

# Utjecaj točkastih mutacija u egzonima 4 i 5 (V660L i H770H) gena za progesteronski receptor na rizik za prijevremeni porod

---

Krstanović, Ines

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:182628>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Ines Krstanović**

**UTJECAJ TOČKASTIH MUTACIJA U**  
**EGZONIMA 4 I 5 (V660L I H770H) GENA**  
**ZA PROGESTERONSKI RECEPTOR NA**  
**RIZIK ZA PRIJEVREMENI POROD**

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Ines Krstanović**

**UTJECAJ TOČKASTIH MUTACIJA U**  
**EGZONIMA 4 I 5 (V660L I H770H) GENA**  
**ZA PROGESTERONSKI RECEPTOR NA**  
**RIZIK ZA PRIJEVREMENI POROD**

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je ostvaren u: Laboratoriju za medicinsku genetiku Katedre za medicinsku biologiju i genetiku na Medicinskom fakultetu Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera.

Mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Jasenka Wagner Kostadinović

Rad ima 27 listova, 13 tablica i 0 slika.

## *Zahvala*

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jasenki Wagner Kostadinović na prihvaćenom mentorstvu, stručnom vodstvu, svoj pruženoj pomoći i savjetima.*

*Također, veliko hvala i Neni Arvaj, zdr. lab. tehn., na iskazanoj pomoći kad god je to bilo potrebno, njezinim domišljatim pričama zbog kojih je vrijeme u laboratoriju brže teklo.*

*Posebno hvala mojoj obitelji na bezuvjetnom razumijevanju, podršci i vjerovanju u mene. Hvala vam na svim sugestijama ma koliko god one bile (ne)točne!*

*I za kraj, zahvaljujem kolegama i prijateljima na nesebičnoj pomoći i ohrabrenju tijekom izrade rada. Hvala vam na svim lijepim i nezaboravnim trenucima koji su obilježili moje dosadašnje akademsko obrazovanje.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Prijevremeni porod .....	1
1.1.1. Etiologija.....	1
1.1.2. Epidemiologija.....	2
1.2. Progesteron .....	3
1.2.1. Izoforme progesteronskog receptora.....	3
1.2.2. Progesteronski signalni put .....	5
1.3. PROGINS mutacija .....	5
1.4. Prevencija i liječenje prijevremenog poroda .....	6
2. HIPOTEZA .....	7
3. CILJ.....	8
4. ISPITANICI I METODE .....	9
4.1. Ustroj studije.....	9
4.2. Ispitanici .....	9
4.3. Metode .....	9
4.3.1. Izolacija DNA .....	9
4.3.2. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu.....	10
4.4. Statističke metode.....	13
5. REZULTATI.....	14
6. RASPRAVA.....	20
7. ZAKLJUČAK .....	22
8. SAŽETAK.....	23
9. SUMMARY .....	24
10. LITERATURA.....	25
11. ŽIVOTOPIS .....	27

## UVOD

### POPIS KRATICA

AF-1 – Aktivacijska domena 1 (engl. *AF-1; Activation function 1*)

AF-2 – Aktivacijska domena 2 (engl. *AF-2; Activation function 2*)

BMI – Indeks tjelesne mase (engl. *BMI; Body mass index*)

DBD – DNA vezujuća domena (engl. *DBD; DNA binding domain*)

LBD – Ligand vezujuća domena (engl. *LBD; Ligand binding domain*)

LDL kolesterol – Kolesterol niske gustoće (engl. *LDL cholesterol; Low density cholesterol*)

MALDI-MS – Matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija–masena spektrometrija (engl. *MALDI-MS; Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry*)

PCR – Lančana reakcija polimeraze (engl. *PCR; Polymerase chain reaction*)

PGR – Gen za progesteronski receptor (engl. *PGR; Progesterone receptor gene*)

PR – Progesteronski receptor (engl. *PR; Progesterone receptor*)

PR-A – Varijanta A progesteronskog receptora (engl. *PR-A; Progesterone receptor A*)

