell Tissue Res. 2017;367(3):427-44. (5). doi: 10.1007/s00441-016-2545-0. Licenca: CC BY 4.0.; link: <https://interoperable-europe.ec.europa.eu/licence/creative-commons-attribution-40-international-cc-40>.

Ova podjela temelji se na morfologiji odnosno histološkom izgledu plućnog tkiva (5, 7). Alternativno, razvoj se može klasificirati prema kronološkim razdobljima ljudskog razvoja – embrionalnom, fetalnom i postnatalnom – pri čemu se embrionalna faza podudara s ranom organogenezom, dok pseudoglandularna, kanalikularna i sakularna odgovaraju fetalnom razdoblju u kojem se odvija funkcionalno sazrijevanje pluća (8). Alveolarizacija započinje pri samom kraju gestacije i nastavlja se nakon rođenja, kada se formiraju milijuni alveola i pluća sazrijevaju u adultni oblik (2). Pluća su tom smislu razvojno jedinstven organ, njihova kompleksna struktura i funkcionalna spremnost razvijaju se u intrauterinim uvjetima, bez potrebe za ventilacijom, ali s ciljem da budu potpuno funkcionalna u trenutku rođenja, kada postaju ključna za prilagodbu novorođenčeta na izvanmaterični život (9).

U ranim fazama, embrionalnoj i pseudoglandularnoj, započinje inicijalno grananje dišnih puteva od traheje prema periferiji, pri čemu nastaje primarno bronhalno stablo. Iako se promjer dišnih cijevi smanjuje prema distalnim regijama, ukupna površina poprečnog presjeka raste uslijed sve većeg broja ogranaka (9). U kasnijim fazama, posebno u kanalikularnoj i sakularnoj, dolazi do značajnog proširenja respiratorne zone unutar acinusa, gdje se razvijaju terminalni duktusi i primitivni alveolarni prostori (2). Alveolarna faza obilježena je diferencijacijom zrelih alveola i stvaranjem bogate kapilarne mreže, čime se osigurava povećanje respiratorne površine potrebne za izmjenu plinova (6).

1.1.1. Embrionalna faza

Tijekom embrionalne faze razvoja ljudskih pluća koja traje od 4. do 7. tjedna gestacije, primarni lijevi i desni plućni izdanci pojavljuju se iz endoderma prednjeg crijeva i njihovim grananjem se kasnije uspostavlja cjelokupna lobularna struktura pluća (**Slika 2**) (5, 7, 10).



Slika 2. Stadiji razvoja dušnika i pluća. Preuzeto i prilagođeno iz Menefee W, Jenks J, Mazzasette C, Nguyen KL., Human Anatomy - LibreTexts, 2022 (11). Dostupno na: [https://med.libretexts.org/Bookshelves/Anatomy_and_Physiology/Human_Anatomy_\(OERI\)/20%3A_Respiratory_System/20.05%3A_Embryonic_Development_of_the_Respiratory_System](https://med.libretexts.org/Bookshelves/Anatomy_and_Physiology/Human_Anatomy_(OERI)/20%3A_Respiratory_System/20.05%3A_Embryonic_Development_of_the_Respiratory_System). Licenca: CC BY 4.0.; link: <https://interoperable-europe.ec.europa.eu/licence/creative-commons-attribution-40-international-cc-40>.

Kada je embrio u četvrtom tjednu razvoja na ventralnoj stijenci prednjeg crijeva se pojavljuje dišni divertikul (plućni pupoljak) koji je na početku široko povezan s prednjim crijevom (12). Uslijed formiranja ezofagotrahealne pregrade dišni divertikul se odvaja od prednjeg crijeva i izdužuje u dušnik koji se grana u dva bronhalna izdanka (13). U petom tjednu njihovim povećavanjem dolazi do formiranja desnog i lijevog glavnog bronha. Istodobno se prednje crijevo diferencira na dorzalni dio iz kojeg nastaje jednjak te ventralni dio iz kojeg se razvijaju dušnik i donji dišni putovi (5). Primarni bronhi se zatim dijele na sekundarne bronhe pri čemu se na lijevom plućnom krilu razvijaju dva, a na desnom tri sekundarna bronha sa odgovarajućim brojem plućnih reznjeva (12, 13). Do sedmog tjedna embrionalnog razvoja sekundarni se bronhi progresivno granaju tvoreći 10 tercijalnih (segmentalnih) bronha u desnom i 8 u lijevom plućnom krilu.

Ova faza je ključna jer se u njoj definira topografija budućih plućnih reznjeva i segmenata, što postavlja temelj za sve kasnije faze morfogeneze dišnih puteva (2, 5, 9). Također, započinje diferencijacija endodermalnih i mezodermalnih struktura. Endoderm prednjeg crijeva će se diferencirati u različite epitelne tipove stanica koje oblažu unutarnju površinu razvijajućih pluća i dušnika, čija je funkcija zaštitna barijera i održavanje homeostaze plućnog tkiva. Iz mezoderma se razvija plućni mezenhim — koji uključuje brojne strukturne komponente pluća, kao što je vezivno tkivo; prekursore endotelnih stanica; glatke mišićne stanice koje obavijaju dišne putove i krvne žile; hrskavicu dušnika; limfne žile te mezotelne stanice koje pokrivaju vanjsku površinu pluća, odnosno pleuru (14).

Epitelno-mezenhimske interakcije predstavljaju ključni mehanizam morfogeneze i diferencijacije tijekom embriogeneze. Ta međustanična komunikacija regulirana je brojnim čimbenicima rasta koji potiču formaciju plućnih divertikula, grananje epitelnih cijevi, rast i nastanak različitih staničnih linija (15-17). Neki od najrelevantnijih čimbenika uključenih u interakcije epitela i mezenhima tijekom razvoja pluća su: fibroblastni čimbenik rasta 10 (FGF-10, eng. *fibroblast growth factor 10*), koštani morfogenetski protein 4 (BMP-4, eng. *bone morphogenetic protein 4*), Sonic Hedgehog protein (Shh, eng. *Sonic Hedgehog protein*), retinoična kiselina, Notch protein, transformirajući faktor rasta beta (TGF- β , eng. *fibroblast growth factor beta*) i drugi (18). U regulaciji epitelno-mezenhimske interakcije ključnu ulogu ima izvanstanični matriks (ECM, eng. *extracellular matrix*), iako sam ne izlučuje signale, djeluje kao rezervoar čimbenika rasta, regulirajući njihovu dostupnost i funkciju (16, 19, 20).

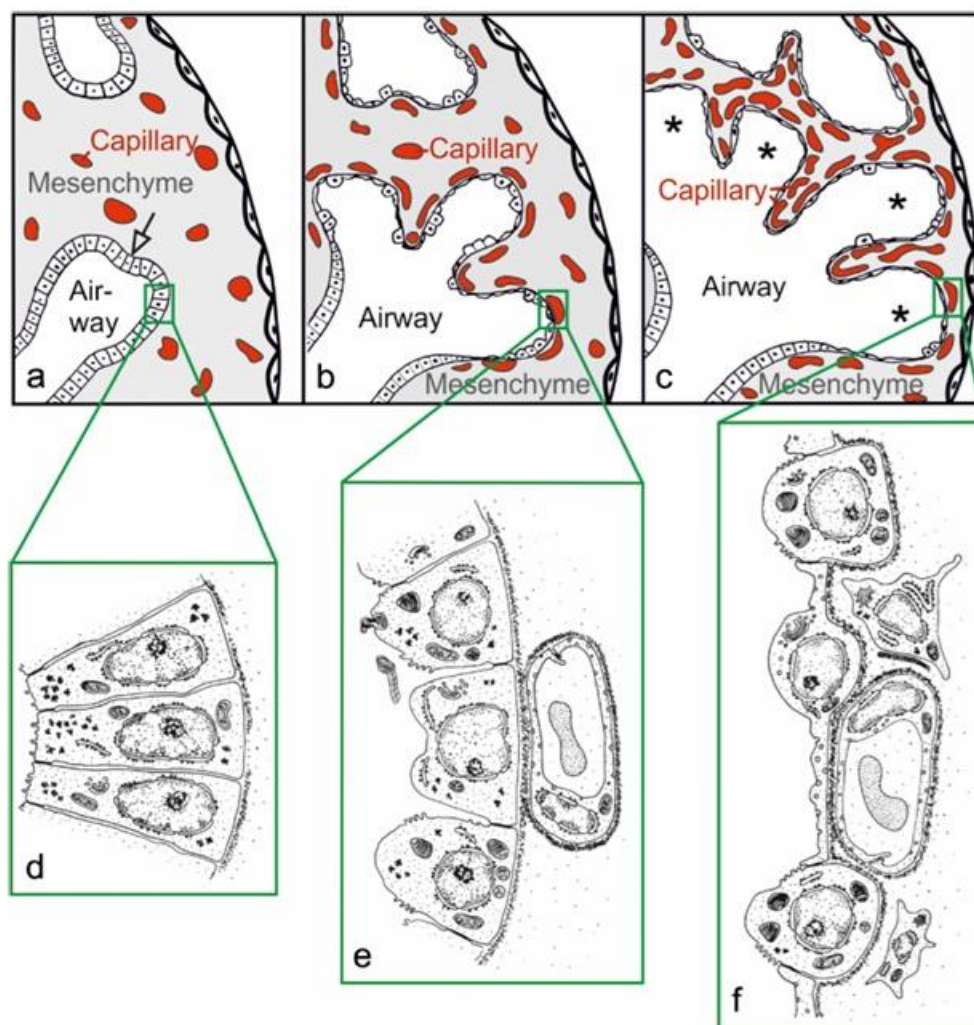
Plućni mezenhim nužan je za inicijaciju i nastavak grananja, a njegova prisutnost i količina uvjetuju opseg razvoja (2, 8, 14, 15). To su pokazali Wessells i sur. kada su transplantacijskim pokusima utvrdili da uklanjanjem mezenhima s vrha rastuće epitelne cijevi dolazi do zaustavljanja daljnjeg grananja, dok se, suprotno tome, postavljanjem uklonjenog mezenhima uzduž nižerazinske epitelne cijevi lokalno inducira novo izrastanje (2, 21). Također su pokazali da bronhalni mezenhim inducira grananje epitelnih struktura bronha i traheje, dok trahealni mezenhim djeluje inhibicijski na bronhalno grananje, osiguravajući da se grananje događa samo u pravilnim zonama i da se ne razvijaju bronhijalni izdanci tamo gdje ne trebaju.

1.1.2. Pseudoglandularna faza

Tijekom ovog razdoblja koje traje od 5. do 16. tjedna gestacije, morfogeneza pluća se nastavlja te dolazi do dihotomnog grananja primitivnih dišnih putova, od traheje do terminalnih bronhiola – time se formira bronhalno stablo i veliki dio parenhima (9). Dva najvažnija ishoda ove faze su formiranje svih budućih provodnih dišnih puteva i pojava obrisa acinusa (6). Do kraja 16. tjedna formirani su svi glavni elementi pluća, osim onih koji su zaduženi za izmjenu plinova. Naziv ove faze potječe od histološkog izgleda plućnog tkiva, koje podsjeća složene tubularne žlijezde zbog intenzivnog grananja epitelnih struktura, gdje su epitelni tubuli okruženi debelim mezenhimskim tkivom (3, 5, 14). Kao što je ranije opisano, dvostruko podrijetlo plućnog tkiva ima ključnu ulogu u morfogenezi grananja i regulaciji rasta, budući da je taj proces reguliran intenzivnom međustaničnom komunikacijom između epitelnih i mezenhimskih stanica kao i čimbenika koje te stanice izlučuju (2, 8).

Počevši proksimalno, budući dišni putovi obloženi su vrlo visokim cilindričnim epitelom (**Slika 3-a**). Visina epitelnih stanica kontinuirano se smanjuje prema završnim granama, gdje se nalazi kubični epitel koji održava svoje nediferencirano stanje sve dok se ne završi morfogeneza grananja tijekom kanalikularne faze. Kod nekih vrsta poput čovjeka, morfogeneza grananja može se nastaviti čak i do sakularne faze. Tijekom pseudoglandularne faze, prve cilijarne, vrčaste i bazalne stanice pojavljuju se u proksimalnim dišnim putovima. Nakon toga, epitelna diferencijacija napreduje u periferiju (5). Pulmonalne neuroendokrine stanice (PNECs, eng. *pulmonary neuroendocrine cells*) koje produciraju serotonin pojavljuju se tijekom pseudoglandularne faze već od 8. tjedna gestacije, te su prisutne pojedinačno ili organizirane u

skupine tvoreći neuroepitelna tjelešca (NEBs, eng. *neuroepithelial bodies*) (22, 23). Njihova rana diferencijacija i progresivno povećanje broja kroz daljnje faze razvoja sugeriraju ključnu ulogu serotonina u formiranju plućne arhitekture i senzorskoj regulaciji tijekom fetalnog razvoja pluća.



Slika 3. Morfološki razvoj plućnog parenhima tijekom pseudoglandularne, kanalikularne i sakularne faze. Tijekom pseudoglandularne faze, epitelni tubuli intenzivno se granaju i prodiru u okolni mezenhim (slika a, otvorena strelica označava mjesto grananja). Mezenhim u ovoj fazi sadrži rahlu mrežu kapilara, dok je epitel visok i cilindričan (slika d). Kanalikularna faza (slika b) obilježena je: (1) diferencijacijom epitelnih stanica u stanice tipa I i tipa II (slike e i f), (2) proširenjem budućih dišnih putova (slika b), (3) umnožavanjem kapilara i uspostavljanjem njihovih prvih bliskih kontakata s epitelom (slika b), te (4) formiranjem prvih budućih krvno-zračnih barijera (od slike e prema f). Tijekom sakularne faze (slika c), dolazi do stvaranja nezrelih

interalveolarnih septa, uslijed daljnje kondenzacije mezenhima. Nezrele septalne pregrade sadrže dvostruki sloj kapilara – po jedan sloj s obje strane septuma. Završni dijelovi bronhalnog stabla proširuju se i oblikuju prostrane strukture koje se nazivaju sakuli (označeni zvjezdicom). Preuzeto u izvornom obliku iz Schittny JC. Development of the lung. Cell Tissue Res. 2017;367(3):427-44 (5). doi: 10.1007/s00441-016-2545-0. Licenca: CC BY 4.0.; link: <https://interoperable-europe.ec.europa.eu/licence/creative-commons-attribution-40-international-cc-40>.

U epitelu proksimalnih dišnih puteva koji je obložen visokim cilindričnim epitelom započinje diferencijacija specijaliziranih stanica, poput cilijarnih, vrčastih i bazalnih stanica, dok distalni dijelovi ostaju obloženi kubičnim, nediferenciranim epitelom sve do završetka faze grananja (5, 6). Istovremeno, glatke mišićne stanice počinju se formirati oko proksimalnih dišnih puteva. Njihove spontane kontrakcije stvaraju peristaltičke valove koji potiču ritmičko širenje distalnih struktura dokazano utječu na proliferaciju epitelnih stanica, diferencijaciju i sekreciju surfaktanta i time doprinose razvoju plućnog tkiva (24, 25). Opsežno grananje plućnog epitela popraćeno je paralelnim razvojem plućne vaskulature (2). Dolazi do daljnjeg razvoja arterijskog i venskog sustava, pri čemu arterijsko stablo razvija više ogranaka nego bronhalno, uključujući tzv. Supernumerarne arterije – dodatne arterijske grane plućne cirkulacije koje ne prate izravno bronhijalne puteve nego ulaze u plućno parenskimsko tkivo (3).

Tijekom pseudoglandularne faze razvoj pluća uvelike ovisi o mehaničkim podražajima. Spontane kontrakcije glatkih mišićnih stanica u dišnim putovima započinju već ranije, a oko 10. tjedna gestacije u ljudi javljaju se i prvi pokreti fetalnog disanja (5). Ovi pokreti istežu plućno tkivo te omogućuju izmjenu tekućine između pluća i okolnog prostora (26). Nedavne studije pokazale su da takvi mehanički podražaji putem mehanosenzitivnih kanala potiču lučenje serotonina, koji zauzvrat stimulira diferencijaciju (27) i proliferaciju epitelnih stanica (28), što je ključno za pravilnu morfogenezu grananja (5). Osim toga, istezanje plućnog tkiva potiče proliferaciju epitelnih stanica i povećava lučenje surfaktantnih lipida iz stanica tipa II alveolarnog epitela (29).

1.1.3. Kanalikularna faza

Kanalikularna faza započinje u 16. tjednu i traje do 26. tjedna gestacije. U tom periodu bronhioli se uzastopno dijele tvoreći sve manje ogranke koji su sve bolje opskrbljeni krvnim žilama (**Slika 3-b**). Dišni putovi se izdužuju i šire, poprimajući oblik uskih kanala – ranih preteča alveolarnih duktusa, otkuda je ova faza dobila ime (5).

Osim toga, odvija se diferencijacija epitela, kuboidne epitelne stanice budućih alveolarnih duktusa diferenciraju se u alveolarne epitelne stanice (pneumocyte) tipa I i tipa II. Alveolarne epitelne stanice tipa I su plosnate, jako izdužene stanice specijalizirane za izmjenu plinova, dok su alveolarne epitelne stanice tipa II kuboidne i specijalizirane su za proizvodnju surfaktanta (**Slika 3-f**).

Po morfološkim kriterijima se po prvi put mogu razlikovati provodni i respiratorni dijelovi dišnih putova. Alveolarne epitelne stanice tipa I respiracijskih bronhiola (pneumociti tipa I) dolaze u blizak kontakt s kapilarnom mrežom u mezenhimu, čime se započinje formiranje buduće krvno-zračne barijere (5). Za učinkovitost difuzije u alveolarnim prostorima nužna je njihova adekvatna perfuzija. Pulmonalne arterije prate grananje bronhalnog stabla i sinkrono se dijele, dovodeći krv do kapilarne mreže unutar alveolarnih stijenki. Površina kapilara pritom odgovara površini alveola, čime se omogućuje optimalna izmjena plinova. Pulmonalne vene odvođaju krv iz kapilara, dok bronhalne arterije, koje potječu iz silazne aorte, osiguravaju nutritivnu opskrbu većih dišnih putova i stijenki krvnih žila (30).

Ubrzo nakon pojave, epitelne stanice tipa II počinju proizvoditi tekućinu bogatu fosfolipidima odnosno surfaktant, koji je ključan za smanjenje površinske napetosti i održavanje alveolarne stabilnosti nakon rođenja (12). Dolazak u kanalikularnu fazu ključan je za prerano rođenu i izrazito nezrelu novorođenčad budući da se u tom razdoblju formiraju se prve zračno-krvne barijere i započinje minimalna proizvodnja surfaktanta, što omogućava preživljavanje uz specijaliziranu neonatalnu intenzivnu skrb (5).

1.1.4. Sakularna faza

Sakularna faza traje od 24. do 38. tjedna gestacije i predstavlja razvojni međustadij kada završava morfogeneza grananja, a alveolarizacija tek treba započeti. Ova faza je potrebna jer su

morfogeneza grananja i alveolarizacija potpuno različiti genetski programi koji se ne odvijaju paralelno (14).

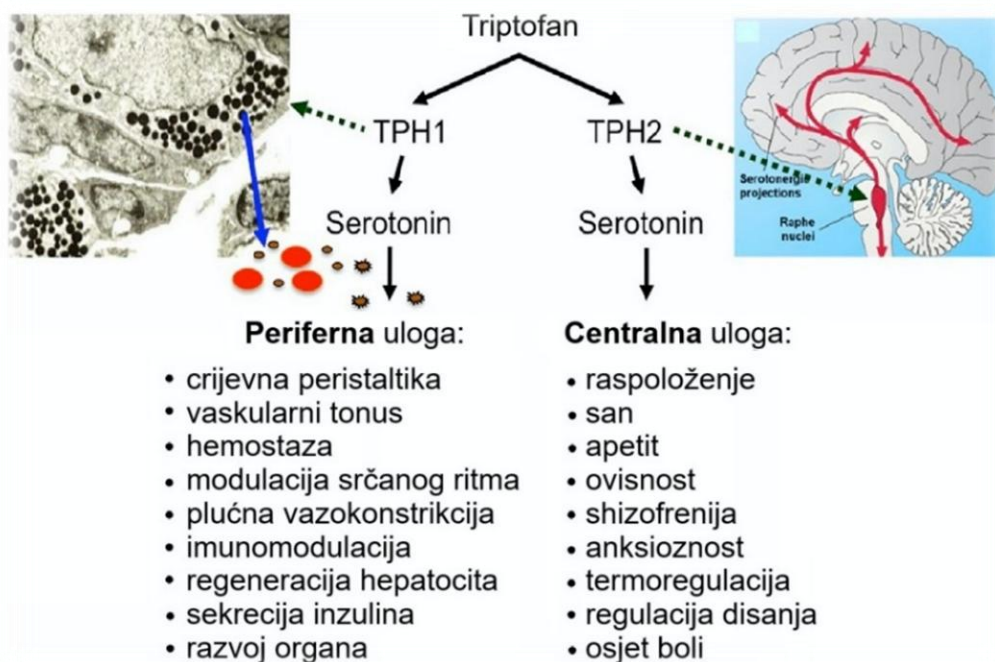
Na početku sakularne faze, terminalni (acinusni) dišni putovi produžuju se i proširuju, osobito na svojim krajnjim završecima, gdje formiraju proširene zračne prostore poznate kao „sakule“, po kojima je ova razvojna faza dobila ime. Ti zračni prostori se još nazivaju i završne vrećice ili primitivne alveole (13), a tijekom vremena postaju sve veći i bolje definirani, dok se mezenhimsko tkivo između njih kondenzira (**Slika 3-c**). Smanjenje debljine intersticija i kapilarne mreže omogućuje uspostavu funkcionalnih zračno-krvnih barijera pogodnih za izmjenu plinova (5, 6, 31). Dolazi do daljnje diferencijacije alveolarnog epitela. Pneumociti tipa I postaju brojčano dominantni i razvijaju vrlo tanke citoplazmatske izdanke koji sudjeluju u stvaranju zračno-krvne barijere. Pneumociti tipa II sazrijevaju i počinju aktivno sintetizirati i lučiti surfaktant (8). Na završetku sakularne faze, plućni parenhim sadrži debele, nezrele septume koje karakterizira dvostruki kapilarni sloj, razdvojen središnjim vezivnim tkivom (5).

1.1.5. Alveolarna faza

Alveolarna faza razvoja pluća započinje u kasnom fetalnom razdoblju (oko 36. tjedna gestacije) i nastavlja se nakon rođenja, prema novijim istraživanjima čak i do rane odrasle dobi (10, 32, 33). U ovoj fazi odvija se proces formiranja alveola, tijekom kojeg septumi izrastaju iz zidova sakula i time dijele distalne sakule u pojedinačne alveole, čime se značajno povećava površina za izmjenu plinova (10). Pri rođenju ljudska pluća sadrže sve provodne dišne putove i milijune perifernih zračnih prostora, većinom sakularnog tipa, čije su stijenke debele i sadrže dvostruku kapilarnu mrežu. Za razliku od toga, zrele alveolarne pregrade u odraslih sadrže samo jednu kapilarnu mrežu izloženu zraku s obje strane. Ove početne strukture nazivaju se primarnim septama i predstavljaju temelj za proces alveolarizacije (34). Paralelno s time odvija se maturacija mikrovaskularne mreže, pri čemu se dvostruka kapilarna mreža karakteristična za sakularnu fazu fuzionira u jedinstveni kapilarni sustav. Kao rezultat toga, svaka kapilara postaje potpuno okružena površinama za izmjenu plinova. Rast pluća nakon rođenja bazira se uglavnom na povećanju broja alveola i respiracijskih bronhiola (5, 7, 32).

1.2. Serotonin

Serotonin je jedna od najstarijih signalnih molekula. Kao rezultat ove duge evolucijske povijesti, igra različite uloge u normalnoj fiziologiji, uključujući razvojnu, kardiovaskularnu, respiratornu, gastrointestinalnu i endokrinu funkciju (35, 36). Njegov službeni kemijski naziv je 5-hidroksitriptamin (5-HT), a po svom kemijskom sastavu pripada skupini biogenih monoamina, zajedno s adrenalinom, noradrenalinom, dopaminom i histaminom. Poznat je kao neurotransmiter odgovoran za prijenos informacija između živčanih stanica, kako u središnjem (CNS, eng. *central nervous system*) tako i u preiferanom živčanom sustavu (PNS, eng. *peripheral nervous system*). Osim za razvoj središnjeg živčanog sustava, odgovoran je i za njegovu funkciju, gdje kontrolira san, apetit, raspoloženje i druge ključne procese u mozgu (37, 38). Osim živčanog sustava, serotonin igra značajnu ulogu u velikom broju drugih tkiva i organskih sustava kao periferni hormon, gdje djeluje parakrino, autokrino i endokrino (36, 39) (Slika 4).