PR-B – Varijanta B progesteronskog receptora (engl. *PR-B; Progesterone receptor B*)

pPROM – Prijevremena ruptura ovojnice (engl. *pPROM; Preterm premature rupture of membranes*)

P4 – Progesteron

SNP – Polimorfizam jednog nukleotida (engl. *SNP; Single nucleotide polymorphism*)

SHR – Src homologija 3 (engl. *SHR; Src homology 3*)

## 1. UVOD

### 1.1. Prijevremeni porod

Prijevremeni porod prepoznat je kao veliki medicinski, ali i socioekonomski problem. Osim što uzrokuje povećani rizik mortaliteta, uzrokuje i povećani rizik morbiditeta novorođenčadi (1). Definira se kao rođenje djece između 22. i 37. gestacijskog tjedna, a prema gestacijskoj dobi dijeli se u tri potkategorije: iznimno prijevremeni porod (između 24. i 28. tjedna), rani prijevremeni porod (između 28. i 32. tjedna) i umjereno do kasni prijevremeni porod (između 32. i 37. tjedna) (2, 3). Procjenjuje se da se svake godine prerano rodi 15 milijuna djece (2, 3). Oko 1 milijun djece umire svake godine zbog komplikacija prijevremenog poroda (1), a osim značajnog doprinosa mortalitetu, učinak prijevremenog poroda među nekim preživjelim može se nastaviti tijekom cijelog života (2). Posljedice mogu biti poremećaji u razvoju živčanog sustava kao što je cerebralna paraliza, poteškoće u učenju i poremećaj vida te mogu utjecati na dugoročno fizičko zdravlje s višim rizikom za razne bolesti. Ti učinci predstavljaju veliki teret za obitelj, društvo i zdravstveni sustav (2). Na svjetskoj razini, prijevremeni porod vodeći je uzrok smrti djece mlađe od pet godina, a u gotovo svim zemljama s pouzdanim podacima povećava se stopa prijevremenog poroda (1, 2).

#### 1.1.1. Etiologija

Prijevremeni porod može se podijeliti u tri skupine: spontani prijevremeni porod, jatrogeni prijevremeni porod i pPROM (1). pPROM-u se pripisuje 25 % svih prijevremenih poroda, učestaliji je u afroamerikanskoj populaciji, a najčešće je posljedica infekcije (1). Udio učestalosti jatrogenog prijevremenog poroda također je 25 %, a najčešća vrsta prijevremenog poroda je spontani prijevremeni porod kojem se pripisuje 50 % svih prijevremenih poroda (1). Identificiranje trudnoće s visokim rizikom spontanog prijevremenog poroda predstavlja izazov koji može dramatično poboljšati globalno zdravlje (4). Međutim, polovica svih prijevremenih poroda javlja se u žena bez poznatih kliničkih faktora rizika (4). Tradicionalne metode identificiranja žena s rizikom za prijevremeni porod, kao što su opstetrijska povijest, tokometrija, biokemijski biljezi i ultrazvuk cerviksa te intervencije temeljene na tim nalazima,



## UVOD

nisu smanjile stopu prijevremenog poroda (4). Stoga se prijevremeni porod može objasniti kao složena bolest s višestrukim putevima koji kulminiraju zajedničkim terminalnim putem (4).

Etiologija prijevremenog poroda je multifaktorijalna i uključuje patofiziologiju, genetske i okolišne čimbenike (1). Iako postoji više čimbenika koji utječu na prijevremeni porod, najviše su proučavana 4 glavna čimbenika, a to su: 1.) Patološko širenje maternice; 2.) Stres u majke / fetusa (preuranjena aktivacija majčinske ili fetalne hipotalamično-hipofizne adrenalne osi); 3.) Abrupcija (decidualno krvarenje); 4.) Infekcija / pretjerana upalna reakcija (1). Svi ti procesi mogu dovesti do skraćivanja cerviksa i mogu započeti mnogo prije nego što se pokažu očiti znaci prijevremenog poroda (1). Iako njihovi patofiziološki putevi različito započinju, svi završavaju na isti način, aktivirajući koriodecidualnu reakciju, kontraktilnost maternice i promjene cerviksa. Sve navedene promjene dovode do prijevremenog poroda (1).