Slika 4. Uloga perifernog i centralnog serotonina. Preuzeto i prilagođeno iz Herr N, Bode C, Duerschmied D. The effects of serotonin in immune cells. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4:48. (37). doi: 10.3389/fcvm.2017.00048. Licenca: CC BY 4.0.; link: <https://interoperable-europe.ec.europa.eu/licence/creative-commons-attribution-40-international-cc-40>.

U gastrointestinalnom traktu (GI, eng. *gastrointestinal*) uključen je u regulaciju crijevne peristaltike, lučenja tekućina i percepciji osjeta boli (39). U kardiovaskularnom sustavu potiče kontrakciju glatkih mišića krvnih žila i ima važnu ulogu u zgrušavanju krvi, modulaciji srčanog ritma, vaskularnog tonusa i hemostaze (40, 41). Nadalje, u plućima sudjeluje u modulaciji respiratornog ritma i plućne vazokonstrikcije (35, 117). U jetri stimulira regeneraciju hepatocita (42), dok u gušterači regulira sekreciju inzulina i diferencijaciju β -stanica (43, 44), a u koštanom sustavu inhibira stvaranje koštanog tkiva (45). Osim toga, ima ulogu u regulaciji urođene i stečene imunosti, te mu je pripisan čitav niz imunoregulacijskih funkcija. On djeluje kao medijator upale između ostalog inducirajući sekreciju citokina (37, 46, 47).

Njegovo djelovanje je visoko kontekstualno, ovisno o vrsti receptora, ciljanoj stanici i lokalnoj koncentraciji (36, 48). Rano pojavljivanje serotonina tijekom razvoja kralježnjaka (49, 50) i beskrležnjaka (51, 52) dovelo je do hipoteze da ovaj neurotransmiter ima važnu ulogu tijekom embrionalnog i fetalnog razdoblja (53). Serotonin tijekom tog razdoblja ima ključnu ulogu u razvoju brojnih organa, djelujući ne samo kao neurotransmiter već i kao morfogenetski čimbenik koji regulira proliferaciju, diferencijaciju, migraciju i apoptozu stanica (53-57). Njegovo djelovanje potvrđeno je u razvoju mozga, srca, pluća, crijeva, jetre, gušterače, posteljice i koštanog sustava (27, 44, 45, 55, 58-61). Kroz te procese, serotonin doprinosi pravilnom oblikovanju organa i tkiva te održavanju homeostaze tijekom ranog razvoja.

1.2.1. Otkriće serotonina

Talijanski kemičar i farmakolog Vittorio Ersparmer 1938. godine prvi je opisao serotonin kao supstancu koja uzrokuje kontrakciju glatkih mišića uterusa kod štakora. Budući da je izolirao iz enterokromafinskih stanica gastrointestinalnog trakta nadjenao joj je ime enteramin (35, 62). Nekoliko godina kasnije, 1948., Maurice Rapport, Arda Green i Irvine Page s klinike Cleveland u SAD-u izolirali su supstancu iz krvnog seruma goveda koja prilikom zgrušavanja krvi uzrokuje kontrakciju krvnih žila (vazokonstrikciju) i nazvali je serotonin. Sam naziv proizlazi iz činjenice da je tvar pronađena u serumu ("sero") i utječe na tonus krvnih žila ("tonin") (63, 64). Dok je enteramin imao veliko mjesto u znanstvenoj literaturi u to vrijeme, 1952. godine ustanovljeno je da aktivna komponenta u enteraminu identična serotoninu (35, 65). Tek 1953. godine, Twarog i Page dokazali su prisutnost serotonina u mozgu kod pasa, štakora i zečeva, što je za njih bilo

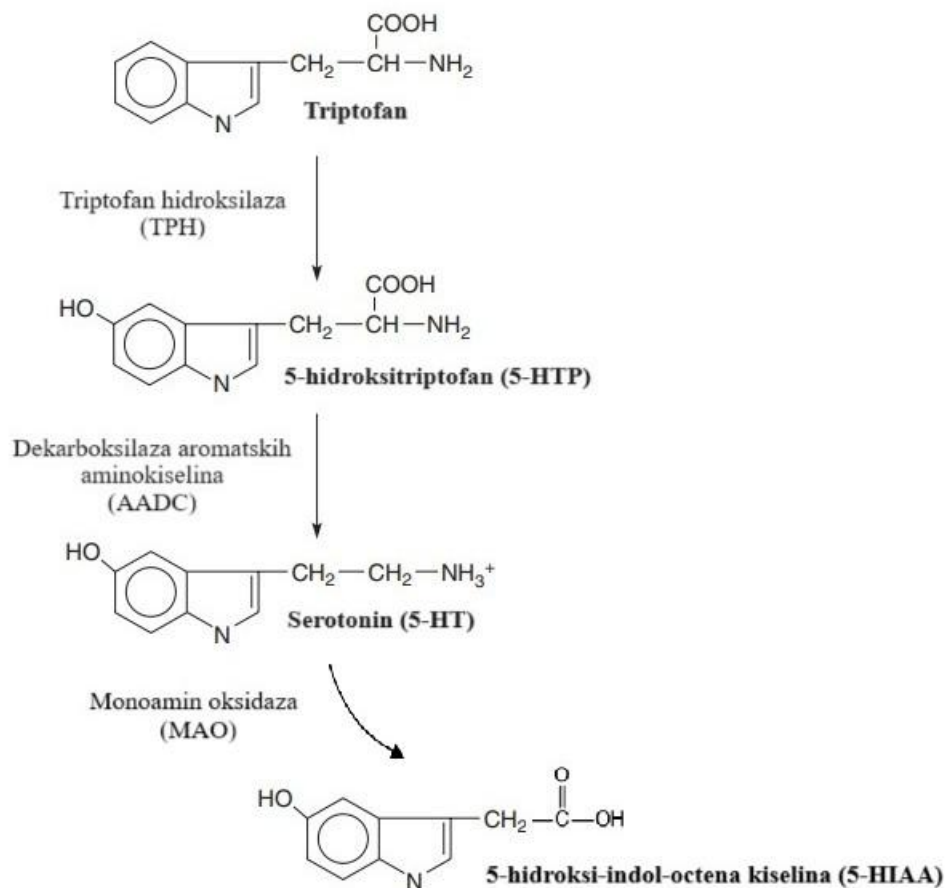
poprilično iznenađujuće (66, 67). Unatoč otkriću, u to je vrijeme postojao značajan otpor ideji da serotonin ima bilo kakav značaj za funkcioniranje ljudskog mozga, iako su neke studije sugerirale istaknutu ulogu serotonina u mentalnim poremećajima, ali još uvijek u kontekstu vazokonstriktora budući da još nije bilo razloga vjerovati da bi mogao imati ulogu u prijenosu živčanih impulsa (68). Istraživanja na području neuroznanosti postaju aktualna zahvaljujući švicarskom kemičaru Robertu Hofmanu koji je 1943. sintetizirao dietilamid lizergične kiseline (LSD) i otkrio njegovo psihoaktivno djelovanje. Od tada, LSD je promoviran kao istraživački alat u psihijatriji, posebno u razumijevanju shizofrenije, koja se do tada smatrala posljedicom lošeg odgoja, a ne kroničnom psihičkom bolešću (65). LSD je svojom kemijskom strukturom jako sličan serotoninu i njegov je antagonist, zbog čega postaje moćno oruđe na raspolaganju farmakolozima za razjašnjavanje fiziološkog djelovanja serotonina unutar CNS-a, a kasnije i za otkrića serotoninских receptora (65).

1.2.2. Metabolizam serotonina

Serotonin nastaje u enterokromafinskim stanicama gastrointestinalnog trakta, ali također ga proizvode i neuroni crijevnog živčanog sustava (ENS, eng. *enteric nervous system*)) i CNS-a (38, 69). Samo 1%-2% serotonina proizvode serotonergički neuroni u mozgu, dok čak 90% serotonina proizvode enterokromafine stanice (70). Novije studije su pokazale da pulmonalne neuroendokrine stanice (PNEC, eng. *pulmonary neuroendocrine cells*) i endotelne stanice plućne arterije ljudskim plućima također sintetiziraju serotonin (71-73). Stanice sinciciotrofoblasta posteljice također izražavaju enzime triptofan hidroksilaza 1 (Tph1, eng. *tryptophan hydroxylase 1*), dekarboksilaza aromatskih aminokiselina (AADC, eng. *aromatic amino acid decarboxylase*) i monoamin oksidaza (MAO, eng. *monoamine oxidase*), koji omogućuju sintezu i razgradnju serotonina iz majčinog triptofana (135). Ostatak sintetiziraju Langerhansovi otočići gušterače, mliječne žlijezde, adipozno tkivo, osteoklasti, adipociti i glatko mišićno tkivo aorte (69, 74, 75).

Serotonin se sintetizira iz esencijalne aminokiseline L-triptofana, kratkim metaboličkim procesom koji uključuje djelovanje dvaju bitnih enzima: triptofan hidroksilazu (TPH, eng. *tryptophan hydroxylase*) i AADC (Slika 5). L-triptofan, aminokiselinski prekursor, pretvara se u 5-hidroksitriptofan (5-HTP, eng. *5-hydroxytryptophan*) uz pomoć enzima TPH o čijoj dostupnosti uvelike ovisi količina stvaranja serotonina. TPH postoji u dvije izoforme: triptofan hidroksilaze 1 (TPH1) koja je eksprimirana u perifernim tkivima, dok se triptofan hidroksilaza 2 (TPH2, eng.

tryptophan hydroxylase 2) primarno nalazi u središnjem živčanom sustavu (40). Djelovanjem enzima dekarboksilaze 5-hidroksitriptofan se zatim pretvara u 5-hidroksitriptamin (5-HT, serotonin) (**Slika 5**).



Slika 5. Sinteza i razgradnja serotonina. Preuzeto i prilagođeno iz Roth W, Zadeh K, Vekariya R, Ge Y, Mohamadzadeh M. Tryptophan metabolism and gut-brain homeostasis. *Int J Mol Sci* 2021;22(6):2973 (76). doi: 10.3390/ijms22062973. Licenca: CC BY 4.0.; link: <https://interoperable-europe.ec.europa.eu/licence/creative-commons-attribution-40-international-cc-40>.

Kada se serotonin sintetizira u crijevnom epitelu od strane enterokromafinskih stanica, izlučuje se u intersticijski prostor, potom se uklanja pomoću selektivnog transportera za ponovnu pohranu serotonina (SERT, eng. *serotonin transporter*) koji je izražen u gotovo svim epitelnim

stanicama ili neuronima (60). Nakon mehaničke ili kemijske stimulacije, serotonin (5-HT, 5-hidroksitriptamin (eng. *5-hydroxytryptamine*) se otpušta u intersticijski prostor lamine proprije i veže na receptore što ima utjecaj na cijeli niz staničnih procesa i regulaciju mnogih signalnih puteva. Signalizacija serotoninom prestaje nakon ulaska serotonina u epitelne stanice putem SERT-a – membranskog proteina koji posreduje u unosu serotonina iz krvne plazme u unutrašnjost trombocita - gdje se enzimatski razgrađuje, ili ulazi u krvotok, gdje ga preuzimaju trombociti te ga pohranjuju za kasniju upotrebu (39). Većina serotonina u tijelu cirkulira putem krvotoka, a transportiraju ga trombociti koji su ujedno i veliko skladište serotonina. Oni reguliraju koncentraciju serotonina u krvnoj plazmi i njihovom aktivacijom serotonin se otpušta u blizini ciljanog područja djelovanja (37, 77). Budući da trombociti ne posjeduju enzim za sintezu serotonina, nisu ga u mogućnosti proizvesti, nego ga unose uz pomoć SERT-a (78).

Serotonin se razgrađuje prvenstveno u epitelnim stanicama i jetri, a manji dio može se razgraditi i u endotelu krvnih žila. Glavni enzim odgovoran za njegovu razgradnju je MAO, posebice izoforma MAO-A, stvarajući nestabilan međuproizvod koji zatim podliježe oksidaciji uz pomoć enzima aldehid dehidrogenaze u 5-hidroksiindooctenu kiselinu (5-HIAA, eng. *5-Hydroxyindoleacetic acid*) koja se izlučuje urinom (56, 57) (**Slika 5**).

1.3. Serotoninski receptori

Inhibicijski ili ekscitatorni učinci sistemskog serotonina snažno ovise o profilu ekspresije serotoninskih receptora. Budući da je serotonin, kao i svi su neurotransmiteri, hidrofilna molekula, ne može proći kroz staničnu membranu ciljnih stanica. Stoga djeluje na način da se veže za receptore na staničnoj površini i na taj način uzrokuje različite unutarstanične odgovore (79) čime utječe na brojne neuronske, fiziološke i bihevioralne procese (80). Serotoninski receptori nalaze se u širokom rasponu organizama unutar evolucijskog stabla, od vinske mušice (lat. *Drosophila melanogaster*) do čovjeka i pritom dijele značajnu ortologiju. Odnosno, njihovi geni imaju jako sličnu DNK sekvencu, podudaraju se u položaju u genomu i obavljaju slične ili iste funkcije kod različitih vrsta. Time spadaju među najstariju i najsloženiju skupinu receptora (35).

1.3.1. Podjela serotoninskih receptora

Gaddum i Picarelli (1957) prvi su ustanovili postojanje receptora za serotonin u tankom crijevu sisavaca i opisali dva farmakološki različita tipa receptora: D- i M-receptor. Utvrdili su da „D” tip receptora, koje inhibira dibenzilin, posreduju u kontrakciji glatkih mišića, dok „M” tip, koji se može inhibirati morfinom, uzrokuje depolarizaciju kolinergičkih neurona u ileumu zamorca (lat. *Cavia porcellus*) (81). Farmakološke studije koje su uslijedile pokazale su da je broj različitih serotoninskih receptora znatno veći. S novim otkrićima tijekom 80-ih i 90-ih godina prošlog stoljeća klasifikacija serotoninskih receptora se mijenjala. Kada su klasifikacija i jedinstvena nomenklatura uspostavljene, serotoninski receptori tipa „M” postali su poznati kao 5-HT₃ receptori, a tipa „D” kao 5-HT_{2A} receptori (82, 83). Danas važeća nomenklatura razlikuje trinaest različitih receptora (84). Podijeljeni su u sedam skupina (5-HT₁–7) na temelju sekvence, farmakološke sličnosti i mehanizma prijenosa signala (**Tablica 1**) (85, 86). Svi ovi podtipovi serotoninskih receptora su transmembranski proteini povezani s G-proteinima (engl. G-protein-coupled receptors, GPCR), s izuzetkom podtipa 5-HT₃, koji je ionski kanal aktiviran vezanjem liganda. Receptori 5-HT₃ skupine se još nazivaju i ionotropnim receptorima dok se receptori povezanih s G-proteinima metabotropnim receptorima (35, 69). Glavna osobina ionotropnih receptora je nizak afinitet za svoj ligand, ali izuzetno brza aktivacija (nekoliko milisekundi) (87).

Nasuprot tome, metabotropni receptori pokazuju visok afinitet za ligand i sporiju brzinu aktivacije (u sekundama ili više) (82, 88, 89).

Tablica 1. Podjela serotoninskih receptora

Tip receptora	Skupina receptora	Podskupina	Potencijal	Mehanizam prijenosa signala
Povezan s Gai/o proteinom	5-HT1	5-HT1A 5-HT1B 5-HT1D 5-HT1E 5-HT1F	Inhibitorni	Smanjuje koncentraciju cAMP-a
	5-ht5	5-ht5A 5-ht5B		
Povezan s Gαq proteinom	5-HT2	5-HT2A 5-HT2B 5-HT2C	Eksitacijski	Povečava koncentraciju IP3 i DAG
Povezan s Gas proteinom	5-HT4 5-HT6 5-HT7		Eksitacijski	Povečava koncentraciju cAMP-a
Ionski kanal nadziran ligandom	5-HT3	5-HT3A 5-HT3B 5-ht3C	Eksitacijski	Depolarizira staničnu membranu

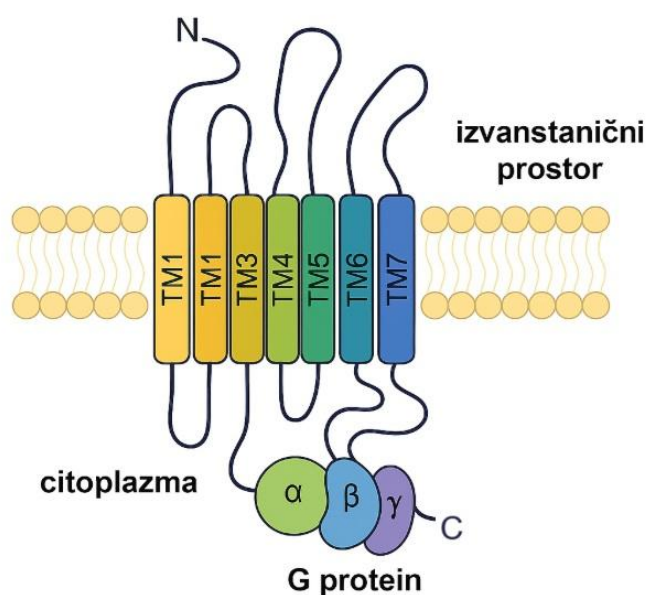
IP3: inozitol trifosfat; DAG: diacilglicerol; cAMP: ciklički adenzin monofosfat. Tablica izrađena prema referenci (90).

Metabotropni receptori mogu se podijeliti na tri skupine prema vrsti G-proteina kojeg vežu (Gai/o, Gαq ili Gas) i mehanizmu prijenosa signala (**Tablica 1**). U receptore koji su povezani s Gai/o proteinima svrstavamo receptore 5-HT1 skupine i 5HT5 skupine. Prilikom njihove aktivacije dolazi do inhibicije adenilat ciklaze i opadanja unutarstaničnog cikličkog adenzin monofosfata (cAMP, eng. *cyclic adenosine monophosphate*). Nadalje, imamo 5-HT2 skupinu koju ubrajamo u receptore povezane s Gαq proteinom čija aktivacija dovodi do stimulacije

fosfolipaze C (PLC, eng. *phospholipase C*)) i povećavanja koncentracije unutarstaničnog inozitol trifosfata (IP3, eng. *inositol trisphosphate*) i diacil-glicerol (DAG, eng. *diacylglycerol*). I na kraju, receptori povezani s G α s proteinima koji stimuliraju adenilat ciklazu što rezultira povećanjem cAMP-a u stanici, kojima pripadaju 5-HT₄, 5-HT₆ i 5-HT₇ skupine (35, 65, 90).

1.3.2. Metabotropni receptori

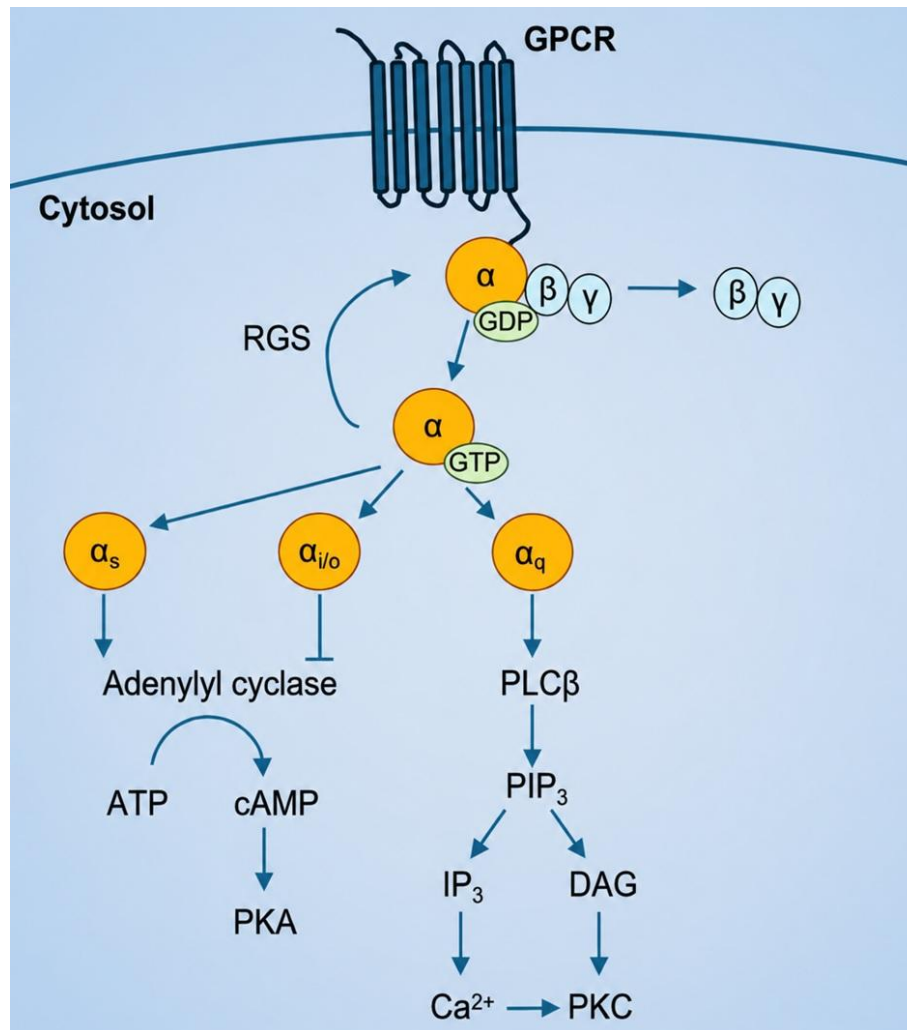
Receptori povezani s G proteinima (metabotropni receptori) po svojoj strukturi su integralni membranski proteini sa sedam hidrofobnih transmembranskih domena, tri unutarstanične i tri izvanstanične petlje. Karboksilni (C) kraj orijentiran je prema citoplazmi, dok je amino (N) kraj orijentiran prema izvanstaničnom prostoru. Heterotrimerni G protein je povezan s receptorom preko njegove unutarstanične petlje s karboksilnim krajem, a sastoji se od tri podjedinice označene kao α , β i γ (35) (Slika 6).



Slika 6. Prikaz građe metabotropnog receptora. Slika izrađena prema referenci Zhang M, Chen T, Lu X, Lan X, Chen Z, Lu S. G protein-coupled receptors (GPCRs): advances in structures, mechanisms, and drug discovery. Signal Transduct Target Ther. 2024;9(1):88 (91). doi: 10.1038/s41392-024-01803-6. Licenca: CC BY 4.0.; link: <https://interoperable-europe.ec.europa.eu/licence/creative-commons-attribution-40-international-cc-40>.

Mehanizam prijenosa signala kod ove vrste receptora zasniva se na aktivaciji G proteina koji djeluju kao fiziološki „prekidači“ regulirajući djelovanje unutarstaničnih procesa kao odgovor na izvanstanične signale. Tako ligand, odnosno serotonin koji se veže za receptor na površini stanice, započinje niz unutarstaničnih promjena, a signal na kraju dolazi do jezgre ciljane stanice,

te dovodi do promjena u genskoj ekspresiji (Slika 9.) (79, 82). Aktivnost G-proteina nadziru gvanin-nukleotidi kao što su gvanozin trifosfat (GTP, eng. *guanosine triphosphate*) i gvanozin difosfat (GDP, eng. *guanosine diphosphate*) koji se vežu se na njegovu α podjedinicu, od tuda potječe naziv “G protein”. To rezultira aktivacijom G proteina koji se potom odvaja od receptora i prenosi signal vezanjem na ciljni protein (adenilat-ciklazu ili fosfolipazu C) prilikom čega se aktiviraju drugi glasnici (**Slika 7**).



Slika 7. Shematski prikaz signalnih putova posredovanih G-proteinima. Receptori povezani s G proteinima objedinjuju tri mehanizma prijenosa signala ovisno o vrsti G proteina kojeg vežu: $G_{ai/o}$, G_{aq} ili G_{as} . Vezanje serotonina uzrokuje konformacijsku promjenu receptora, te se potiče otpuštanje vezanog GDP-a u zamjenu za GTP. Kad α -podjedinica veže GTP, odvaja se od β/γ kompleksa i postaje aktivna. Aktivna alfa podjedinica (ovisno o vrsti – $G_{ai/o}$, G_{aq} ili G_{as}) veže

se na ciljane enzime. *Gas* (stimulirajuća): aktivira adenilat ciklazu (AC) što rezultira povećanjem razine cAMP-a u stanici i dovodi do aktivacije proteinske kinaze A (PKA, eng. *protein kinase A*). *Gai/o* (inhibirajuća): inhibira adenilat ciklazu (AC, eng. *adenylate cyclase*) i kao rezultat dolazi do opadanja unutarstaničnog cAMP-a. *Gaq* aktivira fosfolipazu C β (PLC β) i fosfatidilinozitolni (PIP3) signalni put, čime se povećava koncentracija kalcijevih iona u stanici. PLC β katalizira hidrolizu membranskog fosfatidil-inozitol-4,5-trifosfata (PIP3) pri čemu nastaju drugi glasnici DAG i IP3 koji pobuđuju dvije kaskade unutarstaničnog signaliziranja. DAG aktivira protein-kinazu C (PKC, eng. *protein kinase C*) koja potom aktivira druge unutarstanične ciljeve uključujući i transkripcijske faktore te na taj način dovodi do promjena u genskoj ekspresiji i stimulacije stanične proliferacije. IP3 djeluje tako da potiče otpuštanje kalcijevih iona iz unutarstaničnih spremišta kao što je endoplazmatski retikulum, što utječe na aktivnost ciljnih proteina kao što su protein-kinaze i fosfataze. Aktivnost alfa podjedinice prestaje hidrolizom vezanog GTP-a, te se inaktivna podjedinica (uz koju je sada vezan GDP) ponovno spaja s β/γ kompleksom. Shematski prikaz prilagođen prema referenci Wu D, Casey PJ. GPCR-G α 13 involvement in mitochondrial function, oxidative stress, and prostate cancer. *Int J Mol Sci.* 2024;25(13):7162. doi:10.3390/ijms25137162 (92). Licenca: CC BY 4.0; link: <https://interoperable-europe.ec.europa.eu/licence/creative-commons-attribution-40-international-cc-40>.

1.3.2.1. 5-HT1A receptor

5-HT1A receptor je jedan od najbolje opisanih serotoninских receptora. Kao svi receptori iz 5-HT1 skupine, ima jako visoki afinitet za serotonin (93). Osim toga, jedan je od prvih G-proteinskih receptora (GPCR-a) kojima su klonirani gen i cDNA (94-96). Kod ljudi, gen za ovaj receptor nalazi se na 5. kromosomu (5q11.2-q13) i kodira za protein od 422 aminokiseline (94). Radi se o genu bez introna, a eksprimiran je uglavnom u mozgu, slezeni, neonatalnom bubregu i crijevima (94, 95). 5-HT1A receptori pripadaju skupini 5-HT1 receptora povezanih s Gi/G0 proteinima koji djeluju na način da inhibiraju enzim adenilat-ciklazu (iako su opisani i drugi mehanizmi djelovanja ovih receptora), što ima utjecaj na cijeli niz staničnih procesa i regulaciju mnogih signalnih puteva (86, 97). Adenilat ciklaza katalizira pretvorbu adenozin-trifosfata (ATP, eng. *adenosine triphosphate*) u cAMP. cAMP je drugi glasnik koji unutar stanice aktivira enzim

cAMP ovisnu protein-kinazu A (PKA) koja fosforilira serinske ostatke na ciljnim proteinima i tako ih aktivira ili inhibira (80).

Najveća gustoća 5HT-1A receptora prisutna je u limbičkim dijelovima mozga, naročito hipokampusu, amigdalama, septumu i kortikalnim područjima, kao i u dorzalnim jezgrama rafe (98). U tom području 5-HT1A receptor djeluje kao autoreceptor, koji pri aktivaciji smanjuje aktivnost („firing“) serotoninских neurona (80).

Efekt aktivacije 5-HT1A receptora i njihova funkcija u CNS-u izražena je kroz kontrolu raspoloženja, agresije, anksioznosti, ovisnosti, seksualnog ponašanja, apetita, mučnine i povraćanja, te pamćenja. Osim toga, ovi receptori sudjeluju u regulaciji disanja, spavanja, termoregulacije i osjeta boli. 5-HT1A receptori smješteni na glatkim mišićnim stanicama dišnih putova, gdje posreduju njihovu relaksaciju (99). Nadalje, imaju važnu ulogu u kardiovaskularnom sustavu, gdje sudjeluju u regulaciji krvnog tlaka, srčanog ritma i vazodilatacije (90). Putem ovih receptora serotonin također ima učinak vazodilatacije kod glatkog mišićja krvnih žila (100). Nadalje, opisani su i mitogeni učinci 5-HT1A receptora, povezani s intracelularnim reaktivnim kisikovim spojevima (ROS, eng. *reactive oxygen species*) i/ili signalnim putevima protein kinaza aktiviranih mitogenom (MAPK eng. *mitogen-activated protein kinase*), Akt i Rho-asociranim protein kinazama (ROCK) (101). Utvrđeno je da serotonin utječe na sekreciju citokina kroz stimulaciju 5-HT1A receptora smještenih na monocitima (102) i limfocitima (103). Glatke mišićne stanice krvožilnog sustava također odgovaraju na serotonin sintezom interleukina 6 (IL-6, eng. *interleukin 6*) (104).

1.3.2.2. 5-HT2A receptor

Gen za 5-HT2A receptor (HTR2A) nalazi se na ljudskom kromosomu 13q14–q21 i kodira za protein od 471 aminokiseline u štakora, miša i čovjeka (105). Receptor 5-HT₂A signalizira putem Gq proteina, aktivirajući fosfolipazu C (PLC), što rezultira povećanjem inozitol trifosfata (IP₃) i unutarstanične razine kalcija (Ca²⁺), te posljedičnom aktivacijom PKC (89, 106). Receptori 5-HT2A prisutni su u mnogim dijelovima središnjeg živčanog sustava, uključujući moždanu koru, bazalne ganglije, hipokampus, talamus, mali mozak i hipotalamus. Međutim, najveća ekspresija zabilježena je u moždanoj kori (80, 107). Opsežna istraživanja provedena su s ciljem razjašnjavanja uloge 5-HT2A receptora u mozgu, pri čemu je utvrđeno da sudjeluju u procesima

poput kognicije i radne memorije, te da su povezani s afektivnim poremećajima poput shizofrenije, bipolarnog poremećaja i depresije, kao i s ovisnošću o psihoaktivnim tvarima (108-110). Osim u živčanom sustavu, ovi receptori također su izraženi i u brojnim perifernim tkivima (40, 56). U perifernim tkivima, receptori 5-HT2A nalaze se u trombocitima, glatkoj muskulaturi krvnih žila, te u glatkoj muskulaturi maternice (106, 111, 112). Ova vrsta receptora također je prisutna na stanicama imunskog sustava – monociti, eozinofili, dendritičke stanice, B limfociti i T limfociti, putem kojih serotonin pokazuje imunoregulacijske učinke (37, 109, 113). Nau i sur. su pokazali da 5-HT2A receptor za razliku od 5-HT1A receptora posjeduje snažne protupupalne učinke (40), djelujući na prevenciju vaskularne upale i astme (114, 115). Nedavna istraživanja dodatno naglašavaju važnost 5-HT2A receptora u regulaciji upalnih odgovora. Pokazano je da njihova aktivacija u primarnim aortalnim glatkim mišićnim stanicama putem agonista (R)-2,5-dimetoksi-4-jodoamfetamina ((R)-DOI, (R)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine) snažno inhibira faktor nekroze tumora-alfa (TNF- α , eng. *tumor necrosis factor-alpha*). TNF- α -posredovanu upalnu signalizaciju, uključujući ekspresiju ICAM-1 (eng. *intercellular adhesion molecule 1*), VCAM-1 (eng. *vascular cell adhesion molecule 1*), IL-6, te translokaciju transkripcijskog faktora NF- κ B (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Isto tako selektivna aktivacija 5-HT2A receptora pomoću agonista (R)-DOI sprječava regrutaciju eozinofila u eksperimentalnom modelu astme (82). Poznato je da u vaskularnom sustavu sudjeluju u modulaciji vazokonstrikcije (35), kao i agregaciji trombocita, stvaranjem tromba te spazmom koronarnih arterija (116). Antagonisti 5-HT2A receptora primjenjuju se u liječenju kardiovaskularnih bolesti (106).

Uloga 5-HT2A receptora u drugim tkivima, kao što su mezangijske stanice bubrega, fibroblasti, jetra i limfociti, još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, no brojne studije ukazuju na povezanost s procesima stanične proliferacije i diferencijacije (54-57). Nemecek i sur. opisuju znatan učinak serotonina kroz stimulaciju 5-HT2A receptora na proliferaciju glatkih mišićnih stanica aorte (SMC, eng. *smooth muscle cells*) u staničnoj kulturi (47). Nadalje, studija objavljena u časopisu *Nature Communications* pokazala je da selektivni inhibitori 5-HT2A receptora smanjuju diferencijaciju miofibroblasta i remodelaciju tkiva (117). Ovi receptori reguliraju također i proliferaciju neurona, izrastanje neurita, te formiranje sinapsi (51, 118, 119). Studija objavljena u časopisu *Brain Research* pokazala je važnost 5-HT2A receptora u razvoju mozga, uključujući neurogenezu, migraciju neurona i sinaptogenezu (53).

Uz to, neka istraživanja upućuju na njihovu uključenost u metaboličke procese. Tako je, primjerice, pokazano da blokada 5-HT₂ receptora ketanserinom može smanjiti razinu glukoze u plazmi i spriječiti povećanje tjelesne mase kod miševa hranjenih prehranom bogatom mastima (120). Nadalje, studija objavljena u časopisu *Nature Communications* potvrdila je da je aktivnost 5-HT_{2A} receptora nužna za diferencijaciju ljudskih primarnih potkožnih preadipocita u adipocite, što dodatno ističe njihovu ulogu u procesima stanične diferencijacije (94).

1.3.3. Ionotropni receptori

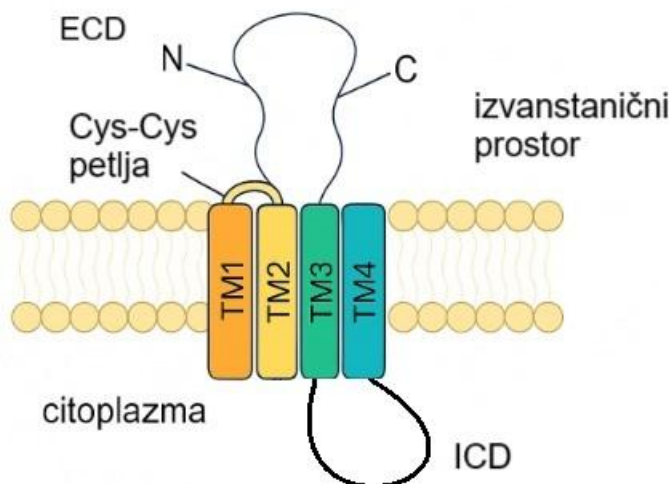
1.3.3.1. 5-HT₃A receptor

Kod ljudi, gen za ovaj receptor sastoji se od 9 egzona i 8 introna, te se nalazi na 11. (11q23.1-q23.2) kromosomu (121). Ovaj receptor ubraja se u skupinu ionotropnih receptora - ionskih kanala nadziranih ligandom, koji igraju ključnu ulogu u prijenosu živčanih impulsa. U znanstvenoj literaturi se navodi kao jedan receptor jer svi analozi djeluju na gotovo isti način uz male razlike (122). Pripadaju Cys-loop superobitelji receptora, zajedno sa nikotinskim acetilkolinskim (nAChR), glicinskim i GABA receptorima (83). Radi se o ionskim kanalima selektivnim za katione (prvenstveno natrij (Na⁺), kalij (K⁺) i kalcij (Ca²⁺)), koji se otvaraju kao odgovor na vezanje neurotransmitera i tako posreduju pri prijenosu kationa kroz staničnu membranu što dovodi do depolarizacije membrane i pobuđivanje neurona (98, 123). Premda ih možemo naći u membranama svih stanica, zahvaljujući Hodgkinu i Huxleyu najbolje su istraženi u živčanim i mišićnim stanicama, gdje je njihovo nadzirano otvaranje i zatvaranje odgovorno za prijenos električnih signala (79). Kao što je ranije spomenuto, njihove glavne osobine su nizak afinitet za svoj ligand, uz izuzetno brzu aktivacija (nekoliko milisekundi) (88).

Što se tiče strukture 5-HT₃ receptora, sastoji se od četiri hidrofobne transmembranske domene (TM, (eng. *transmembrane domain*), velike izvanstanične domene (ECD, eng. *extracellular domain*) koja sadrži kratku disulfidnu Cys-Cys petlju, te duge intracelularne domene (ICD, eng. *intracellular domain*) smještene između treće i četvrte TM podjedinice (83). Karboksilni (C) i amino (N) kraj orijentirani su prema izvanstaničnom prostoru (**Slika 8**).

Serotoninski 5-HT₃ receptori prisutni su i u središnjem i perifernom živčanom sustavu. U CNS-u, ovi receptori posebno su lokalizirani u moždanom deblu, u području *area postrema* i *nucleus tractus solitarius*, moždanim strukturama uključenima u refleks povraćanja. Također su izraženi u hipokampusu, *nucleus accumbens-u*, ventralnom tegmentalnom području, *substantia nigra* i moždanoj kori (124). Mutacije u genima koji kodiraju različite podjedinice 5-HT₃ receptora povezane su s pojavom bipolarnih afektivnih poremećaja, depresije i shizofrenije te mogu imati klinički značaj u predviđanju učinkovitosti njihovog liječenja (125). 5-HT₃R također su prisutni u enteričkom živčanom sustavu gastrointestinalnog trakta, gdje sudjeluju u regulaciji crijevnog motiliteta i peristaltike (126). Izražaj 5-HT₃ receptora zabilježen je također u

respiratornom, urogenitalnom, bubrežnom i kardiovaskularnom sustavu, što ukazuje na njihovu potencijalnu ulogu u imunomodulaciji i drugim fiziološkim procesima (125).



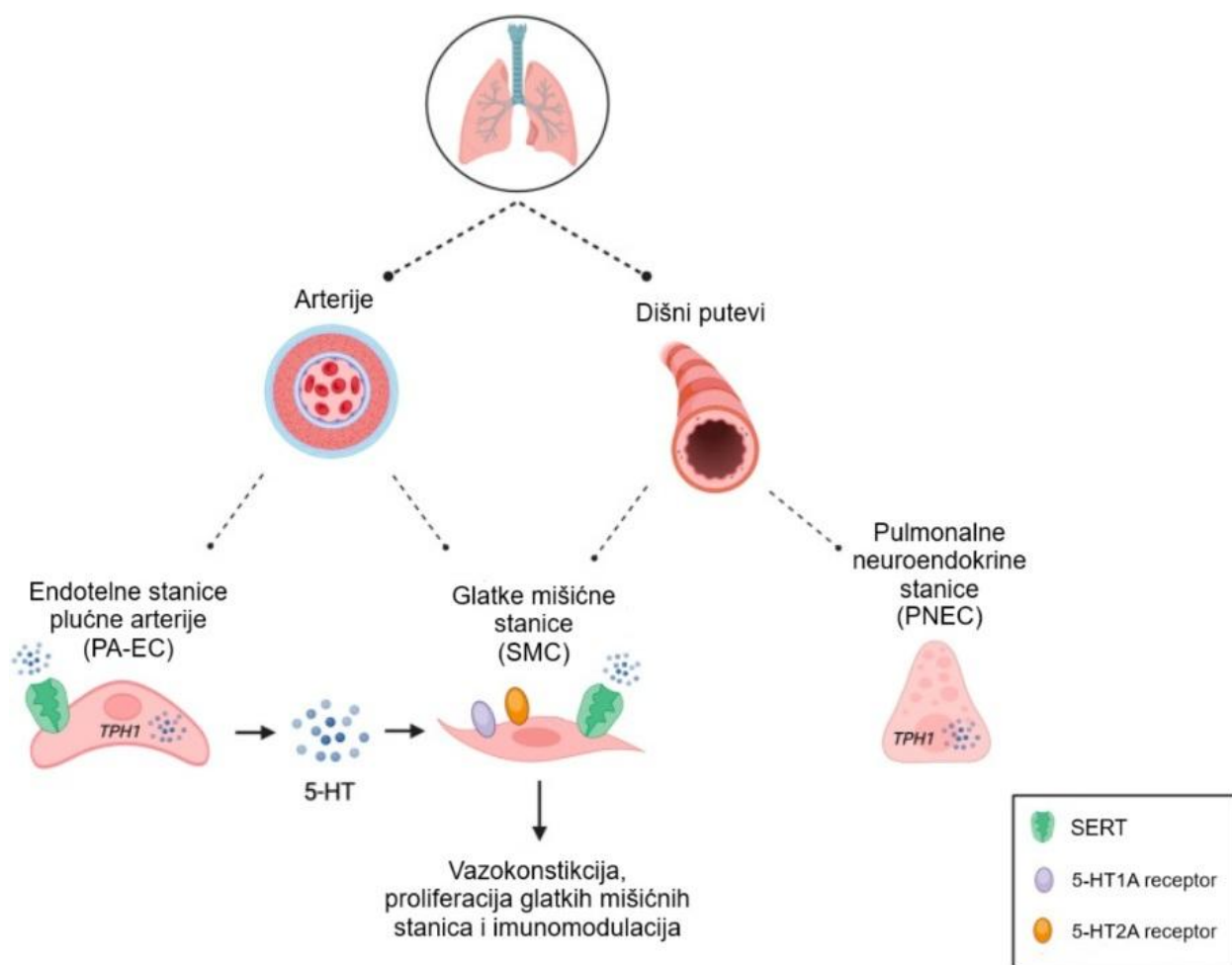
Slika 8. Prikaz građe ionotropnog receptora (5-HT3R). Sliku je izradila autorica prema referenci Irving H, Turek I, Kettle C, Yaakob N. Tapping into 5-HT(3) Receptors to modify metabolic and immune responses. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21) (125). doi: 10.3390/ijms222111910. Licenca: CC BY 4.0.; link: <https://interoperable-europe.ec.europa.eu/licence/creative-commons-attribution-40-international-cc-40>.

5-HT3 receptor je predmet intenzivnog istraživačkog interesa kao potencijalna terapijska meta. Antagonisti 5-HT3 receptora već se klinički primjenjuju u liječenju emezije izazvane kemoterapijom te u sindromu iritabilnog crijeva (127, 128). Osim toga, predloženi su kao potencijalne farmakološke mete u liječenju određenih psihijatrijskih poremećaja, uključujući anksioznost, shizofreniju i depresiju (129, 130). Također su učinkoviti u liječenju ovisnosti o alkoholu (131, 132), ali pokazuju ograničenu kliničku učinkovitost u liječenju ovisnosti o drugim psihoaktivnim tvarima (133, 134). Postoje indicije, premda još uvijek kontroverzne, da bi ovi antagonisti mogli imati terapijsku vrijednost i u liječenju fibromialgije, pruritusa, migrene i reumatskih bolesti (130). Protuupalna i imunomodulacijska svojstva antagonista 5-HT3 receptora također su opažena, što bi moglo objasniti obećavajuće rezultate u liječenju sistemske skleroze i drugih imunoloških poremećaja (133).

1.4. Uloga serotonina i njegovih receptora u plućima

U ljudskom organizmu serotonin (ima važnu ulogu u funkciji pluća, pri čemu njegovi ekscitatorni ili inhibicijski učinci ovise o profilu ekspresije serotonininskih receptora, ciljnoj stanici i lokalnoj koncentraciji (36, 48, 79). Neke od njegovih glavnih funkcija uključuju modulaciju respiratornog ritma i poticanje plućne vazokonstrikcije (36, 135). U ostvarivanju te zadaće serotonin djeluje putem aktivacije 5-HT_{2A} i 5-HT_{1A} receptora smještenih na glatkim mišićnim stanicama dišnih putova, pri čemu aktivacija 5-HT_{2A} receptora uzrokuje kontrakciju mišića, a 5-HT_{1A} receptora njihovu relaksaciju (99) (**Slika 9**). Dodatno, serotonin djeluje na presinaptičke 5-HT₃ i 5-HT₇ receptore na parasimpatičkim završecima, potičući otpuštanje acetilkolina, čime dodatno regulira tonus dišnih puteva (99). Utjecaj serotonina na glatkomišićni tonus dišnih puteva, osim o tipu receptora, također ovisi o njegovoj koncentraciji. Studija na zamorcima (lat. *Cavia porcellus*) pokazala je da serotonin u niskim koncentracijama izaziva kontrakciju, dok u višim koncentracijama uzrokuje relaksaciju glatkih mišića dušnika (136).

Osim na glatko mišićje dišnih puteva, serotonin djeluje i na glatko mišićje krvnih žila putem 5-HT₁ i 5-HT₂ receptora (**Slika 9**). Istovremeno, u kapilarnom endotelu može posredno potaknuti vazodilataciju stimulirajući sintezu dušikovog oksida (NO) (137). Aktivacija 5-HT₁ receptora kod čovjeka dovodi do vazodilatacije, dok 5-HT₂ receptori posreduju u vazokonstrikciji, što je ključno za regulaciju funkcije plućne cirkulacije (100). Ovi receptori igraju dodatnu ulogu u kardiovaskularnom sustavu u regulaciji krvog tlaka, srčanog ritma i ukupne vaskularne funkcije (90). U fetalnim plućima čovjeka 5-HT imunoreaktivne stanice detektirane su već od osmog tjedna gestacije (46), što podupire hipotezu o njegovoj važnoj ulozi u razvoju plućnog tkiva. Osim neurotransmitterske uloge, serotonin djeluje kao mitogen i morfogen, potičući proliferaciju i diferencijaciju stanica, što je dokumentirano u brojnim studijama (47, 116, 138). Na razvoj pluća značajno utječu mehanički podražaji, poput spontanij kontrakcija glatkih mišićnih stanica, koji uzrokuju protok amnionske tekućine kroz dišne putove, čime se stvaraju intermitentni tlakovi i napetosti unutar plućnog tkiva (26). Nedavne studije pokazale su da takvi mehanički podražaji potiču otpuštanje serotonina iz pulmonalnih neuroendokrinih stanica, koji zauzvrat stimulira proliferaciju i diferencijaciju epitelnih stanica i lučenje surfaktantnih lipida iz stanica tipa II alveolarnog epitela (27-29).



Slika 9. Pluća sudjeluju u sintezi, preuzimanju i metabolizmu serotonina. Sintezu 5-HT provode endotelne stanice plućne arterije (PA-EC) te pulmonalne neuroendokrine stanice (PNEC). Preuzimanje serotonina odvija se putem transportera serotonina (SERT), prisutnog u endotelnim i glatkim mišićnim stanicama plućnih arterija. Nadalje, glatke mišićne stanice plućne arterije (PA-SMC, (eng. *pulmonary artery smooth muscle cells*) eksprimiraju receptore povezane s G proteinima, koji se nakon vezanja 5-HT uključuju u proces vazokonstrikcije i proliferacije glatkih mišićnih stanica – oba procesa su ključna u razvoju plućne hipertenzije (PH). Preuzeto i prilagođeno iz Archambault JL, Delaney CA. A Review of serotonin in the developing lung and neonatal pulmonary hypertension. *Biomedicines*. 2023;11(11) (73). doi: 10.3390/biomedicines11113049. Licenca: CC BY 4.0.; link: <https://interoperable-europe.ec.europa.eu/licence/creative-commons-attribution-40-international-cc-40>.

Studija na fetalnim ovčama još 1980-ih pružila je prve farmakološke dokaze o stimulirajućem učinku serotonina na fetalno disanje (46, 139). Dok su kod čovjeka prvi pokreti fetalnog disanja zabilježeni oko 10. tjedna gestacije (5). Posteljica predstavlja važan izvor serotonina za razvijajući embrij(58). Stanice sinciotrofoblasta posteljice izražavaju enzime Tph1, AADC i MAO, koji omogućuju sintezu i razgradnju serotonina iz majčinog triptofana (135). Serotonin sintetiziran u posteljici ima važnu ulogu u ranom razvoju fetalnog mozga (56), ali sve je više dokaza da može utjecati i na razvoj drugih organa, uključujući pluća.

Poremećaji serotoninske signalizacije povezani su s nizom plućnih patologija koje mogu imati genetsku i/ili okolišnu osnovu. Primjeri uključuju sindrom iznenadne dojenačke smrti (SIDS), plućnu fibrozu i plućnu hipertenziju povezanu s uporabom SSRI antidepresiva ili supresiva apetita tijekom trudnoće, koji djeluju kao agonisti serotoninskih receptora ili inhibitori ponovne pohrane serotonina (135, 140-142). Smatra se da serotonin doprinosi razvoju plućne arterijske hipertenzije (PAH) putem vazokonstrikcije i vaskularnog remodeliranja (143). Serotonin potiče proliferaciju fibroblasta i glatkih mišićnih stanica plućne arterije (57, 144), što dovodi do zadebljanja medije i suženja lumena arterije. Lijekovi poput aminoreksa, fenfluramina i deksfenfluramina, koji se koriste kao supresivi apetita, snažno su povezani s razvojem PAH ponajprije zbog stimulacije 5-HT_{2B} receptora (145). Delaney i sur. pokazali su da se 5-HT_{2A} receptori izražavaju u fetalnim plućima ovce te da njihova inhibicija ketanserinom smanjuje vaskularni otpor i povećava plućni protok u modelu perzistentne plućne hipertenzije novorođenčadi (PPHN), uz popratno povećanje lokalne proizvodnje serotonina i ekspresije Tph1 i 5-HT_{2A} receptora (46).

Serotonin također sudjeluje u patofiziologiji alergijske astme, gdje aktivacija 5-HT_{2A} receptora doprinosi regrutaciji eozinofila, bronhijalnoj hiperreaktivnosti, upali i remodeliranju dišnih puteva (79–81). Njegova sposobnost regulacije sekrecije citokina preko 5-HT_{1A} receptora izraženih na monocitima, limfocitima i glatkim mišićnim stanicama dodatno naglašava njegov imunomodulatorni potencijal (102-104).