### 1.1.2. Epidemiologija

Podatci temeljeni na nacionalnim procjenama iz 184 zemlje za 2010. godinu pokazali su 11 % (raspon 5 - 18 %) prevalencije prijevremenog poroda, što rezultira s 15 milijuna nedonoščadi (5, 6). Više od 60 % prijevremenih poroda javlja se u podsaharskoj Africi i južnoj Aziji, gdje se procjenjuje da je 9,1 milijun djece godišnje rođen prerano (5, 6). Stope su najviše u prosjeku za zemlje s niskim dohotkom (11,8 %) (5, 6). Slijede ih zemlje nižeg srednjeg dohotka (11,3 %), a najniže su za zemlje s višim srednjim i visokim dohotkom (9,4 % i 9,3 %). (5, 6). Međutim, relativno visoke stope prijevremenog poroda vidljive su u mnogim pojedinačnim zemljama s visokim dohotkom, gdje one znatno doprinose neonatalnoj smrtnosti i morbiditetu (5, 6). Od 1,2 milijuna prijevremenih poroda koji se procjenjuju u državama s visokim dohotkom, više od pola milijuna (42 %) se pojavljuju u SAD-u (5, 6). Postoje i varijacije postotka prijevremenog poroda u različitim etničkim skupinama. Na primjer, postotak prijevremenih poroda je veći u crnačkoj populaciji nego u populaciji bijelaca (1). Samo tri zemlje, Hrvatska, Ekvador i Estonija procijenile su smanjenje broja prijevremenih poroda od 1990. do 2010. godine (6). Četrnaest zemalja imalo je stabilne stope prijevremenog poroda (< 0,5 % godišnje promjene u stopama prijevremenog poroda) (6). U svim drugim zemljama procjenjuje se da je stopa prijevremenog poroda bila ista ili veća u 2010. nego u 1990. godini (6).

### 1.2. Progesteron

Progesteron sudjeluje u regulaciji menstrualnog ciklusa, priprema maternicu za primitak muških sjemenih stanica i implantaciju blastociste, a kasnije ima ulogu u održavanju trudnoće (7). Progesteron je steroid s 21 C-atomom. Sadržava ketoskupinu na C-3 i dvostruku vezu između C-4 i C-5 te na položaju C-17 ima postranični lanac – CO-CH<sub>3</sub> (7). U negravidnih žena progesteron se stvara i luči iz žutog tijela (lat. *corpus luteum*) (7). Osim što se stvara i luči iz žutog tijela, dio progesterona stvara se i u nadbubrežnoj žlijezdi i testisima jer je on međuprodukt tijekom biosinteze kortikosteroida i androgena (7). U trudnoći se progesteron većim dijelom stvara u posteljici, iako ga u prvih 6 - 8 tjedana trudnoće stvara i žuto tijelo (7). Kako se bliži datum poroda, tako raste i koncentracija progesterona u serumu (7). Glavni supstrat za biosintezu progesterona jest majčin LDL kolesterol koji se veže za receptore na trofoblastu i razgrađuje u slobodni kolesterol koji kao takav prelazi u progesteron (7). Progesteron održava trudnoću blokiranjem imunogenog odgovora na strane antigene (7).

#### 1.2.1. Izoforme progesteronskog receptora

Progesteron je jedan od esencijalnih hormona potrebnih za održavanje trudnoće, a svoje fiziološke učinke ostvaruje preko progesteronskih receptora (1). PR se eksprimiraju u središnjem živčanom sustavu, jajnicima, dojčkama i ženskom reproduktivnom traktu, uključujući vaginu, cerviks, jajovode, endometrij i miometrij maternice (1). Danas su identificirane dvije skupine PR-a:

1) nuklearni PR koji djeluju kao transkripcijski faktori aktivirani ligandom i posreduju genomske reakcije (tj. utječu na ekspresiju gena) (1).