Epitelne stanice alveola tipa II (AEC-II), smještene na granici između alveolarnog prostora i intersticija, igraju ključnu ulogu u imunološkoj homeostazi pluća. One izražavaju ko-stimulacijske molekule potrebne za aktivaciju T-limfocita, te otpuštaju citokine poput IL-6 i kemokina CXCL8/IL-8 kao odgovor na upalne podražaje (146). Serotonin dodatno modulira njihovu funkciju, utječući na upalni mikrookoliš pluća. Poremećaji serotoninske signalizacije, poput

smanjene ekspresije SERT-a, povezani su s neonatalnim plućnim poremećajima poput alveolarne kapilarne displazije s nepravilnim položajem plućnih vena (73, 147).

Izražaj serotoninskih receptora u ljudskim plućima tijekom fetalnog razvoja istražen je u vrlo ograničenom broju studija. Hodge i suradnici ispitivali su izražaj 5-HT₄ receptora u uzorcima fetalnih pluća od 19. dana do 19 tjedana gestacije, otkrivši porast izražaja tijekom embrionalnog i pseudoglandularnog stadija te pad u kanalikularnom stadiju (148). Druga studija (Castro i sur.) pokazala je da se ekspresija SERT-a u ljudskim plućima pojavljuje u kasnom sakularnom stadiju te dostiže vrhunac neposredno prije ili tijekom poroda, što ukazuje na njegovu moguću ulogu u rastu i remodeliranju plućne vaskulature (147).

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja jest imunohistokemijskom analizom odrediti prostorni i vremenski izražaj serotoninskih receptora u plućima čovjeka tijekom fetalnog razvoja (od 12. do 40. tjedna gestacije). Analizirana su tri tipa serotoninskih receptora (5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT3A) kroz četiri razvojne faze pluća; pseudogladularnu, kanalikularnu, sakularnu i alveolarnu fazu.

Specifični ciljevi istraživanja:

1. Primjenom imunofluorescencije semikvantitativno odrediti razinu izražaja serotoninskih receptora 5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT3A unutar specifičnih histoloških struktura plućnog tkiva tijekom četiri faze fetalnog razvoja pluća kod čovjeka.
2. Kvantificirati izražaj navedenih receptora uporabom mjernih parametara, poput postotka površine prekrivene pozitivnim imunofluorescentnim signalom i integrirane gustoće fluorescencije za svaku pojedinu fazu razvoja.
3. Utvrditi postoje li razlike u prostornom i vremenskom obrascu izražaja serotoninskih receptora 5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT3A između pojedinih razvojnih faza fetalnih pluća.
4. Izolirati i kvantificirati transkripciju glasničke RNA za 5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT3A gene u plućima čovjeka tijekom fetalnog razvoja primjenom metode lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (real-time qPCR).

Hipoteza

Uzevši u obzir podatke o ranoj pojavi stanica koje produciraju serotonin u plućima tijekom embrionalnog razvoja, kao i literaturne podatke o ulozi serotonina u razvoju pluća, naša je hipoteza da se u plućima tijekom rasta i sazrijevanja pojavljuje izražaj različitih tipova serotoninskih receptora te da dinamika njihovog prostorno-vremenskog izražaja tijekom različitih faza fetalnog razvoja pluća kod čovjeka ukazuje na njihovu važnost u normalnom razvoju i sazrijevanju pluća.

3. MATERIJALI I METODE

U ovom odjeljku su opisani postupci prikupljanja, obrade i analize plućnog tkiva iz različitih faza fetalnog razvoja kod čovjeka. Navedeni su svi materijali te opisani protokoli za korištene histološke, imunohistokemijske i molekularne metode.

3.1. Biološki materijal

U ovoj studiji korišteni su uzorci plućnog tkiva čovjeka od ukupno 25 fetusa gestacijske dobi od 12 to 40 tjedana. Uzorci su podijeljeni u četiri grupe na temelju gestacijske dobi odnosno razvojne faze pluća u kojoj se nalaze (Tablica 2). Fetalni uzorci prikupljeni su nakon spontanih pobačaja, a dio su arhivske zbirke Odjela za patologiju, citologiju i forenzičku medicinu Sveučilišta u Mostaru. Prikupljeni uzorci su uklopljeni u parafinske blokove i analizirani pomoću standardnih histoloških tehnika i svjetlosne mikroskopije kako bi se iz istraživanja isključili macerirani uzorci tkiva. Gestacijska dob procijenjena je na temelju duljine fetalnog stopala prema Streeteru (1920).

Znanstveno istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije i odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Mostaru (šifra protokola 1519/24, 5.1.2024.)

Tablica 2. Analizirani humani uzorci plućnog tkiva (N = 25).

Grupa	Faza fetalnog razvoja pluća	Gestacijska dob/ Razvojni tjedan	Broj uzoraka
1	Pseudoglandularna	12 – 17	8
2	Kanalikularna	16 – 17	7
3	Sakularna	26 – 36	5
4	Alveolarna	36 – 40	5

3.2. Postupci

3.2.1. Priprema uzoraka za histološku analizu

Nakon prikupljanja uzorci tkiva su fiksirani u otopini 4% formaldehida u fosfatnom puferu (PBS, engl. *phosphate-buffered saline*) preko noći. Ovaj korak je nužan da bi se tkivu dala čvrstoća i spriječila autoliza stanica, stabilizirao odnos staničnih struktura te spriječio razvoj mikroorganizama. Zatim je uslijedila postupna dehidracija tkiva u uzlaznom gradijentu etanola kako bi se iz njega uklonila voda, što je preduvjet za uklapanje u parafin, koji je bezvodni medij. Potom je tkivo prosvjetljeno, pri čemu je korišten ksilen – otapalo koje se može miješati i s etanolom i s parafinom. Ksilen zamjenjuje alkohol u tkivu, a kasnije će biti zamijenjen parafinom. Nakon toga tkivo je uronjeno u parafin. Ovaj korak se odvija u na temperaturi od 60-65 °C kada je parafin u tekućem obliku te postupno zamjenjuje ksilen i prodire u tkivo. Tkivo uklopljeno u parafin je montirano na nosač parafinskog bloka kako bi se moglo rezati na mikrotomu. Uz pomoć mikrotoma, uzorci su izrezani na debljinu od 5 µm te zalijepljeni na predmetna stakalca. Svaki deseti rez obojan je hematoksilin-eozin metodom u svrhu provjere očuvanja tkiva. Osim ovog bojanja, urađena su i specifična bojanja za koje su postupci opisani u sljedećim poglavljima.

3.2.2. Imunohistokemija

Za imunohistokemijsko bojenje upotrebljavaju se otopine boja na bazi vode i zbog čega je iz preparata na predmetnom stakalcu nužno u potpunosti odstraniti parafin. Uzorci su najprije deparafinirani u ksilenu, a zatim rehidrirani u silaznom gradijentu etanola (100%, 96%, 70%) i destiliranoj vodi. Zatim su uzorci zagrijavani u parnoj kupelji u puferu natrijeva citrata (pH 6,0) tijekom 20 minuta kako bi se razotkrili epitopi antigena, a potom su hlađeni do sobne temperature. Nakon ispiranja uzoraka u PBS-u, uslijedila je inkubacija u blokirajućem puferu (ab64226, Abcam, Cambridge, UK) u trajanju 20 minuta, kako bi se spriječila nespecifična vezanja antitijela. Potom su uzorci inkubirani s primarnim antitijelima (**Tablica 3**) u vlažnoj komori tijekom noći. Sljedećeg dana, uzorci su isprani u PBS-u i zatim inkubirani sa sekundarnim antitijelima razrijeđenima u omjeru 1:300 (**Tablica 3**) tijekom jednog sata. Nakon inkubacije, uslijedilo je ispiranje PBS-om i bojenje s 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI, eng. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) u trajanju od

dvije minute, radi vizualizacije staničnih jezgri. Višak DAPI-ja uklanjonjen je ispiranjem u PBS-u i destiliranoj vodi, nakon čega su uzorci poklapaju pokrovnim stakalcima u mediju za montiranje (Immu-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD). Negativna kontrola provedena je izostavljanjem primarnog antitijela tijekom imunohistokemijskog bojenja.

Tablica 3. Primarna i sekundarna antitijela korištena u imunohistokemiji.

	Antitijelo	Kataloški broj	Domaćin	Razrijeđenje	Proizvođač
Primarna antitijela	Anti-5HT1A Receptor antibody	ab227165	kunić	1:150	Abcam (Cambridge, UK)
	Anti-SR-2A (A-4)	sc-166775	miš	1:150	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
	Anti-5HT3A receptor antibody	GTX54151	kunić	1:150	GeneTex (Irvine, CA, USA)
	Anti-CD31/PECAM-1 (H3)	sc-376764	miš	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
	Anti-CD31/PECAM-1	NB100-2284	kunić	1:100	Novus Biologicals, Inc. (Englewood, CO, USA)
Sekundarna antitijela	Anti-Mouse IgG, Alexa Fluor®488	715-545-150	magarac	1:300	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. (Baltimore, PA, USA)
	Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor®488	711-545-152	magarac	1:300	
	Anti-Rabbit IgG, Rhodamine Red™-X	711-295-152	magarac	1:200	

3.3. Prikupljanje i analiza podataka

Histološki obrađeni i obojeni uzorci fetalnih pluća pregledani su uz pomoć fluorescencijskog mikroskopa (Olympus BX51, Tokyo, Japan) opremljenog s Nikon DS-Ri2 digitalnom kamerom (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) i softverom NIS-Elements F. Snimanje je provedeno na objektivu povećanja od $\times 40$. Na svakom uzorku snimljeno je deset reprezentativnih mikrofotografija nepreklapajućih vidnih polja pri konstantnom vremenu ekspozicije, koje su potom obrađene u programima ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018) i Adobe Photoshop (San Jose, California, USA). U navedenim programima provedena je kvantitativna analiza izražaja serotoninских receptora 5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT3A za svaku pojedinu fazu razvoja. Za procjenu izražaja korišteni su mjerni parametri poput postotka površine prekrivene pozitivnim imunofluorescentnim signalom (*percentage area*) i integrirane gustoće fluorescencijskog signala (*integrated density*). Postotak površine (*percentage area*) označava udio analiziranog područja koji pokazuje pozitivnu imunoreaktivnost, izražen kao postotak ukupne površine tkiva u vidnom polju. Integrirana gustoća signala (*Integrated density*) definirana je kao umnožak površine pozitivno obojenog područja i srednje jakosti fluorescencije unutar tog područja, te je izražena u arbitrarnim jedinicama (AU – *arbitrary units*). Ova mjera uzima u obzir i intenzitet i opseg bojenja, što omogućuje precizniju kvantifikaciju izražaja receptora. Također je provedena semikvantitativna analiza imunohistokemijskog bojenja vizualnom ocjenom intenziteta izražaja serotoninских receptora (5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT3A) unutar različitih struktura pluća (epitel i SMC proksimalnih dišnih putova, mezenhim, kapilarni i arterijski endotel, SMC arterija, distalni dišni putevi, alveoli). Intenzitet bojenja za semikvantitativnu analizu određen je koristeći sljedeću skalu bojenja: nema bojenja (–), bojenje blagog intenziteta (+), bojenje srednjeg intenziteta (++) , bojenje jakog intenziteta (+++) i bojenje vrlo jakog intenziteta (++++) .

3.4. Izolacija RNA i qRT-PCR

RNA je izolirana iz ukupno 14 uzoraka humanih fetalnih pluća, raspoređenih u 4 razvojne faze: pseudoglandularnoj (n = 3), kanalikularnoj (n = 3), sakularnoj (n = 4) i alveolarnoj (n = 4). Uzorci su prethodno bili fiksirani u paraformaldehidu i uklopljeni u parafin (eng. *formalin-fixed*

paraffin-embedded, FFPE). Izolirana RNA korištena je za analizu ekspresije gena koji kodiraju receptore 5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT3A, primjenom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (real-time qPCR).

Izolacija RNA je provedena metodom ekstrakcije fenol-kloroformom po protokolu Kiran Kumar i sur. 2022 (149), nakon deparafinizacije uzoraka u ksilenu i razgradnje proteina djelovanjem proteinaze-K. Koncentracija i kvaliteta izolirane RNA određene su pomoću uređaja NanoDrop 2000 (Wilmington, SAD). Reverzna transkripcija ukupne RNA u komplementarnu DNA (cDNA) provedena je s 2 µg ukupne mRNA korištenjem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit kompleta reagenasa prema uputama proizvođača (kat. br. 4368814, Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD). Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (real-time qPCR) provedena je korištenjem prethodno objavljenih parova početnica (**Tablica 4**) (150, 151), pomoću Taq™ Universal SYBR® Green Supermixa (Kat. br. 1725121, BioRad, Hercules, CA, SAD) na BioRad CFX96 sustavu (C1000 Touch Thermal Cycle). Negativne kontrole (NTC) sadržavale su sve komponente mastermiksa, osim cDNA uzoraka. Za izračun relativne ekspresije korištena je metoda $2^{-\Delta\Delta C_t}$ prema Livaku i Schmittgenu (2001) (152), pri čemu je ekspresija svakog ciljnog gena normalizirana na referentni gen β -aktin i izražena u odnosu na kalibracijski uzorak (153).

Tablica 4. Početnice korištene u RT-qPCR metodi.

Gen	Lijeva početnica	Desna početnica
5-HT1A	CCT GCT TGG GTC TCT GCA TTC	GGA GCG CTC CAA GGG GAT GGC
5-HT2A	ACT CCA GAA CTA AGG CAT TT	AGC TAA TTT GGC CCG TGT GCC
5-HT3A	CAG AAG GTG TGA GCA GTG G	GTA CTG CCG GTA CCA GAT GTA G
β -aktin	CGT CTT CCC CTC CAT CGT G	GGT GAG GAT GCC TCT CTT GCT C

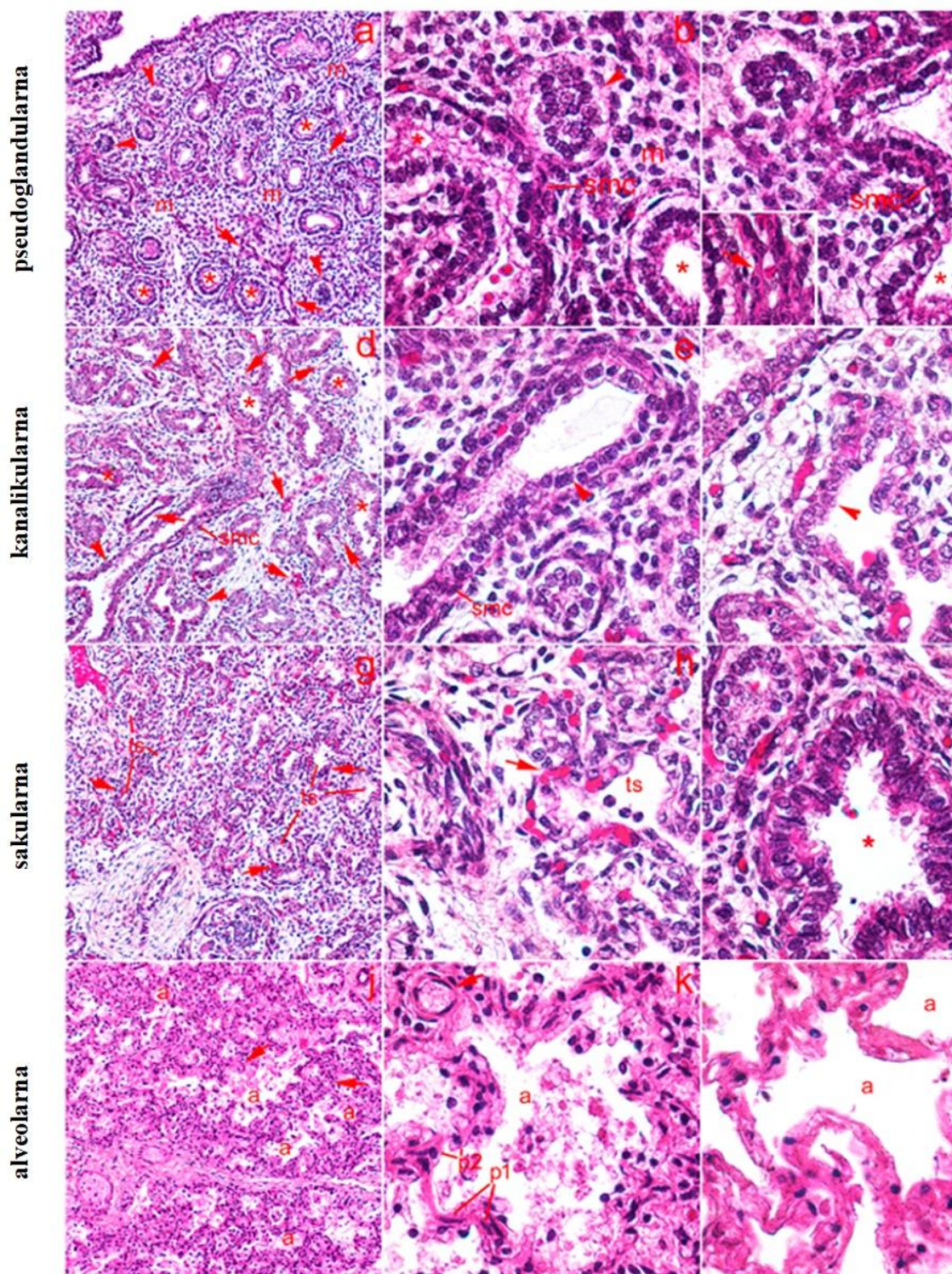
3.5. Statistička analiza

Za statističku analizu podataka dobivenih obradom mikrofotografija korišten je PAST 4.03 program (Øyvind Hammer, Natural History Museum, University of Oslo, Norway). *One way* ANOVA test (engl. *Analysis of variance*) uz Tukey post-hoc test korišten je za usporedbu izražaja promatranih proteina između različitih razvojnih faza pluća. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost uz standardnu devijaciju. Statistički značajnom je smatrana razlika pri $P < 0,05$, a interval pouzdanosti (CI) od 95%.

Izračun potrebne veličine uzorka proveden je korištenjem mrežnog programa koji se nalazi na mrežnoj stranici <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/>. Za izračun su korišteni preliminarni podaci iz pilot pokusa na dobiveni analizom fotografija preparata obojenih antitijelom protiv 5-HT2A za skupine pseudoglandularna i alveolarna, sa sljedećim parametrima; $\mu_1 = 3,85$, $\mu_2 = 0,05$, $\sigma = 1,44$, $\text{power} = 80\%$, $P = 0,05$, pri čemu je dobivena najmanja potrebna veličina uzorka od minimalno $n = 3$.

4. REZULTATI

Analizirana je jačina izražaja serotoninskih receptora 5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT3A u različitim strukturama fetalnih pluća kod čovjeka unutar četiri razvojne faze od 12. do 40. tjedna gestacije. Morfološke razlike između faza utvrđene su hematoksilin-eozin bojenjem (**Slika 10**). Histološki presjeci ispitivanih fetalnih pluća pokazali su tipične značajke za pojedine faze razvoja fetalnih pluća kod čovjeka. Tijekom pseudoglandularne faze, pluća su imala karakterističan izgled s malim lumenima proksimalnih dišnih puteva i obilnim mezenhimom s ponekim krvnim kapilarama. Lumeni nekih dišnih puteva još uvijek nisu bili otvoreni. U ovoj fazi, proksimalni dišni putevi bili su obloženi cilindričnim epitelom, dok su se razvijajući terminalni bronhioli odlikovali prijelazom iz cilindričnog u kubični epitel, a ispod epitela proksimalnih dišnih puteva nalazile su se glatke mišićne stanice. U kanalikularnoj fazi, lumeni proksimalnih dišnih puteva postali su veći, a vaskularizacija se povećala. Epitel koji oblaže distalne dišne putove bio je kubičan. Tijekom sakularne (terminalno-sakularne) faze, formirale su se primitivne alveole odnosno završne vrećice uz diferencijaciju pneumocita tipa I i II iz kubičnog epitela te je uslijedila infiltracija kapilara. Na kraju, u alveolarnoj fazi, razvile su se karakteristične alveole s tankim septalnim stijenkama i diferencijacijom pneumocita tipa I i II.



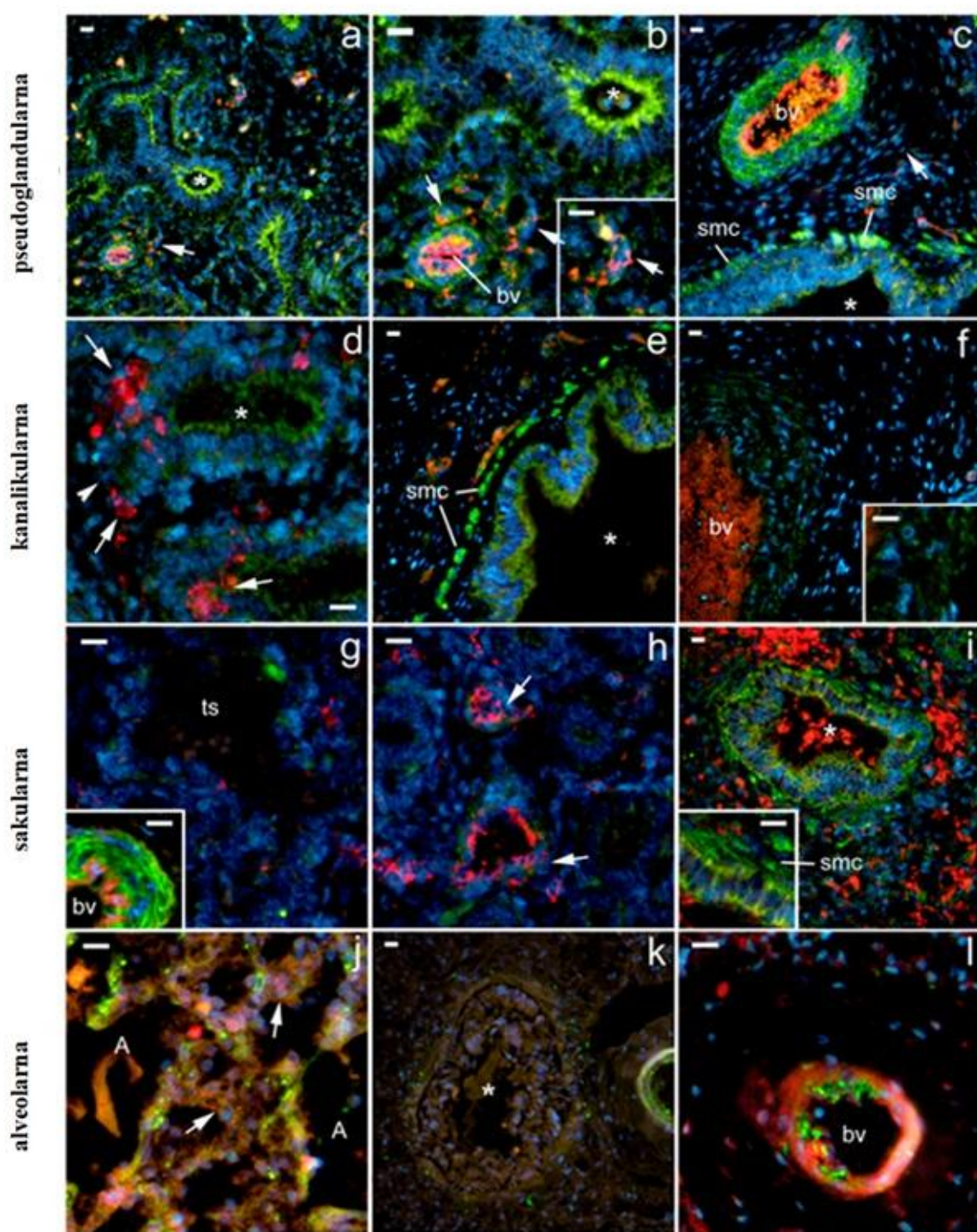
Slika 10. Fetalna pluća u različitim fazama razvoja. (a–c) **Pseudoglandularna faza.** (a) Povećanje 100× prikazuje tipičan izgled pluća u pseudoglandularnoj fazi s malim lumenima

proksimalnih dišnih puteva (zvjezdice) i obilnim mezenhimom (m) s ponekim krvnim kapilarama (strelice). Lumeni nekih proksimalnih dišnih puteva još nisu otvoreni (trokutići). (b, c) Detalji histološke strukture pluća u pseudoglandularnoj fazi (povećanje 400×): proksimalni dišni putevi s cilindričnim epitelom (zvjezdice); prijelaz iz proksimalnih u distalne dišne puteve (trokutići), prikazan na (c), gdje je jasno vidljiv prijelaz iz cilindričnog u kubični epitel; m – mezenhim; smc – glatke mišićne stanice vidljive ispod epitela proksimalnih dišnih puteva. Umetak u (c) prikazuje detalj kapilare (strelica) s crvenim krvnim stanicama. **(d–f)**

Kanalikularna faza. Veći lumeni proksimalnih dišnih puteva i povećana vaskularizacija. (d) Povećanje 100×; (e, f) povećanje 400×. (f) Epitel koji oblaže distalne dišne puteve je kubičan (trokutić). **(g–i) Sakularna faza (terminalni sakus).** Razvoj terminalnih sakusa (ts) uz diferencijaciju pneumocita tipa I i II iz kubičnog epitela te invaziju kapilara (strelice) jasno su vidljivi. (g) Povećanje 100×; (h, i) povećanje 400×. (h) Detalj terminalnog sakusa koji prikazuje diferencijaciju pneumocita tipa I i II iz kubičnog epitela. (i) Detalj proksimalnog dišnog puta s cilindričnim epitelom. **(j, k, l) Alveolarna faza.** Razvoj karakterističnih alveola (a), prikazan u (a), s tankim septalnim stijenkama i diferencijacijom pneumocita tipa I (p1) i II (p2). (j) Povećanje 100×; (k, l) povećanje 400×. (l) Detalji razvijenih alveola (a). Slike iz doktorskog istraživanja.

4.1. Izražaj 5-HT1A receptora u različitim strukturama pluća tijekom fetalnog razvoja kod čovjeka

Semikvantitativna analiza imunohistokemijskog bojenja provedena je vizualnom ocjenom intenziteta izražaja serotoninskih receptora (5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT3A) u različitim strukturama fetalnih pluća (epitel i SMC proksimalnih dišnih puteva, mezenhim, kapilarni i arterijski endotel, SMC arterija, distalni dišni putevi, alveoli). Tijekom pseudoglandularne faze razvoja, najjači izražaj 5-HT1A receptora zabilježen je u glatkim mišićnim stanicama proksimalnih dišnih puteva i u tunici mediji arterija (**Slika 11**). Osim toga, snažan izražaj ovog receptora primijećen je u epitelu proksimalnih dišnih puteva i u endotelu razvijajućih arterija, dok je izražaj u endotelnim stanicama kapilara bio nešto slabiji (Slika 11; Tablica 5). U području proksimalnih dišnih puteva snažan izražaj 5-HT1A receptora održao se tijekom kanalikularne i sakularne faze, ali je nestao iz bronhiola tijekom alveolarne faze (Slika 11; Tablica 5). Međutim, izražaj u glatkim mišićnim stanicama proksimalnih dišnih puteva bio je izražen tijekom pseudoglandularne, kanalikularne i sakularne faze te se održao na umjerenoj razini tijekom alveolarne faze razvoja. S druge strane, izražaj 5-HT1A receptora u stjenci krvnih žila bio je najjači u mišićnom sloju tijekom pseudoglandularne, sakularne i alveolarne faze, dok je tijekom kanalikularne faze došlo do njegovog slabljenja (Slika 11; Tablica 5). Izražaj u endotelu arterija bio je najizraženiji u pseudoglandularnoj i alveolarnoj fazi. U endotelu kapilara, izražaj 5-HT1A receptora smanjio se s umjerene razine u pseudoglandularnoj fazi na nisku razinu u svim kasnijim fazama razvoja. Umjeren do nizak izražaj također je zabilježen u razvojnim zračnim prostorima tijekom kanalikularne faze te u terminalnim vrećicama tijekom sakularne faze.

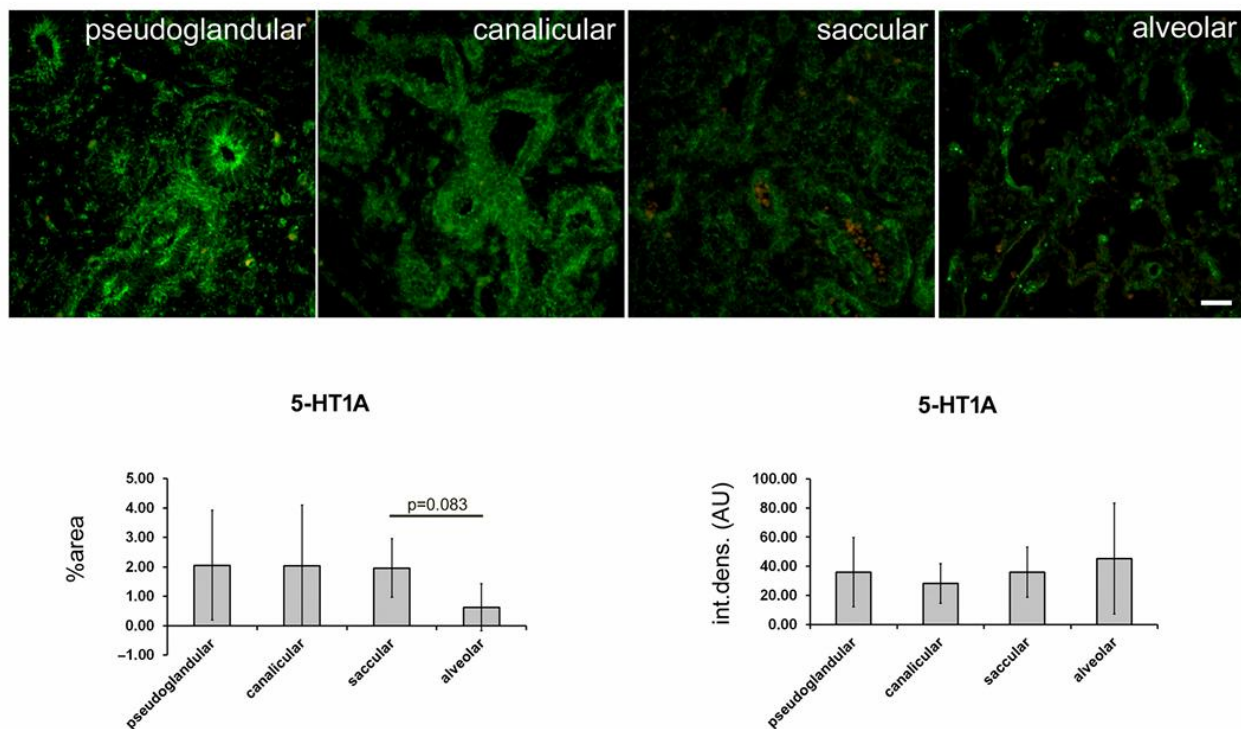


Slika 11. Imunofluorescencijsko bojenje fetalnih ljudskih pluća u različitim fazama razvoja: pseudoglandularna (a–c), kanalikularna (d–f), sakularna (g–i) i alveolarna (j–l), uz korištenje biljega za 5-HT1A receptore i endotel CD31/PECAM. Bojenje stanične jezgre (DNK) pomoću DAPI-ja prikazano je paralelno s imunofluorescencijom 5-HT1A i CD31/PECAM (preklopljeno).

Zeleni signal označava izražaj 5-HT_{1A} receptora. Crveni signal označava izražaj CD31/PECAM-1, dok su stanične jezgre označene plavim signalom koji potječe od kontrastnog bojenja DAPI-jem. Mikrofotografije su snimljene pri povećanju 400×; (a, c, e, f, i, k). Mjerna skala je 20 μm i odnosi se na sve slike. Zvezdice označavaju proksimalne dišne puteve/bronhiole. Strelice označavaju krvne kapilare. Vršci strelica označavaju distalne bronhiole, kubični epitel koji oblaže zračne prostore. bv – krvna žila (uglavnom arterija); smc – glatke mišićne stanice; ts – završne vrećice; A – alveole. Slike iz doktorskog istraživanja.

Kvantifikacija izražaja 5-HT1A receptora metodom mjerenja postotka površine presjeka s pozitivnim signalom (*percentage area*) pokazala je da izražaj receptora 5-HT1A pokazuje najvišu vrijednost u pseudoglandularnoj i kanalikularnoj fazi, dok se u sakularnoj fazi bilježi umjeren pad izražaja, a u alveolarnoj fazi izražaj je najniži. Iako se primjećuje trend smanjenja izražaja kroz razvojne faze, zbog izražene varijabilnosti unutar različitih morfoloških struktura fetalnih pluća, razlike nisu statistički značajne ($P = 0,083$) (Slika 12)

Izražaj 5-HT1A receptora (izražen kao integrirana gustoća, AU) ostaje relativno konstantan tijekom sve četiri faze fetalnog razvoja pluća (pseudoglandularna, kanalikularna, sakularna, alveolarna). Vrijednosti su blago varirale između faza, ali također bez statistički značajnih razlika (Slika 12)



Slika 12. Kvantifikacija izražaja 5-HT1A receptora u različitim fazama razvoja fetalnih pluća. Provedeno je imunofluorescentno bojenje pomoću protutijela protiv 5-HT1A receptora. Prikazane su reprezentativne slike za različite faze razvoja fetalnih pluća. Zeleni signal označava izražaj receptora 5-HT1A. Slike su snimljene pri povećanju 400×. Mjerna skala = 50 μm. Postotak površine presjeka s pozitivnim signalom (% područja) i integrirana gustoća (int. dens.; arbitrarne jedinice fluorescencije – AU) izmjereni su i prikazani na grafovima. Slike iz doktorskog istraživanja.

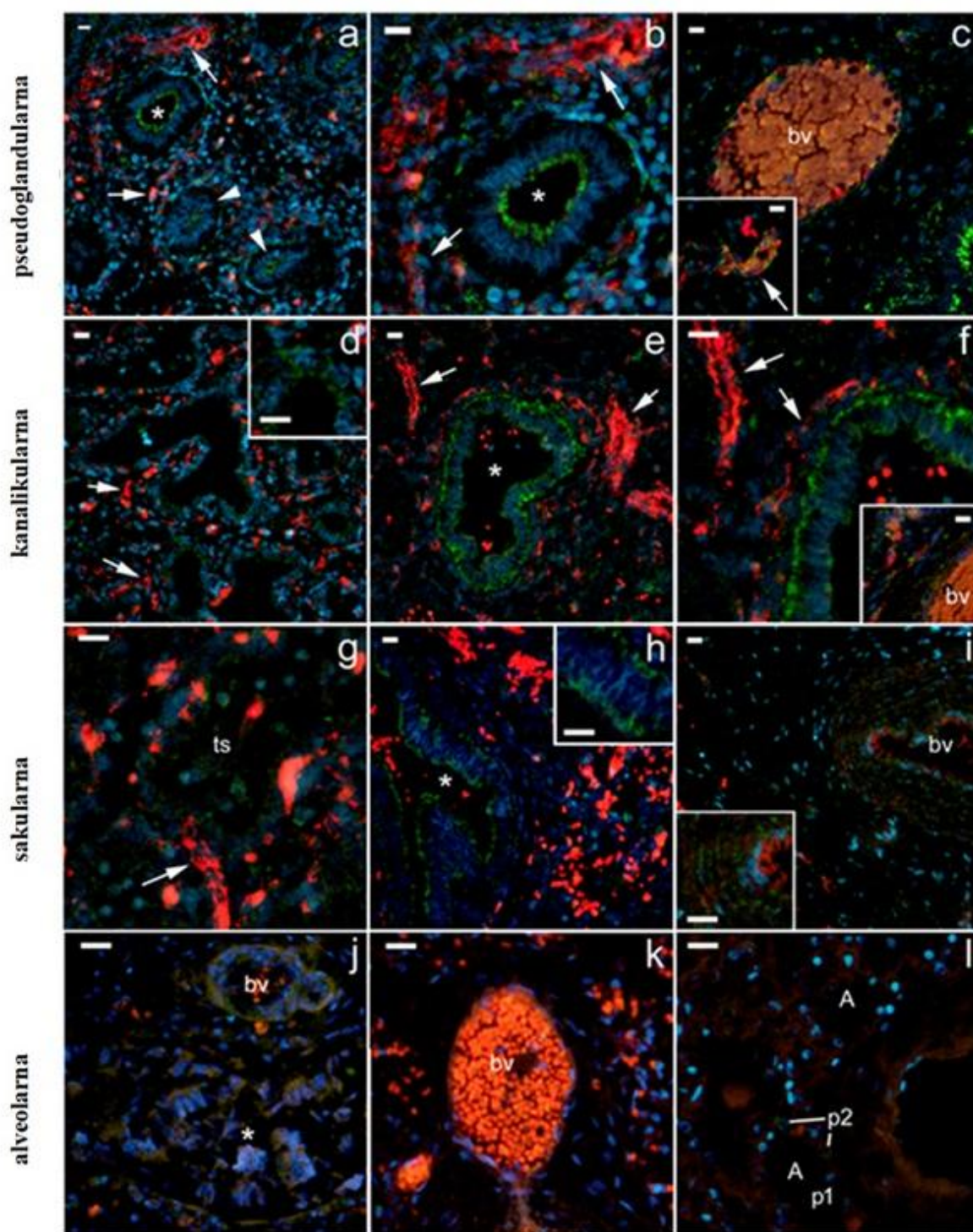
Tablica 5. Semikvantitativna procjena intenziteta imunohistokemijskog bojanja, kao mjere izražaja serotoninских receptora u različitim strukturama pluća tijekom fetalnog razvoja, provedena je primjenom sljedeće skale: nema bojanja (-), bojenje blagog intenziteta (+), bojenje srednjeg intenziteta (++), bojenje jakog intenziteta (+++) i bojenje vrlo jakog intenziteta (++++).

	Razvojna faza	Proksimalni dišni putevi/Bronhioli*-Epitel	Proksimalni dišni putevi/Bronhioli*-SMC	Mezenhim	Kapilarni endotel	Arterijski endotel	Arterije-SMC	Distalni dišni putevi**	Alveole***	
									P1	P2
5-HT1A	Pseudoglandularna	+++	++++	+	++	+++	++++	/	/	/
	Kanalikularna	++(+)	++++	-	+	-	+	++	/	/
	Sakularna	+++	+++(+)	-/+	(+)	+	++++	+	/	/
	Alveolarna	-	++(+)	/	+(+)	++++	+++	/	+(+)	+++
5-HT2A	Pseudoglandularna	++	++	+	++	++(+)	++(+)	/	/	/
	Kanalikularna	+++	+	+	+	+++	+++	+	/	/
	Sakularna	++	-/+	-/+	-/+	-/+	+(+)	+(+)	/	/
	Alveolarna	-/+	-	/	-	-	-	/	-	+
5-HT3A	Pseudoglandularna	+++(+)	-	+	+	++	++	/	/	/
	Kanalikularna	+++(+)	+	+	+	+	+	++	/	/
	Sakularna	+++(+)	+	-/+	-	-	-	+++	/	/
	Alveolarna	++	++	/	-/+	+(+)	++	/	-/+	++++

*Proksimalni dišni putevi u pseudoglandularnoj, kanalikularnoj i sakularnoj fazi; bronhioli u alveolarnoj fazi; SMC – glatke mišićne stanice; **Samo u pseudoglandularnoj, kanalikularnoj i sakularnoj fazi; *** Alveolarna faza; P1 - pneumociti tipa I; P2 – pneumociti tipa II.

4.2. Izražaj 5-HT_{2A} receptora u različitim strukturama pluća tijekom fetalnog razvoja kod čovjeka

Najjači izražaj 5-HT_{2A} receptora opažen je u kanalikularnoj fazi, osobito u epitelu proksimalnih dišnih puteva, endotelu arterija i stjenkama glatkih mišića (**Slika 13; Tablica 5**). U epitelu proksimalnih dišnih puteva izražaj je bio umjeren u pseudoglandularnoj i sakularnoj fazi, dok je tijekom alveolarne faze, s razvojem bronhiola, gotovo potpuno izostao. Umjeren izražaj 5-HT_{2A} receptora primijećen je i u glatkim mišićnim stanicama (SMC) proksimalnih dišnih puteva i endotelu kapilara tijekom pseudoglandularne faze, kao i u SMC arterijskih stijenki tijekom sakularne faze. Nizak do umjeren izražaj zabilježen je u distalnim dišnim putevima (u kanalikularnoj fazi) te u završnim vrećicama (u sakularnoj fazi). U alveolarnoj fazi izražaj je izostao u stjenkama krvnih žila i glatkim mišićnim stanicama bronhiola (**Slika 13; Tablica 5**).

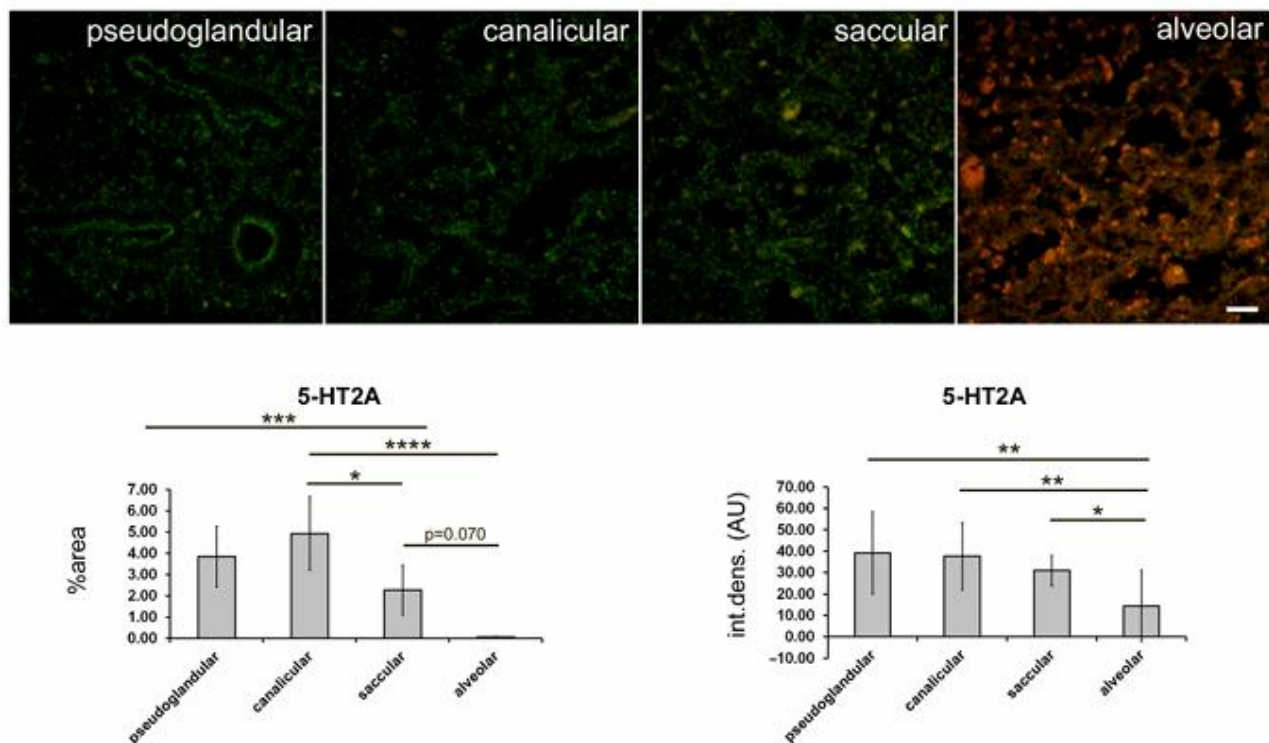


Slika 13. Imunofluorescencijsko bojenje fetalnih ljudskih pluća u različitim fazama razvoja: pseudoglandularna (a–c), kanalikularna (d–f), sakularna (g–i) i alveolarna (j–l) s protutjelima protiv 5-HT_{2A} receptora i CD31/PECAM. Bojenje staničnih jezgara pomoću fluorescentnom

bojom DAPI (plavo) prikazano je u kombinaciji s imunofluorescencijom 5-HT_{2A} receptora (zeleno) i CD31/PECAM (crveno) (prekolopljeno - merge). Slike su snimljene pri povećanju 400×; (a,c,d) (glavna slika), (e,h) (glavna slika) i (i) (glavna slika) – smanjene. Mjerna skala = 20 μm. Oznake: Zvezdica (*) – proksimalni dišni putevi/bronhioli; Strelice (→) – krvne kapilare; Trokutići (▸) – distalni dišni putevi, kubični epitel koji oblaže dišne prostore; bv – krvne žile (uglavnom arterije); smc – glatke mišićne stanice; ts – terminalni sakusi; A – alveole. Slike iz doktorskog istraživanja.

Kvantifikacija izražaja 5-HT2A receptora metodom mjerenja postotka površine s pozitivnim signalom (*percentage area*) pokazala je najviši izražaj u kanalikularnoj fazi, nakon čega slijedi pseudoglandularna, a zatim znatan pad u sakularnoj i gotovo potpuni izostanak izražaja u alveolarnoj fazi (**Slika 14**). Statistički značajne razlike u izražaju prisutne su između pseudoglandularne i sakularne faze ($P < 0,001$), kanalikularne i sakularne $P < 0,05$), te između ranijih faza i alveolarne ($*P < 0,0001$). Postoji i trend smanjenja izražaja između sakularne i alveolarne faze ($P = 0,070$), koji nije dosegao razinu statističke značajnosti.

Izražaj 5-HT2A receptora (izražen kao integrirana gustoća, AU) najveći je u pseudoglandularnoj i kanalikularnoj fazi, a zatim opada kroz sakularnu i osobito alveolarnu fazu. Statistički značajna razlika je zabilježena između: pseudoglandularne i alveolarne faze ($P < 0,01$), kanalikularne i alveolarne faze ($P < 0,01$), sakularne i alveolarne faze ($P < 0,05$) (**Slika 14**). Možemo zaključiti da se izražaj 5-HT2A receptora značajno smanjuje kako fetalna pluća sazrijevaju, s najnižom razinom u alveolarnoj fazi.

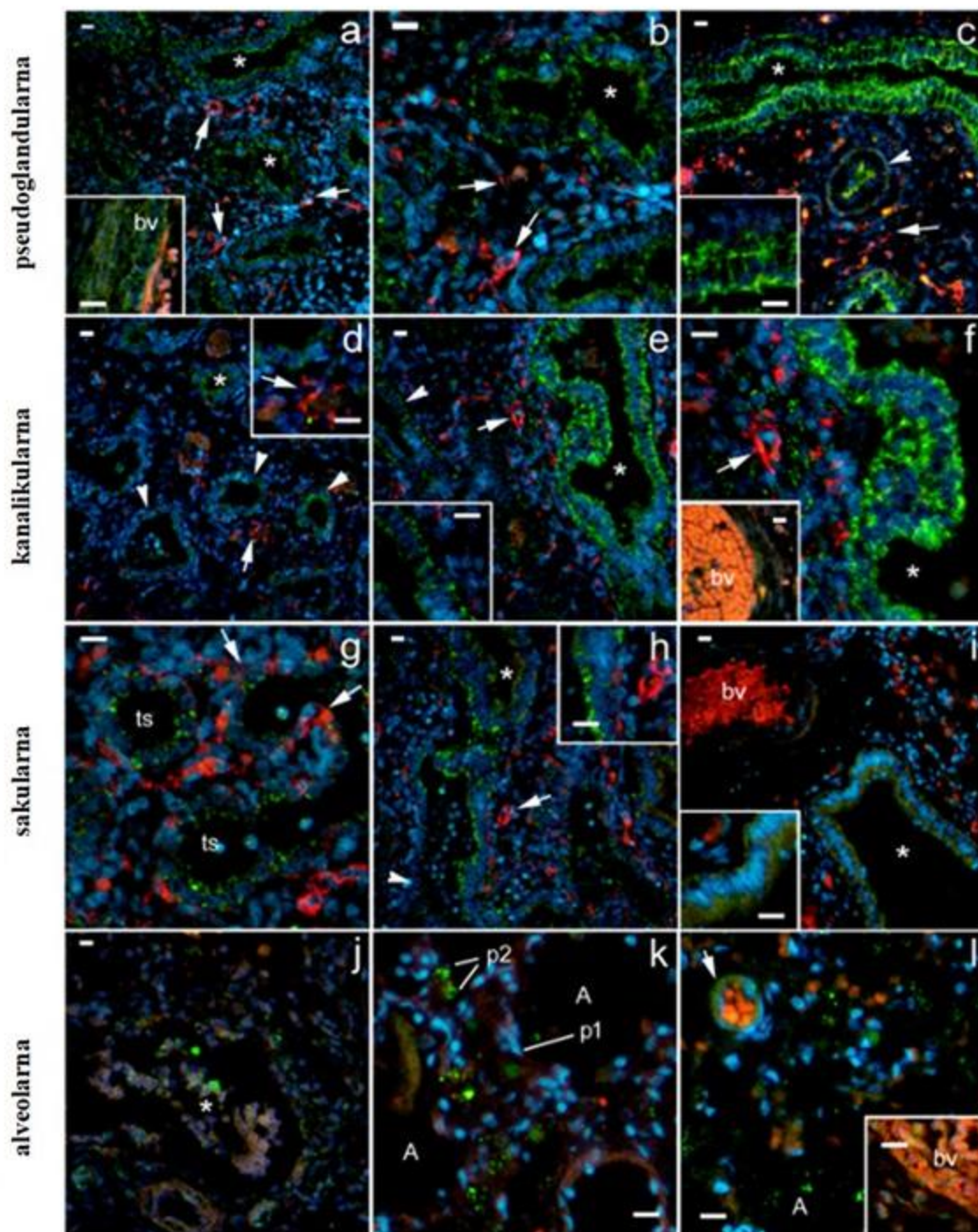


Slika 14. Kvantifikacija izražaja 5-HT2A receptora u različitim fazama razvoja fetalnih pluća: pseudoglandularna, kanalikularna, sakularna i alveolarna faza. Provedeno je imunofluorescencijsko bojenje s protutijelima protiv 5-HT2A receptora. Prikazane su

reprezentativne slike za različite faze razvoja pluća. Zeleni signal označava izražaj 5-HT2A receptora. Slike su snimljene pri povećanju 400×. Mjerna skala = 50 μm. Mjereni parametri su postotak površine prekriven pozitivnim signalom (% area) i integrirana gustoća signala (int. dens.; arbitrarne jedinice fluorescencije – AU). Podaci su prikazani na grafikonima. Statistička značajnost između naznačenih razvojnih faza (stupci): * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Slike iz doktorskog istraživanja.