2) obitelj PR-a koji se nalaze na površini stanice i koji su strukturno srodni s G-proteinom te pojedinačni transmembranski receptori koji posreduju u izravnom ne-genomskom djelovanju progesterona (1).

Održavanje trudnoće uglavnom se regulira putem nuklearnih receptora progesterona, dok su membranski receptori progesterona manje osjetljivi na utjecaj progesterona (1, 8).

## UVOD

PR kao nuklearni receptori sadrže aktivacijske domene, poznate kao AF-1 i AF-2. AF-1 se nalazi na amino kraju proteina i odgovoran je za funkcije neovisne o vezanju liganda (1, 9, 10). Ova regija nuklearnih receptora je visoko varijabilna (10). Za razliku od AF-1 domene, AF-2 domena smještena je unutar ligand vezujuće domene (LBD) (10) na C-terminalnom kraju i ima sposobnost vezanja liganda (1, 9). Nadalje, AF-2 domena sadrži slijed nuklearne lokalizacije i sekvencijsku regiju koja omogućuje učinkovitu homodimerizaciju ili heterodimerizaciju (9). Stoga je AF-2 domena odgovorna za vezanje liganda, dimerizaciju i translokaciju dimera u jezgru (9). Između AF-1 i AF-2 domene (9) nalaze se dvije strukturne domene: DNA-vezujuća domena (DBD), koja se nalazi približno duž središta polipeptida, i ligand-vezujuća domena (LBD) koja se nalazi duž 200 - 300 C-terminalnih ostataka (10). DBD omogućuje vezanje nuklearnog receptora za DNA u obliku dimera, a zatim regrutira transkripcijski mehanizam za transkripciju ciljanog gena (9). DBD i LBD su povezani preko vezne (eng. *hinge*) regije koja je također varijabilna (10). Nuklearni receptori su kodirani prostaglandinskim genom (PGR) koji se nalazi na kromosomu 11 (11q22-q23) (1). Dvije su izoforme progesteronskog receptora najznačajnije za utjecaj progesterona, a to su PR-A i PR-B (1). Ove dvije izoforme su strukturno vrlo slične, osim što PR-B ima dodatnih 165 aminokiselina na N-terminalnom kraju (1).

Unutar ove sekvence nalazi se dodatna aktivacijska domena poznata kao AF-3 koja daje jedinstvene funkcije PR-B-u (9). PR-B imaju funkciju transkripcijskih aktivatora gena uključenih u održavanje trudnoće, a PR-A inhibiraju aktivnost PR-B-a (1). Odnosno, PR-A djeluje proupalno, povećavajući ekspresiju proupalnih gena za PTGS2, IL8, IL1A i PTX3, dok PR-B inhibira ekspresiju proupalnih gena (1). Iako je domena za inhibiciju transkripcije prisutna u AF-1 domeni obiju izoformi, postavlja se pitanje zašto samo PR-A ima inhibitornu aktivnost (9). Odgovor je u postojanju AF-3 domene koju posjeduje PR-B. AF-3 domena uspješno sprječava funkcioniranje inhibitorne domene, čineći PR-B transkripcijski aktivnijom izoformom (9). Smatra se da učinci progesterona obično predstavljaju kombinirane aktivnosti PR-A i PR-B (8).

Kod sisavaca je dokazano da porod počinje u trenutku povlačenja progesterona. Međutim, mjerenje razine serumskog progesterona u krvi u vrijeme poroda kod ljudi pokazalo je da ne dolazi do smanjenja razine progesterona. Postoji hipoteza da ljudska parturacija uključuje promjene u ekspresiji miometrijskih nuklearnih PR-a i da promjena ekspresije dovodi do funkcionalnog povlačenja progesterona te početka poroda (1). Tijekom trudnoće PR-B čini