4.3. Izražaj 5-HT3A receptora u različitim strukturama pluća tijekom fetalnog razvoja kod čovjeka

Najjači izražaj 5-HT3A receptora zabilježen je u epitelu proksimalnih dišnih puteva; bio je podjednako izražen tijekom pseudoglandularne, kanalikularne i sakularne faze. Međutim, za razliku od 5-HT1A i 5-HT2A, umjereni izražaj se održao i u bronhiolima tijekom alveolarne faze (**Slika 15; Tablica 5**). Umjeren izražaj 5-HT3A receptora također je opažen u arterijama (endotel i SMC) u pseudoglandularnoj i alveolarnoj fazi, kao i u SMC proksimalnih dišnih puteva tijekom alveolarne faze. Osim toga, umjeren izražaj je zabilježen u razvojnim distalnim dišnim putevima tijekom kanalikularne faze, dok je jaki izražaj uočen u završnim vrećicama koji se nastavio u alveolama tijekom alveolarne faze (**Slika 15; Tablica 5**).

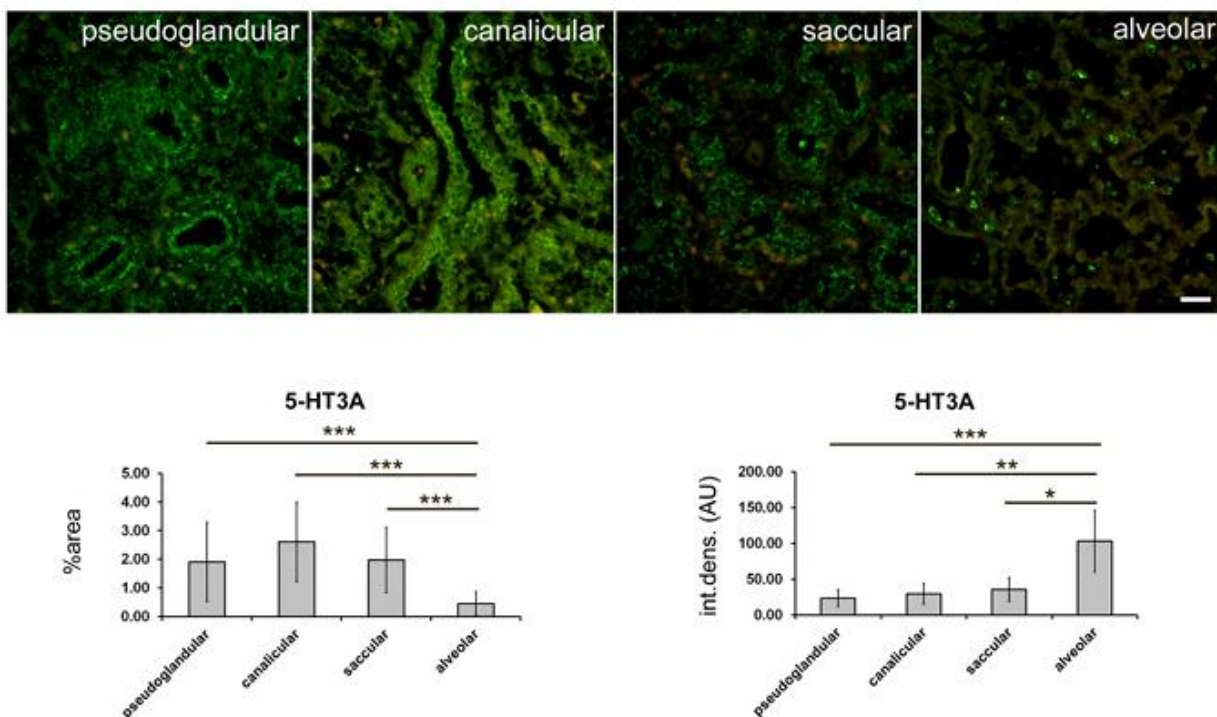


Slika 15. Imunofluorescijsko bojenje fetalnih ljudskih pluća u različitim razvojnim fazama: pseudoglandularnoj (a–c), kanalikularnoj (d–f), sakularnoj (g–i) i alveolarnoj (j–l), s markerima za 5-HT3A i CD31/PECAM (endotel). Bojenje stanične jezgre (DNK) pomoću DAPI-ja prikazano

je paralelno s imunofluorescencijom 5-HT3A i CD31/PECAM (preklopljeno). Zeleni signal označava izražaj receptora 5-HT3A, crveni signal označava izražaj CD31/PECAM-1, dok su stanične jezgre označene plavim signalom koji potječe od kontrastnog bojenja DAPI-jem. Slike su snimljene pri 400× povećanju; (a, c) (glavna slika), (d) (glavna slika), (e) (glavna slika), (h) (glavna slika), (i) (glavna slika) i (j) (umanjena slika). Mjerna skala je 20 µm i odnosi se na sve slike. Zvezdice označavaju proksimalne dišne puteve/bronhiolo. Strelice označavaju kapilare. Trokutići označavaju distalne dišne puteve, kubični epitel koji oblaže zračne prostore. bv – krvna žila (uglavnom arterija); smc – stanice glatkih mišića; ts – terminalni sakusi; p1 – pneumocit tipa I; p2 – pneumocit tipa II; A – alveola. Slike iz doktorskog istraživanja.

Kod 5-HT3A receptora statistički značajan pad postotka površine sa signalom uočen je u alveolarnoj fazi, gdje je vrijednost bila niža u odnosu na sve tri prethodne faze ($P < 0,0001$ za sve; **Slika 16**).

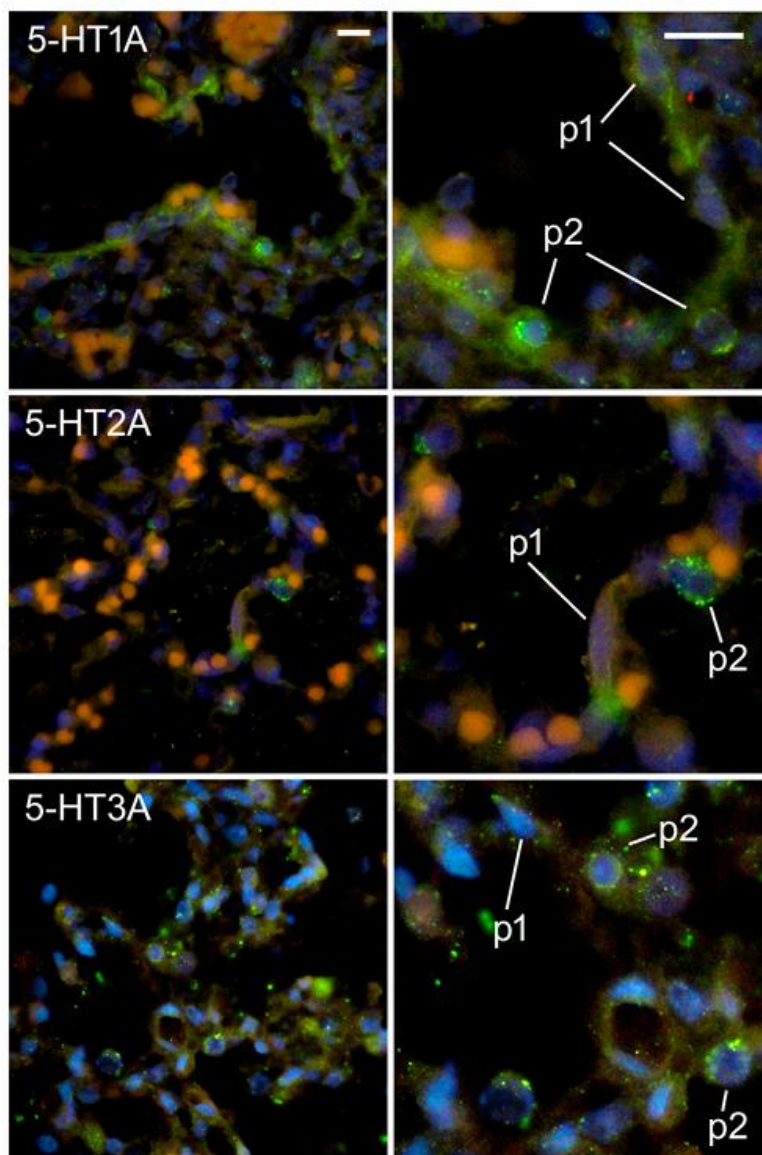
Međutim, integrirana gustoća signala (kao mjera intenziteta fluorescencije) bila je značajno viša u alveolarnoj fazi u usporedbi s pseudoglandularnom, kanalikularnom i sakularnom fazom ($P < 0,001$ do $P < 0,05$). Detaljna analiza otkrila je da je izražaj 5-HT3A, slično kao kod druga dva istraživana receptora, gotovo potpuno nestala u alveolarnoj fazi, ali se njena jaka ekspresija održala u pneumocitima alveolarne stijenke, osobito u pneumocitima tipa II, iako je prisutna i u pneumocitima tipa I (**Slika 16**).



Slika 16. Kvantifikacija izražaja 5-HT3A u različitim fazama fetalnog razvoja pluća. Provedeno je imunofluorescentno bojenje protutijelima protiv 5-HT3A. Prikazane su reprezentativne slike za različite faze razvoja pluća. Zeleni signal označava izražaj receptora 5-HT3A. Slike su snimljene pri 400× povećanju. Mjerna skala = 50 μ m. U grafikonima su prikazani postotak površine s pozitivnim signalom (% area) i integrirana gustoća (int. dens.; arbitrarne jedinice fluorescencije – AU). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ između označenih razvojnih stadija (stupci). Slike iz doktorskog istraživanja.

4.4. Izražaj serotonininskih receptora u pneumocitima tijekom alveolarne faze

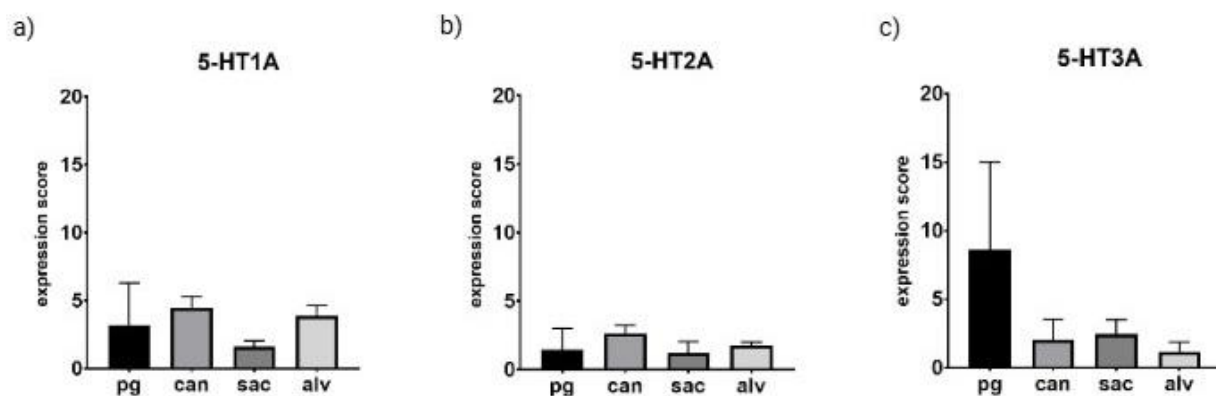
U alveolarnoj fazi razvoja primjećen je snažan izražaj 5-HT1A u oba tipa pneumocita (tip I i tip II), iako je bio znatno jači u pneumocitima tipa II (**Slika 17**). S druge strane, izražaj 5-HT2A bio je gotovo isključivo lokaliziran u pneumocitima tipa II, dok je u pneumocitima tipa I bio slab ili odsutan (**Slika 17**). Kao što je ranije navedeno, snažan izražaj 5-HT3A pronađen je u oba tipa pneumocita, ali znatno jači u pneumocitima tipa II (**Slika 17**).



Slika 17. Imunofluorescencijsko bojenje fetalnih ljudskih pluća u alveolarnoj razvojnoj fazi s antitijelima protiv 5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT3A i CD31/PECAM. Izražaj 5-HT1A receptora kombiniran je s DAPI bojenjem. Zeleni signal označava izražaj 5-HT receptora, dok su stanične jezgre označene plavim signalom koji potječe od kontrastnog bojenja DAPI-jem. Slike su snimljene pri povećanju 400× (lijevi stupac) i povećanju 1000× (desni stupac). Mjerna skala = 20 µm, vidi sve slike u istom stupcu. p1 – pneumociti tipa I; p2 – pneumociti tipa II. Slike iz doktorskog istraživanja.

4.5. Izražaj glasničke RNA serotonininskih receptora tijekom fetalnog razvoja pluća – real time qPCR analiza

Izražaj gena za 5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT3A receptore analiziran je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (real-time qPCR) na ukupno 14 uzoraka humanih fetalnih pluća raspoređenih u četiri razvojne faze: pseudoglandularnu (n = 3), kanalikularnu (n = 3), sakularnu (n = 4) i alveolarnu (n = 4). Dobiveni rezultati normalizirani su na referentni gen aktin i izraženi $\Delta\Delta CT$ metodom.



Slika 18. RT-qPCR analiza izražaja gena za (a) 5-HT1A, (b) 5-HT2A i (c) 5-HT3A receptore u različitim fazama fetalnog razvoja pluća: pg – pseudoglandularna, can – kanalikularna, sac – sakularna i alv – alveolarna. Slika iz doktorskog istraživanja.

Geni 5-HT1A i 5-HT2A pokazali su relativno slične razine izražaja (eng. expression score) kroz sve razvojne faze. Za gen 5-HT1A zabilježene su nešto više vrijednosti u kanalikularnoj fazi u

odnosu na ostale, no bez izražene razlike između faza (**Slika 18**). Izražaj 5-HT2A bio je najniži u sakularnoj fazi, dok su vrijednosti u pseudoglandularnoj, kanalikularnoj i alveolarnoj fazi bile usporedive (Slika 18).

Nasuprot tome, izražaj gena 5-HT3A pokazuje najizraženiju razliku među analiziranim receptorima. Najviša razina izražaja opažena je u pseudoglandularnoj fazi, s naglašenim padom u kasnijim fazama razvoja, pri čemu je najniža razina izražaja detektirana u alveolarnoj fazi (**Slika 18**).

5. RASPRAVA

Do danas je poznato da serotonin i njegovi receptori imaju važnu ulogu u razvoju pluća te da su povezani s nastankom različitih plućnih bolesti. Poremećaji serotoniniskog sustava, u kombinaciji s genetskim i/ili okolišnim čimbenicima, mogu dovesti do teških respiratornih poremećaja u različitim životnim razdobljima – od ranog postnatalnog razdoblja sa sindromom iznenadne dojenačke smrti (SIDS), preko neurorazvojnih poremećaja, pa sve do neurodegenerativnih bolesti u starijoj dobi (135). Istraživanje na mišjem modelu plućne fibroze izazvane bleomicinom pokazalo je povišene razine serotonina i povećan izražaj receptora 5-HT2A i 5-HT2B u fibroziranom plućnom tkivu, čime se potvrđuje njihova uloga u patogenezi plućne fibroze (140). Također, disfunkcija transportera serotonina (SERT) povezana je s razvojem plućne hipertenzije u bolesnika s kroničnom opstruktivnom plućnom bolešću (KOPB) (136). Budući da učinak serotonina snažno ovisi o tipu receptora koji se aktivira (99, 135), za razumijevanje povezanosti serotonina i respiratornih poremećaja korisno je poznavati profil izražaja serotoniniskih receptora.

Serotonin-imunoreaktivne stanice prisutne su u ljudskim plućima već od osmog tjedna gestacije, što upućuje na biološku ulogu serotonina u razvoju plućnog tkiva (46). Ipak, podaci o njegovoj funkciji u razvoju fetalnih pluća, kao i o izražaju i dinamici serotoniniskih receptora tijekom ontogeneze, još su uvijek ograničeni. Stoga je cilj ovog istraživanja bio analizirati prostorno-vremenski obrazac izražaja triju podtipova serotoniniskih receptora (5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT3A) u fetalnom razvoju pluća u kod čovjeka. Svaki od analiziranih receptora pokazuje karakterističan obrazac izražaja u specifičnim staničnim populacijama, što sugerira njihovu selektivnu uključenost u različite aspekte plućne ontogeneze – od vaskularnog razvoja i bronhalne muskulature do sazrijevanja alveolarnog epitela. Ovi rezultati nadopunjuju postojeća saznanja i pružaju dodatna potencijalna objašnjenja za ulogu serotoniniskog sustava u ranoj ljudskoj ontogenezi pluća.

Serotoniniski receptori sudjeluju u remodeliranju plućne vaskulature, a razvoj vaskularne mreže jedan je od ključnih procesa za buduću respiratornu funkciju (69). Struktura i funkcija plućne vaskulature tijekom fetalnog života značajno se mijenjaju. U ranom pseudoglandularnom i kanalikularnom stadiju razvoja, razvoj odgovarajuće vaskularne mreže nužan je za adekvatnu staničnu proliferaciju i prevenciju hipoksije. U kasnijim fazama, dobro razvijena kapilarna mreža omogućuje uspostavu krvno-zračne barijere, koja će postati funkcionalna nakon rođenja (154). Formiranje krvnih žila u dojenačkom razdoblju odvija se paralelno s povećanjem površine za

izmjenu plinova (154). Tijekom alveolarne faze dolazi do sazrijevanja kapilarne mreže te diferencijacije i sazrijevanja alveolarnog epitela, uz smanjenje proliferacije i apoptoze (155-157). Naši rezultati pokazali su snažan izražaj 5-HT1A receptora u endotelu razvijajućih krvnih žila i glatkim mišićnim stanicama arterijske tunike medije. Pretpostavljamo da bi mitogeni učinci 5-HT1A receptora, posredovani reaktivnim kisikovim vrstama (ROS) i signalnim putevima poput MAPK, Akt i Rho-kinaza (ROCK), mogli imati važnu ulogu u proliferaciji endotela tijekom razvoja vaskularne mreže (101). Umjeren izražaj receptora 5-HT1A i 5-HT2A opažen je u kapilarnom endotelu tijekom pseudoglandularne faze. Snažna ekspresija 5-HT1A receptora prisutna je u endotelu arterija tijekom pseudoglandularne i alveolarne faze, dok je izražaj 5-HT2A najizraženiji u pseudoglandularnoj i kanalikularnoj fazi. Najniži izražaj u endotelu zabilježen je za receptor 5-HT3A, s umjerenim izražajem u pseudoglandularnoj i niskim izražajem u ostalim fazama. Ovi rezultati upućuju na to da receptori 5-HT1A i 5-HT2A imaju dominantnu ulogu u modulaciji vaskularnog razvoja u fetalnom plućnom tkivu. Sličan obrazac izražaja utvrđen je i u glatkim mišićnim stanicama arterija, uz iznimku receptora 5-HT1A, čiji je izražaj bio snažan u svim fazama razvoja. Receptor 5-HT2A pokazivao je nešto slabiji izražaj u svim fazama osim u alveolarnoj. Niži izražaj 5-HT3A receptora u glatkim mišićnim stanicama odgovara njegovoj poznatoj lokalizaciji u presinaptičkim neuromuskularnim spojevima (99). Ukupno gledano, naši podaci podupiru hipotezu da serotonin ima važnu ulogu u formiranju krvnih žila i uspostavi krvno-zračne barijere tijekom razvoja pluća.

Lokalizacija istraženih serotoninских receptora unutar kapilarnog endotela i glatkog mišićja krvnih žila potvrđuje ulogu serotoninских receptora u modulaciji vazomotiliteta (69). Serotonin djeluje na glatko mišićje krvnih žila putem 5-HT1 i 5-HT2 receptora, pri čemu aktivacija 5-HT2 receptora, osobito podtipa 5-HT2A, uzrokuje vazokonstrikciju, dok aktivacija 5-HT1 receptora dovodi do vazodilatacije (40, 100). Osim toga, u kapilarnom endotelu serotonin može posredno potaknuti vazodilataciju stimulirajući sintezu dušikovog oksida (NO) (137). Kroz aktivaciju različitih 5-HT receptora serotonin može imati i pro- ili antiupalne učinke. Receptor 5-HT1A posjeduje imunomodulatorna svojstva poticanjem sekrecije citokina iz glatkih mišićnih stanica (102-104). S druge strane, aktivacija 5-HT2A receptora u glatkim mišićnim stanicama aorte ima izražen inhibitorni učinak na TNF- α -posredovani upalni odgovor (55).

Jedna od ključnih funkcija serotonina u plućima je i regulacija respiratornog ritma te poticanje plućne vazokonstrikcije (36, 135). Te učinke ostvaruje također putem aktivacije 5-HT2A

i 5-HT_{1A} receptora smještenih na glatkim mišićnim stanicama dišnih putova – aktivacija 5-HT_{2A} uzrokuje bronhokonstrikciju, dok 5-HT_{1A} posreduje bronhodilataciju (99, 158). Naši rezultati su pokazali vrlo snažan izražaj 5-HT_{1A} receptora u respiratornim glatkim mišićnim stanicama tijekom svih razvojnih faza. Pojačani izražaj ovih receptora u ranijim fazama razvoja pluća može biti povezan s fetalnim respiratornim pokretima koji započinju već desetog dana nakon začeca i smatraju se ključnima za mehaničku stimulaciju potrebnu za razvoj pluća, osobito u pseudoglandularnoj fazi (5, 26).

Tijekom pseudoglandularne faze dolazi do formiranja prvih 20 generacija budućih donjih dišnih puteva te započinje razvoj acinarnih dišnih puteva (5, 159, 160). U kanalikularnoj fazi formiraju se najdistalniji dišni putovi i završava morfogeneza grananja, što je popraćeno smanjenjem okolnog mezenhima. Tijekom ove faze također započinje proizvodnja surfaktanta u alveolarnim stanicama tipa II. U sakularnoj fazi značajno se povećava površina epitela za izmjenu plinova, dolazi do formiranja terminalnih sakula (završnih vrećica) te do daljnje diferencijacije alveolarnih stanica tipa I i II uz sazrijevanje njihove sposobnosti proizvodnje surfaktanta (5, 161, 162). Tijekom kanalikularne i sakularne faze zabilježeni su vrhunci apoptoze i proliferacije u mezenhimskim i epitelnim stanicama, pri čemu je apoptoza mezenhimskih stanica izraženija u kanalikularnoj fazi (157). Alveolarna faza obilježena je širenjem distalnih zračnih prostora, ponovljenom septacijom zračnih prostora te formiranjem alveola (163). U toj fazi dolazi do diferencijacije i sazrijevanja alveolarnog epitela (154) te smanjenja proliferacije i apoptoze (156, 157, 164).

U našem istraživanju zabilježen je vrlo snažan izražaj svih analiziranih serotoninskih receptora u epitelu proksimalnih dišnih putova tijekom pseudoglandularne, kanalikularne i sakularne faze razvoja. Izražaj 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} receptora u bronhijalnom epitelu gotovo potpuno nestao tijekom alveolarne faze. Najjači izražaj 5-HT_{3A} opažen je u epitelu proksimalnih dišnih putova, a njegova je razina ostala stabilno visoka u sve tri ranije razvojne faze. Umjeren izražaj 5-HT_{3A} receptora zabilježen je i u bronhiolama tijekom alveolarne faze. Budući da je poznato da 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} receptori sudjeluju u regulaciji stanične proliferacije i migracije (79), ovi nalazi upućuju na njihovu važnu ulogu u ranom razvoju plućnog epitela.

Rezultati našeg istraživanja također su pokazali snažan izražaj svih triju proučavanih serotoninskih receptora u pneumocitima tijekom alveolarne faze. Alveolarnu površinu pluća oblažu dvije glavne vrste epitelnih stanica: pneumociti tipa I, koji omogućuju razmjenu plinova i

djeluju kao fizička barijera, te pneumociti tipa II, koji proizvode surfaktant i djeluju kao progenitorske stanice, sposobne za zamjenu oštećenih stanica tipa I (146). Pneumociti tipa I nastaju terminalnom diferencijacijom pneumocita tipa II (165). Pneumociti tipa II također imaju važnu ulogu u imunološkoj obrani, jer se nalaze na granici između alveolarnog prostora i intersticija, gdje putem produkcije citokina i kemokina (npr. IL-6 i CXCL8/IL-8) mogu modulirati imunološki odgovor (166, 167). U našem istraživanju pokazano je da oba tipa pneumocita tijekom alveolarne faze izražavaju receptore 5-HT1A i 5-HT3A, s izraženijom prisutnošću u pneumocitima tipa II. Receptor 5-HT2A bio je gotovo isključivo izražen u pneumocitima tipa II, dok je u tipu I bio slabo izražen.

Kvantitativna analiza površine tkiva pokrivene signalom za pojedine receptore pokazala je da se izražaj 5-HT2A i 5-HT3A značajno smanjuje u alveolarnoj fazi u usporedbi s ranijim fazama. Za 5-HT1A receptor također je zabilježena tendencija smanjenja ukupne površine i intenziteta fluorescencije, no razlike nisu bile statistički značajne. Dok je intenzitet fluorescencije za 5-HT2A receptore opadao, intenzitet fluorescencije za 5-HT3A receptore u alveolarnoj fazi značajno se povećao. Ovi rezultati sugeriraju da se tijekom napredovanja razvoja pluća broj stanica koje izražavaju serotoninske receptore postupno smanjuje, no njihova ekspresija ostaje izražena u pneumocitima, osobito tipu II. Povećani izražaj 5-HT3A receptora u tim stanicama tijekom alveolarne faze može ukazivati na njegovu moguću ulogu u kasnijim fazama sazrijevanja pluća. Budući da je 5-HT3A jedini serotoninski receptor koji djeluje kao ionski kanal, te je poznat po svojoj ulozi u imunomodulaciji i neuro-imunološkom nadzoru, njegova prisutnost u pneumocitima tipa II može sugerirati njegovu ulogu u upalnim odgovorima i u regulaciji sekrecije surfaktanta. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se rasvijetlila specifična funkcija serotoninskih receptora u epitelu alveola, osobito u kontekstu produkcije surfaktanta i imunološke funkcije.

Rezultati qPCR analize pokazali su da se ekspresija gena za 5-HT1A i 5-HT2A receptore tijekom fetalnog razvoja pluća održava na sličnim razinama u svim ispitivanim fazama, uz manje varijacije koje nisu ukazivale na jasne razvojne obrasce. Suprotno tome, ekspresija gena za 5-HT3A receptor pokazala je izražene promjene između faza razvoja. Najviša razina zabilježena je u pseudoglandularnoj fazi, nakon čega je slijedio postupni pad prema kasnijim fazama, s najnižim vrijednostima u alveolarnoj fazi. Ovakav nalaz sugerira da bi 5-HT3A receptor mogao imati posebno važnu ulogu u ranim fazama razvoja plućnog tkiva, dok se uloga 5-HT1A i 5-HT2A receptora čini stabilnijom i manje ovisnom o razvojnoj fazi.

Glavno ograničenje našeg istraživanja bio je relativno malen broj uzoraka (veličina uzorka) i njegova retrospektivna priroda. Međutim, istraživanja fetalnog ljudskog tkiva rijetka su zbog ekskluzivne prirode materijala i njegove često slabe očuvanosti. Iz tih razloga, broj uzoraka u ovom istraživanju bio je usporediv ili veći s brojem uzoraka u sličnim studijama (147, 148). Stoga vjerujemo da rezultati ovog istraživanja mogu pridonijeti našem znanju o sustavu serotoninских receptora u razvoju ljudskih pluća. Ipak, za razjašnjavanje točnih mehanizama djelovanja serotonina tijekom plućne ontogeneze, potrebna su prospektivna eksperimentalna istraživanja koja bi uključivala veći broj uzoraka i *knock-out* mišje modele sa specifičnim delecijama određenih receptora u različitim staničnim populacijama. Razumijevanje tih mehanizama moglo bi otvoriti mogućnosti za razvoj novih terapijskih pristupa u slučajevima poremećaja plućnog razvoja, poput bronhopulmonalne displazije ili perzistentne plućne hipertenzije novorođenčadi. Stoga ovi podaci ne samo da doprinose boljem razumijevanju osnovne biologije pluća, već imaju i potencijalne translacijske implikacije u neonatalnoj medicini.

6. ZAKLJUČCI

1. Receptor 5-HT_{1A} pokazuje najviši izražaj u glatkim mišićnim stanicama dišnih puteva, prisutan kroz sve faze razvoja, što je u skladu s njegovom bronhodilatatornom ulogom te mogućom funkcijom u regulaciji bronhalnog tonusa i poticanju ranih respiratornih pokreta fetusa.
2. Isti obrazac izražaja 5-HT_{1A} receptora je prisutan kroz sve razvojne faze u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila, kao i u endotelu razvijajućih krvnih žila, što upućuje na njegovu moguću biološku ulogu u imunoregulaciji, održavanju vaskularnog tonusa i poticanju angiogeneze.
3. Receptor 5-HT_{2A} također pokazuje snažan izražaj u glatkim mišićnim stanicama dišnih puteva i endotelu arterija tijekom ranijih faza fetalnog razvoja, osobito u pseudoglandularnoj i kanalikularnoj fazi. Takva lokalizacija sugerira njegovu moguću ulogu u regulaciji bronho- i vazokonstrikcije, sudjelovanju u protuupalnim odgovorima te potencijalno u proliferaciji glatkih mišićnih stanica tijekom ranih stadija plućne ontogeneze.
4. U epitelu proksimalnih dišnih putova zabilježen je vrlo snažan izražaj svih serotoninskih receptora, osobito 5-HT_{3A} receptora, čija je prisutnost detektirana kroz sve faze razvoja. Nasuprot tome, izražaj receptora 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} značajno se smanjuje te gotovo potpuno nestaje u alveolarnoj fazi. Snažan izražaj serotoninskih receptora u ranim fazama razvoja pluća mogao bi odražavati njihovu mitogenu ulogu u grananju i širenju dišnih putova.
5. 5-HT_{3A} je najslabije izražen u vaskularnim komponentama, što odgovara njegovoj poznatoj lokalizaciji u presinaptičkim završecima.
6. Tijekom alveolarne faze zabilježen je snažan izražaj svih triju serotoninskih receptora u pneumocitima, pri čemu su 5-HT_{1A} i 5-HT_{3A} receptori bili izraženiji u pneumocitima tipa II. Izražaj 5-HT_{2A} receptora bio je također dominantan u pneumocitima tipa II, dok je u tipu I bio slabije izražen. Ovi nalazi ukazuju na moguću ulogu serotonina i njegovih receptora u funkciji alveolarnih epitelnih stanica, osobito u produkciji i sekreciji surfaktanta.
7. Opći zaključak o distribuciji istraženih serotoninskih receptora unutar različitih staničnih struktura jest da je u ranijim fazama izražaj proširen i obuhvaća više staničnih populacija

(endotel, epitel, glatke mišićne stanice), dok se u alveolarnoj fazi izražaj koncentrira u pneumocitima, osobito tipu II.

8. Kvantitativna analiza površine tkiva pokrivene signalom za pojedine receptore pokazala je da se izražaj 5-HT2A i 5-HT3A značajno smanjuje u alveolarnoj fazi u usporedbi s ranijim fazama. Za 5-HT1A receptor također je zabilježena tendencija smanjenja ukupne površine, no razlike nisu bile statistički značajne.
9. Intenzitet fluorescencije za 5-HT3A receptore u alveolarnoj fazi značajno se povećao. Ovi rezultati sugeriraju da se tijekom napredovanja razvoja pluća broj stanica koje izražavaju serotonininske receptore postupno smanjuje, no njihova ekspresija ostaje izražena u pneumocitima, osobito tipu II.
10. RT-qPCR analiza pokazala je stabilnu ekspresiju gena za 5-HT1A i 5-HT2A receptore kroz sve razvojne faze, dok je gen za 5-HT3A receptor imao najvišu razinu u pseudoglandularnoj fazi, uz postupni pad prema alveolarnoj fazi, što upućuje na njegovu moguću specifičnu ulogu u ranom razvoju pluća.

7. SAŽETAK

Naslov: Izražaj serotoninskih receptora u plućima čovjeka tijekom fetalnog razvoja

Ciljevi: Uzevši u obzir podatke o ranoj pojavnosti stanica koje proizvode serotonin u plućima tijekom embrionalnog razvoja, kao i postojeća saznanja o ulozi serotonina u razvoju pluća, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi prostorni i vremenski izražaj serotoninskih receptora u plućima čovjeka tijekom fetalnog razvoja (od 12. do 40. tjedna gestacije). Analizirana su tri tipa serotoninskih receptora (5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT3A) kroz četiri razvojne faze pluća; pseudogladularnu, kanalikularnu, sakularnu i alveolarnu fazu.

Materijali i metode: U ovoj studiji korišteni su uzorci plućnog tkiva čovjeka od ukupno 25 fetusa gestacijske dobi od 12 to 40 tjedana. Uzorci su histološki i imunohistokemijski obrađeni, uslikani fluorescencijskim mikroskopom te je provedena kvantitativna analiza izražaja 5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT3A receptora za svaku pojedinu fazu razvoja. Izražaj navedenih serotoninskih receptora na mikrofotografijama kvantificiran je uporabom mjernih parametara poput postotka površine prekrivene pozitivnim imunofluorescentnim signalom i integrirane gustoće fluorescencije. Za statističku analizu podataka dobivenih obradom mikrofotografija korišten je PAST 4.03 program. *One way ANOVA* test (engl. *Analysis of variance*) uz Tukey post-hoc test korišten je za usporedbu izražaja promatranih proteina između različitih razvojnih faza pluća. Statistički značajnom je smatrana razlika pri $P < 0,05$, a interval pouzdanosti (CI) od 95%. Također je provedena semikvantitativna analiza izražaja unutar specifičnih histoloških struktura pluća tijekom navedenih razvojnih faza. Izolirana je i kvantificirana transkripcija glasničke RNA (mRNA) za 5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT3A gene u plućima čovjeka tijekom fetalnog razvoja metodom qRT-PCR.

Rezultati: Najjači izražaj svih triju tipova receptora zabilježen je u epitelu proksimalnih dišnih putova za vrijeme pseudoglandularne, kanalikularne i sakularne faze, osobito 5-HT3A receptora, čija je prisutnost detektirana kroz sve faze razvoja. 5-HT1A receptor pokazao je snažan izražaj u glatkim mišićnim stanicama proksimalnih dišnih putova. Glatke mišićne stanice krvnih žila i endotel povremeno su pokazivali snažan izražaj 5-HT1A i 5-HT2A receptora. U alveolarnoj fazi, izražaj sva tri receptora detektiran je u pneumocitima tipa I (p1) i tipa II (p2) s izraženijom ekspresijom u pneumocitima tipa II. Uočeno je značajno smanjenje postotka površine i integrirane gustoće za 5-HT2A receptor u alveolarnoj fazi. S druge strane, kod 5-HT3A receptora zabilježeno je smanjenje postotka površine, ali povećanje integrirane gustoće u alveolarnoj fazi, što sugerira

da manji broj stanica izražava ovaj receptor, no da su te stanice (p1 i p2) značajno pojačale njegov izražaj u alveolarnoj fazi. RT-qPCR analiza pokazala je stabilnu ekspresiju gena za 5-HT1A i 5-HT2A receptore kroz sve razvojne faze, dok je gen za 5-HT3A receptor imao najvišu razinu u pseudoglandularnoj fazi, uz postupni pad prema alveolarnoj fazi.

Zaključci: U fetalnim plućima tijekom rasta i sazrijevanja pojavljuje se izražaj različitih tipova serotoninских receptora. Naši rezultati pokazali su da svaki od analiziranih receptora pokazuje karakterističan obrazac izražaja u specifičnim staničnim populacijama uključujući epitel dišnih putova, glatke mišićne stanice i pneumocyte, što sugerira njihovu selektivnu uključenost u različite aspekte plućne ontogeneze – od vaskularnog razvoja i bronhalne muskulature do sazrijevanja alveolarnog epitela. Osim na njihovu važnost u normalnom razvoju i sazrijevanju pluća, dinamika njihovog prostorno-vremenskog izražaja, također može ukazivati na njihovu ulogu u patogenezi plućnih bolesti, osobito onih karakterističnih za neonatalno razdoblje.

8. LAIČKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

Pluća čovjeka počinju se razvijati u ranom periodu trudnoće, a za njihov pravilan rast i sazrijevanje važni su brojni signalni mehanizmi u organizmu. Serotonin, kao jedna od najstarijih signalnih molekula ima važnu ulogu u tom procesu, a svoje učinke ostvaruje putem serotoninских receptora koji se nalaze na površini stanica.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati kada i gdje se u plućima čovjeka tijekom fetalnog razvoja pojavljuju serotoninски receptori. Analizirana su tri tipa serotoninских receptora (5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT3A) u uzorcima plućnog tkiva fetusa u razdoblju od 12. do 40. tjedna trudnoće, odnosno kroz različite faze razvoja pluća.

U istraživanju su korištene histološke, imunohistokemijske i molekularne metode kako bi se utvrdila prisutnost i količina navedenih receptora u različitim dijelovima pluća. Rezultati su pokazali da su sva tri receptora prisutna tijekom razvoja pluća, ali da se njihov izražaj mijenja ovisno o razvojnoj fazi i tipu stanica. Uočeno je da pojedini receptori pokazuju različite obrasce izražaja u krvnim žilama, glatkim mišićnim stanicama i alveolarnim stanicama, što sugerira da sudjeluju u različitim procesima razvoja plućnog tkiva.

Rezultati ovog istraživanja doprinose boljem razumijevanju razvoja ljudskih pluća prije rođenja te ukazuju na moguću važnost serotoninских receptora u nastanku određenih plućnih bolesti novorođenčadi. Dobiveni podaci mogu biti korisni za buduća istraživanja normalnog razvoja pluća, ali i mehanizama nastanka bolesti povezanih s poremećenim sazrijevanjem plućnog tkiva.

9. SUMMARY

Title: EXPRESSION PATTERNS OF SEROTONIN RECEPTORS DURING HUMAN FETAL LUNG DEVELOPMENT.

Objectives: Considering previous findings on the early appearance of serotonin-producing cells in the lungs during embryonic development, as well as the known role of serotonin in lung development, this study aimed to determine the spatial and temporal expression of serotonin receptors in the human lung during fetal development (from the 12th to the 40th week of gestation). Three types of serotonin receptors (5-HT1A, 5-HT2A, and 5-HT3A) were analyzed throughout four developmental stages of the lung: the pseudoglandular, canalicular, saccular, and alveolar stages.

Materials and methods: This study included human lung tissue samples obtained from 25 fetuses ranging from 12 to 40 weeks of gestational age. Tissue samples were processed histologically and immunohistochemically, imaged using a fluorescence microscope, and subjected to quantitative analysis of 5-HT1A, 5-HT2A, and 5-HT3A receptor expression during each developmental stage. The expression of these serotonin receptors in microphotographs was quantified using parameters such as the percentage of area covered by positive immunofluorescent signal and integrated fluorescence density. Statistical analysis of the data obtained from microphotograph processing was performed using PAST 4.03 software. *One way* ANOVA test (eng. *Analysis of variance*), followed by Tukey's post-hoc test, was used to compare protein expression among different developmental stages of the lung. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$, with a 95% confidence interval (CI). A semiquantitative analysis of receptor expression within specific histological lung structures during the examined developmental stages was also performed. In addition, messenger RNA (mRNA) transcription levels of the 5-HT1A, 5-HT2A, and 5-HT3A genes in the developing human lung were isolated and quantified using the qRT-PCR method.

Results: The strongest expression of all three receptor types was observed in the epithelium of the proximal airways during the pseudoglandular, canalicular, and saccular stages, particularly for the 5-HT3A receptor, whose presence was detected throughout all stages of development. The 5-HT1A receptor showed strong expression in the smooth muscle cells of the proximal airways. Vascular smooth muscle cells and endothelial cells occasionally demonstrated strong expression of 5-HT1A and 5-HT2A receptors. During the alveolar stage, expression of all three receptors was

detected in type I (p1) and type II (p2) pneumocytes, with more pronounced expression in type II pneumocytes. A significant decrease in both the percentage area and integrated density of the 5-HT2A receptor was observed during the alveolar stage. In contrast, the 5-HT3A receptor showed a decrease in percentage area but an increase in integrated density during the alveolar stage, suggesting that a smaller number of cells expressed this receptor, while those cells (p1 and p2) markedly increased their expression during this stage. RT-qPCR analysis demonstrated stable gene expression of 5-HT1A and 5-HT2A receptors throughout all developmental stages, whereas the 5-HT3A receptor gene showed the highest expression during the pseudoglandular stage, followed by a gradual decline toward the alveolar stage.

Conclusions: Various types of serotonin receptors are expressed in the fetal lung during growth and maturation. Our findings demonstrated that each analyzed receptor exhibits a characteristic expression pattern within specific cellular populations, including airway epithelium, smooth muscle cells, and pneumocytes, suggesting their selective involvement in different aspects of lung ontogenesis – ranging from vascular development and bronchial musculature formation to alveolar epithelial maturation. In addition to their importance in normal lung growth and maturation, the dynamic spatial and temporal expression patterns of these receptors also may indicate their potential role in the pathogenesis of pulmonary diseases, particularly those associated with the neonatal period.

10. LAY SUMMARY

Human lungs begin to develop during early pregnancy, and their proper growth and maturation depend on numerous signaling mechanisms within the body. Serotonin, one of the oldest signaling molecules, plays an important role in this process by acting through serotonin receptors located on the surface of cells.

This study aimed to investigate when and where serotonin receptors appear in the human lung during fetal development. Three types of serotonin receptors (5-HT1A, 5-HT2A, and 5-HT3A) were analyzed in fetal lung tissue samples collected between the 12th and 40th week of pregnancy, covering different stages of lung development.

Histological, immunohistochemical, and molecular methods were used to determine the presence and quantity of these receptors in different parts of the lungs. The results showed that all three receptors are present during lung development, but their expression changes depending on the developmental stage and cell type. Different receptors showed distinct expression patterns in blood vessels, smooth muscle cells, and alveolar cells, indicating their involvement in multiple processes of lung tissue development.

The findings of this study contribute to a better understanding of human lung development before birth and suggest a possible role of serotonin receptors in the development of certain neonatal lung diseases. These results may be useful for future research on normal lung development as well as on the mechanisms underlying diseases associated with impaired lung maturation.

11. LITERATURA

1. Grippi MA, Elias JA, Fishman JA, Kotloff RM, Pack AI, Senior RM i sur. Fishman's pulmonary diseases and disorders, 5. izdanje. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2015.
2. Shannon JM, Hyatt BA. Epithelial-mesenchymal interactions in the developing lung. *Annu Rev Physiol.* 2004;66:625-45.
3. Hislop AA. Airway and blood vessel interaction during lung development. *J Anat.* 2002;201(4):325-34.
4. Rackley CR, Stripp BR. Building and maintaining the epithelium of the lung. *J Clin Invest.* 2012;122(8):2724-30.
5. Schittny JC. Development of the lung. *Cell Tissue Res.* 2017;367(3):427-44.
6. Burri PH. Fetal and postnatal development of the lung. *Annu Rev Physiol.* 1984;46:617-28.
7. Nikolic MZ, Sun D, Rawlins EL. Human lung development: recent progress and new challenges. *Development.* 2018. doi:10.1242/dev.163485.
8. Schittny JC, Burri PH. Morphogenesis of the mammalian lung: aspects of structure and extracellular matrix components. U: Massaro D MG, Chambon P, editor. *Lung development and regeneration.* New York: Marcel Dekker; 2004. str. 275–317.
9. Morrissey EE, Hogan BL. Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Dev Cell.* 2010;18(1):8-23.
10. Burri PH. Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biol Neonate.* 2006;89(4):313-22.
11. Menefee WJ, J; Mazzasette, C; Nguyen, KL. Embryonic development of the respiratory system. *Human Anatomy - LibreTeksts;* 2022 [citirano 7. rujna 2025]; Dostupno na: [https://med.libretexts.org/Bookshelves/Anatomy_and_Physiology/Human_Anatomy_\(OERI\)/20%3A_Respiratory_System/20.05%3A_Embryonic_Development_of_the_Respiratory_System](https://med.libretexts.org/Bookshelves/Anatomy_and_Physiology/Human_Anatomy_(OERI)/20%3A_Respiratory_System/20.05%3A_Embryonic_Development_of_the_Respiratory_System).
12. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Before we are born. 9. izdanje. Philadelphia: Elsevier; 2016.
13. Sadler TW. *Langman's medical embryology:* Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
14. Cardoso WV, Lu J. Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development.* 2006;133(9):1611-24.
15. Herriges M, Morrissey EE. Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development.* 2014;141(3):502-13.

16. Warburton D, Lee M, Berberich MA, Bernfield M. Molecular embryology and the study of lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;9(1):5-9.
17. Thurlbeck WM. Postnatal growth and development of the lung. *Am Rev Respir Dis*. 1975;111(6):803-44.
18. Nasri A, Foisset F, Ahmed E, Lahmar Z, Vachier I, Jorgensen C i sur. Roles of mesenchymal cells in the lung: from lung development to chronic obstructive pulmonary disease. *Cells*. 2021;10(12). doi: 10.3390/cells10123467
19. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 2009;326(5957):1216-9.
20. Spooner BS, Faubion JM. Collagen involvement in branching morphogenesis of embryonic lung and salivary gland. *Dev Biol*. 1980;77(1):84-102.
21. Wessells NK. Mammalian lung development: interactions in formation and morphogenesis of tracheal buds. *J Exp Zool*. 1970;175(4):455-66.
22. Cutz E, Gillan JE, Bryan AC. Neuroendocrine cells in the developing human lung: morphologic and functional considerations. *Pediatr Pulmonol*. 1985;1:S21-9.
23. Sunday ME. Pulmonary neuroendocrine cells and lung development. *Endocr Pathol*. 1996;7(3):173-201.
24. Sparrow MP, Weichselbaum M, McCray PB. Development of the innervation and airway smooth muscle in human fetal lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20(4):550-60.
25. Schittny JC, Miserocchi G, Sparrow MP. Spontaneous peristaltic airway contractions propel lung liquid through the bronchial tree of intact and fetal lung explants. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;23(1):11-8.
26. Koos BJ, Rajae A. Fetal breathing movements and changes at birth. *Adv Exp Med Biol*. 2014;814:89-101.
27. Pan J, Copland I, Post M, Yeager H, Cutz E. Mechanical stretch-induced serotonin release from pulmonary neuroendocrine cells: implications for lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(1):L185-93.
28. Liu M, Xu J, Liu J, Kraw ME, Tanswell AK, Post M. Mechanical strain-enhanced fetal lung cell proliferation is mediated by phospholipase C and D and protein kinase C. *Am J Physiol*. 1995;268:L729-38.

29. Scott JE, Yang SY, Stanik E, Anderson JE. Influence of strain on [3H]thymidine incorporation, surfactant-related phospholipid synthesis, and cAMP levels in fetal type II alveolar cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;8(3):258-65.
30. Tschanz SA, Salm LA, Roth-Kleiner M, Barre SF, Burri PH, Schittny JC. Rat lungs show a biphasic formation of new alveoli during postnatal development. *J Appl Physiol*. 2014;117(1):89-95.
31. Merkus PJ, ten Have-Opbroek AA, Quanjer PH. Human lung growth: a review. *Pediatr Pulmonol*. 1996;21(6):383-97.
32. Narayanan M, Owers-Bradley J, Beardsmore CS, Mada M, Ball I, Garipov R i sur. Alveolarization continues during childhood and adolescence: new evidence from helium-3 magnetic resonance. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(2):186-91.
33. Schittny JC, Mund SI, Stampanoni M. Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(2):L246-54.
34. Zeltner TB, Caduff JH, Gehr P, Pfenninger J, Burri PH. The postnatal development and growth of the human lung. I. Morphometry. *Respir Physiol*. 1987;67(3):247-67.
35. Nichols DE, Nichols CD. Serotonin receptors. *Chem Rev*. 2008;108(5):1614-41.
36. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med*. 2009;60:355-66.
37. Herr N, Bode C, Duerschmied D. The effects of serotonin in immune cells. *Front Cardiovasc Med*. 2017;4:48.
38. Terry N, Margolis KG. Serotonergic mechanisms regulating the gi tract: experimental evidence and therapeutic relevance. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;239:319-42.
39. Mawe GM, Hoffman JM. Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(8):473-86.
40. Watts SW, Morrison SF, Davis RP, Barman SM. Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacol Rev*. 2012;64(2):359-88.
41. Ni W, Watts SW. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33(7):575-83.
42. Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W i sur. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science*. 2006;312(5770):104-7.

43. Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H i sur. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med.* 2010;16(7):804-8.
44. Ohara-Imaizumi M, Kim H, Yoshida M, Fujiwara T, Aoyagi K, Toyofuku Y i sur. Serotonin regulates glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic beta cells during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(48):19420-5.
45. Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schutz G i sur. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell.* 2008;135(5):825-37.
46. Delaney C, Gien J, Grover TR, Roe G, Abman SH. Pulmonary vascular effects of serotonin and selective serotonin reuptake inhibitors in the late-gestation ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011;301(6):L937-44.
47. Nemecek GM, Coughlin SR, Handley DA, Moskowitz MA. Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(3):674-8.
48. Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res.* 2008;195(1):198-213.
49. Lauder JM, Bloom FE. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J Comp Neurol.* 1974;155(4):469-81.
50. Fujimiya M, Kimura H, Maeda T. Postnatal development of serotonin nerve fibers in the somatosensory cortex of mice studied by immunohistochemistry. *J Comp Neurol.* 1986;246(2):191-201.
51. Goldberg JJ, Kater SB. Expression and function of the neurotransmitter serotonin during development of the Helisoma nervous system. *Dev Biol.* 1989;131(2):483-95.
52. Taghert PH, Goodman CS. Cell determination and differentiation of identified serotonin-immunoreactive neurons in the grasshopper embryo. *J Neurosci.* 1984;4(4):989-1000.
53. Li QH, Nakadate K, Tanaka-Nakadate S, Nakatsuka D, Cui Y, Watanabe Y i sur. Unique expression patterns of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in the rat brain during postnatal development: Western blot and immunohistochemical analyses. *J Comp Neurol.* 2004;469(1):128-40.
54. Grewal JS, Mukhin YV, Garnovskaya MN, Raymond JR, Greene EL. Serotonin 5-HT_{2A} receptor induces TGF-beta1 expression in mesangial cells via ERK: proliferative and fibrotic signals. *Am J Physiol.* 1999;276(6):F922-30.

55. Kim DC, Jun DW, Kwon YI, Lee KN, Lee HL, Lee OY i sur. 5-HT_{2A} receptor antagonists inhibit hepatic stellate cell activation and facilitate apoptosis. *Liver int.* 2013;33(4):535-43.
56. Yu B, Becnel J, Zerfaoui M, Rohatgi R, Boulares AH, Nichols CD. Serotonin 5-hydroxytryptamine(2A) receptor activation suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced inflammation with extraordinary potency. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;327(2):316-23.
57. Welsh DJ, Harnett M, MacLean M, Peacock AJ. Proliferation and signaling in fibroblasts: role of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor and transporter. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(3):252-9.
58. Bonnin A, Goeden N, Chen K, Wilson ML, King J, Shih JC i sur. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature.* 2011;472(7343):347-50.
59. Nebigil CG, Etienne N, Schaerlinger B, Hickel P, Launay JM, Maroteaux L. Developmentally regulated serotonin 5-HT_{2B} receptors. *Int J Dev Neurosci.* 2001;19(4):365-72.
60. Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology.* 2007;132(1):397-414.
61. Bonnin A, Levitt P. Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain. *Neuroscience.* 2011;197:1-7.
62. Erspamer V, Asero B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature.* 1952;169(4306):800-1.
63. Rapport MM, Green AA, Page IH. Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J Biol Chem.* 1948;174(2):735-41.
64. Rapport MM, Green AA, Page IH. Crystalline Serotonin. *Science.* 1948;108(2804):329-30.
65. McCorvy JD, Roth BL. Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 2015;150:129-42.
66. Twarog BM, Page IH. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol.* 1953;175(1):157-61.
67. Twarog BM. Responses of a molluscan smooth muscle to acetylcholine and 5-hydroxytryptamine. *J Cell Physiol.* 1954;44(1):141-63.
68. Woolley DW, Shaw E. A Biochemical and Pharmacological Suggestion About Certain Mental Disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1954;40(4):228-31.

69. Adnot S, Houssaini A, Abid S, Marcos E, Amsellem V. Serotonin transporter and serotonin receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2013;218:365-80.
70. Lv J, Liu F. The role of serotonin beyond the central nervous system during embryogenesis. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:74.
71. Eddahibi S, Adnot S. Serotonin and pulmonary arterial hypertension. *Rev Mal Respir*. 2006;23:4S45-4S51.
72. Dempsie Y, MacLean MR. Pulmonary hypertension: therapeutic targets within the serotonin system. *Br J Pharmacol*. 2008;155(4):455-62.
73. Archambault JL, Delaney CA. A review of serotonin in the developing lung and neonatal pulmonary hypertension. *Biomedicines*. 2023;11(11).
74. Martin AM, Young RL, Leong L, Rogers GB, Spencer NJ, Jessup CF i sur. The diverse metabolic roles of peripheral serotonin. *Endocrinology*. 2017;158(5):1049-63.
75. Fouquet G, Coman T, Hermine O, Cote F. Serotonin, hematopoiesis and stem cells. *Pharmacol Res*. 2019;140:67-74.
76. Roth W, Zadeh K, Vekariya R, Ge Y, Mohamadzadeh M. Tryptophan metabolism and gut-brain homeostasis. *Int J Mol Sci* 2021;22(6):2973. doi: 10.3390/ijms22062973.
77. Fatima-Shad K, urednik. Serotonin: A chemical messenger between all types of living cells. London: IntechOpen; 2017.
78. Read NW, Gwee KA. The importance of 5-hydroxytryptamine receptors in the gut. *Pharmacol Ther*. 1994;62(1-2):159-73.
79. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: molekularni pristup. Treće izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2004.
80. Gresch PJ. Serotonin receptor signaling. U: Lennarz WJ, Lane MD, urednici. *Encyclopedia of biological chemistry*. Drugo izdanje. Waltham (MA): Academic Press; 2013. str. 224-228.
81. Maricq AV PA, Brake AJ, Myers RM, Julius D. Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science*. 1991;254(5030):432–7.
82. Bradley PB, Engel G, Feniuk W, Fozard JR, Humphrey PP, Middlemiss DN i sur. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology*. 1986;25(6):563-76.
83. Reeves DC, Lummis SC. The molecular basis of the structure and function of the 5-HT3 receptor: a model ligand-gated ion channel. *Mol Membr Biol*. 2002;19(1):11-26.

84. Sarkar P, Mozumder S, Bej A, Mukherjee S, Sengupta J, Chattopadhyay A. Structure, dynamics and lipid interactions of serotonin receptors: excitements and challenges. *Biophys Rev.* 2020;13(1):101-22.
85. Kroeze WK, Kristiansen K, Roth BL. Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Curr Top Med Chem.* 2002;2(6):507-28.
86. Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW i sur. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther.* 2001;92(2-3):179-212.
87. Yakel JL, Jackson MB. 5-HT₃ receptors mediate rapid responses in cultured hippocampus and a clonal cell line. *Neuron.* 1988;1(7):615-21.
88. Bockaert J, Claeysen S, Becamel C, Dumuis A, Marin P. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Res.* 2006;326(2):553-72.
89. Peroutka SJ. 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes. *Annu Rev Neurosci* 1988;11:45-60.
90. Pytliak M, Vargova V, Mechirova V, Felsoci M. Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiol Res.* 2011;60(1):15-25.
91. Zhang M, Chen T, Lu X, Lan X, Chen Z, Lu S. G protein-coupled receptors (GPCRs): advances in structures, mechanisms, and drug discovery. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):88.
92. Wu D, Casey PJ. GPCR-G α 13 involvement in mitochondrial function, oxidative stress, and prostate cancer. *Int J Mol Sci.* 2024;25(13):7162.
93. Pedigo NW, Yamamura HI, Nelson DL. Discrimination of multiple [3H]5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain. *J Neurochem.* 1981;36(1):220-6.
94. Kobilka BK, Frielle T, Collins S, Yang-Feng T, Kobilka TS, Francke U i sur. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature.* 1987;329(6134):75-9.
95. Fargin A, Raymond JR, Lohse MJ, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ. The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. *Nature.* 1988;335(6188):358-60.

96. Fujiwara Y, Nelson DL, Kashihara K, Varga E, Roeske WR, Yamamura HI. The cloning and sequence analysis of the rat serotonin-1A receptor gene. *Life sci.* 1990;47(22):PL127-32.
97. Chilmonczyk Z, Bojarski AJ, Pilc A, Sylte I. Functional selectivity and antidepressant activity of serotonin 1a receptor ligands. *Int J Mol Sci.* 2015;16(8):18474-506.
98. Barnes NM, Hales TG, Lummis SC, Peters JA. The 5-HT₃ receptor--the relationship between structure and function. *Neuropharmacology.* 2009;56(1):273-84.
99. Cazzola I, Matera MG. 5-HT modifiers as a potential treatment of asthma. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21(1):13-6.
100. Frishman WH, Huberfeld S, Okin S, Wang YH, Kumar A, Shareef B. Serotonin and serotonin antagonism in cardiovascular and non-cardiovascular disease. *J Clin Pharmacol.* 1995;35(6):541-72.
101. Liu Y, Suzuki YJ, Day RM, Fanburg BL. Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin. *Circ Res.* 2004;95(6):579-86.
102. Durk T, Panther E, Muller T, Soricther S, Ferrari D, Pizzirani C i sur. 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes. *Int Immunol.* 2005;17(5):599-606.
103. Iken K, Chheng S, Fargin A, Goulet AC, Kouassi E. Serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT_{1A} receptors. *Cell Immunol.* 1995;163(1):1-9.
104. Ito T, Ikeda U, Shimpo M, Yamamoto K, Shimada K. Serotonin increases interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2000;102(20):2522-7.
105. Leysen JE. 5-HT₂ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2004;3(1):11-26.
106. Nagatomo T, Rashid M, Abul Muntasir H, Komiyama T. Functions of 5-HT_{2A} receptor and its antagonists in the cardiovascular system. *Pharmacol Ther.* 2004;104(1):59-81.
107. Roth BL, Willins DL, Kristiansen K, Kroeze WK. 5-Hydroxytryptamine₂-family receptors (5-hydroxytryptamine_{2A}, 5-hydroxytryptamine_{2B}, 5-hydroxytryptamine_{2C}): where structure meets function. *Pharmacol Ther.* 1998;79(3):231-57.
108. Nichols DE. Psychedelics. *Pharmacol Rev.* 2016;68(2):264-355.
109. Zhang G, Stackman RW, Jr. The role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in memory and cognition. *Front Pharmacol.* 2015;6:225.

110. Nichols DE. Hallucinogens. *Pharmacol Ther.* 2004;101(2):131-81.
111. Wilcox BD, Rydelek-Fitzgerald L, Jeffrey JJ. Regulation of collagenase gene expression by serotonin and progesterone in rat uterine smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1992;267(29):20752-7.
112. Cohen ML, Fuller RW, Wiley KS. Evidence for 5-HT₂ receptors mediating contraction in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981;218(2):421-5.
113. Kang BN, Ha SG, Bahaie NS, Hosseinkhani MR, Ge XN, Blumenthal MN i sur. Regulation of serotonin-induced trafficking and migration of eosinophils. *PloS one.* 2013;8(1):e54840.
114. Nau F, Jr., Yu B, Martin D, Nichols CD. Serotonin 5-HT_{2A} receptor activation blocks TNF- α mediated inflammation in vivo. *PloS one.* 2013;8(10):e75426.
115. Nau F, Jr., Miller J, Saravia J, Ahlert T, Yu B, Happel KI i sur. Serotonin 5-HT(2) receptor activation prevents allergic asthma in a mouse model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;308(2):L191-8.
116. Vikenes K, Farstad M, Nordrehaug JE. Serotonin is associated with coronary artery disease and cardiac events. *Circulation.* 1999;100(5):483-9.
117. Lofdahl A, Rydell-Tormanen K, Larsson-Callerfelt AK, Wenglen C, Westergren-Thorsson G. Pulmonary fibrosis in vivo displays increased p21 expression reduced by 5-HT(2B) receptor antagonists in vitro - a potential pathway affecting proliferation. *Sci Rep.* 2018;8(1):1927.
118. Lauder JM. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;600:297-313.
119. Haydon PG, McCobb DP, Kater SB. Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science.* 1984;226(4674):561-4.
120. Shen KP, Lin HL, Hsieh SL, Kwan AL, Chen IJ, Wu BN. Eugenosedin-A prevents hyperglycaemia, hyperlipidaemia and lipid peroxidation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J Pharm Pharmacol* 2009;61(4):517-25.
121. Weiss B, Mertz A, Schrock E, Koenen M, Rappold G. Assignment of a human homolog of the mouse Htr3 receptor gene to chromosome 11q23.1-q23.2. *Genomics.* 1995;29(1):304-5.
122. Lummis SC. 5-HT(3) receptors. *J Biol Chem.* 2012;287(48):40239-45.
123. Yang J. Ion permeation through 5-hydroxytryptamine-gated channels in neuroblastoma N18 cells. *J Gen Physiol.* 1990;96(6):1177-98.

124. Miquel M-C, Emerit MB, Nosjean A, Simon A, Rumajogee P, Brisorgueil M-J i sur. Differential subcellular localization of the 5-HT₃-As receptor subunit in the rat central nervous system. *European Journal of Neuroscience*. 2002;15(3):449-57.
125. Irving H, Turek I, Kettle C, Yaakob N. Tapping into 5-HT(3) receptors to modify metabolic and immune responses. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21).
126. Galligan JJ. Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterology & Motility*. 2002;14(6):611-23.
127. Tyers MB, Bunce KT, Humphrey PP. Pharmacological and anti-emetic properties of ondansetron. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1989;25 Suppl 1:S15-9.
128. Humphrey PP, Bountra C, Clayton N, Kozłowski K. Review article: the therapeutic potential of 5-HT₃ receptor antagonists in the treatment of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13:31-8.
129. Greenshaw AJ, Silverstone PH. The non-antiemetic uses of serotonin 5-HT₃ receptor antagonists. *Clinical pharmacology and therapeutic applications*. *Drugs*. 1997;53(1):20-39.
130. Costescu M, Paunescu H, Vasile S, Zugravu A, Coman OA, Fulga I. Pharmacodynamics of serotonin. Emphasis on 5HT-3 antagonists and SSRI medication (I). *Modern Medicine* 2016;23(2):149-55.
131. Johnson BA, Seneviratne C, Wang XQ, Ait-Daoud N, Li MD. Determination of genotype combinations that can predict the outcome of the treatment of alcohol dependence using the 5-HT(3) antagonist ondansetron. *Am J Psychiatry*. 2013;170(9):1020-31.
132. Johnson BA, Campling GM, Griffiths P, Cowen PJ. Attenuation of some alcohol-induced mood changes and the desire to drink by 5-HT₃ receptor blockade: a preliminary study in healthy male volunteers. *Psychopharmacology*. 1993;112(1):142-4.
133. Faerber L, Drechsler S, Ladenburger S, Gschaidmeier H, Fischer W. The neuronal 5-HT₃ receptor network after 20 years of research--evolving concepts in management of pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2007;560(1):1-8.
134. Chu LF, Sun J, Clemenson A, Erlendson MJ, Rico T, Cornell E i sur.. Ondansetron does not reduce withdrawal in patients with physical dependence on chronic opioid therapy. *J Addict Med*. 2017;11(5):342-9.

135. Hilaire G, Voituren N, Menuet C, Ichiyama RM, Subramanian HH, Dutschmann M. The role of serotonin in respiratory function and dysfunction. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010;174(1-2):76-88.
136. Baumgartner RA, Wills-Karp M, Kaufman MJ, Munakata M, Hirshman C. Serotonin induces constriction and relaxation of the guinea pig airway. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;255(1):165-73.
137. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf).* 2017;219(1):22-96.
138. Gross ER, Gershon MD, Margolis KG, Gertsberg ZV, Li Z, Cowles RA. Neuronal serotonin regulates growth of the intestinal mucosa in mice. *Gastroenterology.* 2012;143(2):408-17.e2
139. Cummings KJ, Hodges MR. The serotonergic system and the control of breathing during development. *Respir Physiol Neurobiol.* 2019;270:103255.
140. Fabre A, Marchal-Somme J, Marchand-Adam S, Quesnel C, Borie R, Dehoux M i sur. Modulation of bleomycin-induced lung fibrosis by serotonin receptor antagonists in mice. *Eur Respir J.* 2008;32(2):426-36.
141. Frille A, Rullmann M, Becker GA, Patt M, Luthardt J, Tiepolt S i sur. Increased pulmonary serotonin transporter in patients with chronic obstructive pulmonary disease who developed pulmonary hypertension. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2021;48(4):1081-92.
142. Delaney C, Gien J, Roe G, Isenberg N, Kailey J, Abman SH. Serotonin contributes to high pulmonary vascular tone in a sheep model of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013;304(12):L894-901.
143. MacLean MR, Herve P, Eddahibi S, Adnot S. 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol.* 2000;131(2):161-8.
144. Lee SL, Wang WW, Lanzillo JJ, Fanburg BL. Regulation of serotonin-induced DNA synthesis of bovine pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1994;266(1 Pt 1):L53-60.
145. Montani D, Seferian A, Savale L, Simonneau G, Humbert M. Drug-induced pulmonary arterial hypertension: a recent outbreak. *Eur Respir Rev.* 2013;22(129):244-50.

146. Bayer H, Muller T, Myrtek D, Sorichter S, Ziegenhagen M, Norgauer J i sur. Serotonergic receptors on human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;36(1):85-93.
147. Castro EC, Sen P, Parks WT, Langston C, Galambos C. The role of serotonin transporter in human lung development and in neonatal lung disorders. *Can Respir J*. 2017;2017:9064046.
148. Hodge E, Nelson CP, Miller S, Billington CK, Stewart CE, Swan C, et al. HTR4 gene structure and altered expression in the developing lung. *Respir Res*. 2013;14(1):77.
149. Kumar K, Oli A, Hallikeri K, Shilpasree AS, Goni M. An optimized protocol for total RNA isolation from archived formalin-fixed paraffin-embedded tissues to identify the long non-coding RNA in oral squamous cell carcinomas. *MethodsX*. 2022;9:101602.
150. Mohammadi Amirabad L, Ahangari G, Derakhshan Deilami G. Significant changes of 5-Hydroxytryptamine 3A receptor gene expression in peripheral blood mononuclear cells of allergic asthmatic patients. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2014;13(1):33-9.
151. Ullmer C, Schmuck K, Kalkman HO, Lubbert H. Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS letters*. 1995;370(3):215-21.
152. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
153. Samori E, Rodriguez I, Oliver JA, Sanchez-Vazquez FJ, Lopez-Olmeda JF. Influence of feeding time on daily rhythms of locomotor activity, clock genes, and epigenetic mechanisms in the liver and hypothalamus of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiol Biochem*. 2025;51(1):50.
154. Ryu J, Vicencio AG, Yeager ME, Kashgarian M, Haddad GG, Eickelberg O. Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human and mouse lung development. *Thromb Haemost*. 2005;94(1):175-83.
155. Adamson IY, King GM. Epithelial-mesenchymal interactions in postnatal rat lung growth. *Exp Lung Res*. 1985;8(4):261-74.
156. Maniscalco WM, Watkins RH, O'Reilly MA, Shea CP. Increased epithelial cell proliferation in very premature baboons with chronic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283(5):L991-L1001.
157. Kraljevic D, Vukojevic K, Karan D, Rajic B, Todorovic J, Miskovic J i sur. Proliferation, apoptosis and expression of matrix metalloproteinase-9 in human fetal lung. *Acta Histochem*. 2015;117(4-5):444-50.

158. Keshavarz M, Schwarz H, Hartmann P, Wiegand S, Skill M, Althaus M i sur. Caveolin-1: Functional insights into its role in muscarine- and serotonin-induced smooth muscle constriction in murine airways. *Front Physiol.* 2017;8:295.
159. Jones MR, Lingampally A, Wu J, Sedighi J, Ahmadvand N, Wilhelm J i sur. Evidence for overlapping and distinct biological activities and transcriptional targets triggered by fibroblast growth factor receptor 2b signaling between mid- and early pseudoglandular stages of mouse lung development. *Cells.* 2020;9(5).
160. Joshi S, Kotecha S. Lung growth and development. *Early Hum Dev.* 2007;83(12):789-94.
161. Rubarth LB, Quinn J. Respiratory development and respiratory distress syndrome. *neonatal netw.* 2015;34(4):231-8.
162. Surate Solaligue DE, Rodriguez-Castillo JA, Ahlbrecht K, Morty RE. Recent advances in our understanding of the mechanisms of late lung development and bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017;313(6):L1101-L53.
163. Bustani P, Hodge R, Tellabati A, Li J, Pandya H, Kotecha S. Differential response of the epithelium and interstitium in developing human fetal lung explants to hyperoxia. *Pediatr Res.* 2006;59(3):383-8.
164. Adamson IY, King GM. Sex differences in development of fetal rat lung. I. Autoradiographic and biochemical studies. *Lab Invest.* 1984;50(4):456-60.
165. Brandt JP, Mandiga P. Histology, Alveolar Cells. [Citirano 28. kolovoza 2023.]. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557542/>
166. Pechkovsky DV, Zissel G, Ziegenhagen MW, Einhaus M, Taube C, Rabe KF i sur. Effect of proinflammatory cytokines on interleukin-8 mRNA expression and protein production by isolated human alveolar epithelial cells type II in primary culture. *Eur Cytokine Netw.* 2000;11(4):618-25.
167. Eghtesad M, Jackson HE, Cunningham AC. Primary human alveolar epithelial cells can elicit the transendothelial migration of CD14⁺ monocytes and CD3⁺ lymphocytes. *Immunology.* 2001;102(2):157-64.

12. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODATCI

Ime i prezime: Jelena Nikolić

Datum i mjesto rođenja: 10. lipnja 1986. , Split

Državljanstvo: Hrvatsko

OBRAZOVANJE

2002. – 2005. V. gimnazija „Vladimir Nazor“ u Splitu
2005. – 2010. Preddiplomski sveučilišni studij Biologije i ekologije mora, Sveučilišni odjel za studije mora, Sveučilište u Splitu, akademska titula: Prvostupnica biologije i ekologije mora
2010. – 2012. Diplomski sveučilišni studij Biologije i ekologije mora, Sveučilišni odjel za studije mora, Sveučilište u Splitu, akademska titula: Magistra biologije i ekologije mora
2018. – danas Poslijediplomski sveučilišni doktorski studij Biologija Novotvorina, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

RADNO ISKUSTVO

- 10/2012 – 7/2013 Rad u znanstveno-istraživačkoj grupi dr. sc. Anite Kriško „Molekularne osnove starenja“, Mediteranski institut za istraživanje života (MedILS), Split, Hrvatska
- 5/2018 – 11/2021 Doktorand u znanstveno-istraživačkoj grupi „Biologija robustnosti“ pod vodstvom Prof. dr. sc. Miroslava Radmana i dr. sc. Katarine Trajković, Mediteranski institut za istraživanje života (MedILS), Split, Hrvatska
- 11/2021 – 2/2023 Doktorand pod vodstvom Izv. Prof. dr. sc. Natalije Filipović, Laboratorij za istraživanje ranog razvoja čovjeka, Mediteranski institut za istraživanje života (MedILS) i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu (MEFST) Split, Hrvatska

PROJEKTI

4/2019 – 11/2021 Suradnica na istraživačkom projektu „Stanična parabioza: Uloga međustanične komunikacije u fenotipskoj supresiji“ pod pokroviteljstvom Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) pod vodstvom dr. sc. Katarine Trajković

VOLONTIRANJE

4/2019 Voditeljica aktivnosti na Festivalu znanosti (MedILS, Split)

9/2022 Voditeljica aktivnosti na Europskoj noći istraživača 2022. u okviru projekta Blue Connect – Radionica za djecu „Upoznajmo ljudsko tijelo“ (Prokurative, Split)

PROFESIONALNO USAVRŠAVANJE

9/2012 Tečaj za ronionca s jednom zvjezdom (CMAS*), Ronilački klub „Zenta“, Split

7/2018 Tečaj osposobljavanja za rad s opasnim kemikalijama, Hrvatski zavod za toksikologiju i antidoping, Zagreb

12/2022 Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama (kategorija 3 – voditelj i zamjenik voditelja pokusa), Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu (MEFST), Split

POSLOVNE VJEŠTINE

- Rad u laboratoriju stanične kulture (humane i životinjske stanične linije)
- Imunohistokemija i imunofluorescencija
- Fluorescencijska mikroskopija
- Protočna citometrija
- Tehnike molekularne biologije (PCR, bakterijska transformacija, Izolacija DNK, stanična transfekcija, razvoj stabilnih staničnih linija, gel elektroforeza na agaroznom gelu)
- Proteomika (izolacija proteina, ELISA)
- Transkriptomika (RT-qPCR, izolacija RNA iz tkiva uklopljenih u parafinske blokove)
- Rad s laboratorijskim životinjama (C57BL/6 soj miša)
- Vladanje alatima operativnog sustava, alatima za pristup i pretraživanje literature, svim alatima paketa MS Office, Image J, Adobe photoshop, GraphPad, EndNote

DRUGE AKTIVNOSTI I ZNANJA

Poznavanje stranih jezika:

- Engleski
- Talijanski

Vozačka dozvola B kategorije