## UVOD

većinu ukupnog PR-a prisutnog u miometriju, ali kako se kraj trudnoće bliži, ekspresija PR-A se povećava (1). Ovo opažanje, zajedno s represivnim učinkom PR-A na funkciju PR-B-a, pružilo je značajnu potporu za hipotezu „izofornog prekidača“ (engl. *isoform switch hypothesis*) za funkcionalno povlačenje P4 (8). Povećana razina PR-A na kraju trudnoće nastaje zbog promjene u metilaciji PR-A promotorske regije (1). To na kraju dovodi do preuranjene kontraktilnosti maternice (1). Postoje neki drugi oblici poznatih nuklearnih PR-a, kao što su PRC, PRM, PRS, PRT itd., ali njihovo značenje prilikom ljudskog poroda nije značajno (1).

### 1.2.2. Progesteronski signalni put

PR-i djeluju putem više signalnih putova unutar stanice. Kanonski signalni put zahtijeva prisutnost liganda progesterona i oslobađanje PR-a pomoću proteina šaperona (9). Nakon oslobađanja i vezanja liganda progesterona, dimerizirani PR ulazi u jezgru i veže se na elemente odgovora unutar promotorskih regija i upravlja regrutiranjem transkripcijskih regulatora (9). Ovaj genomski signalni put je najsporiji od progesteronskih signalnih mehanizama. PR-i također mogu djelovati u ne-genomskom kontekstu putem vezanja proteina koji sadrže SH3, kao što je Src kinaza na specifičnim membranskim receptorima (9). Vezanje PR-a na Src kinazu izaziva brzo aktiviranje RAS / RAF / MAPK puta unutar stanice (9).

### 1.3. PROGINS mutacija

Poznato je da genetski faktori igraju značajnu ulogu u riziku od prijevremenog poroda, a polazna točka u potrazi za genetičkim varijacijama koje utječu na funkciju P4, a time i na porod, u samom je PR-u (12). Učestala varijanta PR-a je PROGINS varijanta. Karakterizirana je PV/HS-1 Alu insercijom od 320 bp u intronu G (1, 13) te dvama pojedinačnim nukleotidnim polimorfizmima (engl. *Single nucleotide polymorphisms; SNPs*) (13). SNP-G3432T u egzonu 4 uzrokuje supstituciju aminokiselina (V660L), dok SNP-C3764T u egzonu 5 uzrokuje tihu mutaciju (H770H) (14). Supstitucija aminokiselina (V600L) u egzonu 4 dovodi do razlike u fosforilaciji i degradaciji između dviju varijanti PR-a nakon vezanja liganda, vjerojatno zbog razlika u trodimenzionalnim strukturama tih dviju varijanti (1).

## UVOD

Nadalje, varijanta PR-L660 (PROGINS) pokazuje smanjenu aktivnost u testu luciferaze te ima smanjenu sposobnost suprotstavljanja proliferaciji stanica u stanicama jajnika hrčaka koje eksprimiraju ljudski PR-A, u usporedbi s PR-V660 (najčešća varijanta) (1). Dokazano je da alel PROGINS ima svoj utjecaj i predstavlja faktor rizika kod nekih bolesnika s karcinomom dojke, rakom endometrija i endometriozom (1, 12). U trudnoći njegov utjecaj se vidi ili u smanjenoj učinkovitosti PR-a na P4 ili povećanom riziku za poremećaje povezane s prijevremenim porodom (1, 12). Značajnost ovih mutacija mogla bi biti smanjena transkripcijska regulacija gena ciljanih za progesteron, što dovodi do promjene u signalnim putovima te do početka prijevremenog poroda (1).

### **1.4. Prevencija i liječenje prijevremenog poroda**

Prevencija i liječenje prijevremenog poroda i dalje ostaje neriješen problem u modernoj opstetriciji. Progesteron ima niz djelovanja na miometriju i grlić maternice, između ostalog inhibira kontraktilnost miometrija i ima učinak jačanja grlića maternice inhibirajući proizvodnju protuupalnih citokina i prostaglandina, kao i smanjujući sintezu proteina koji imaju ključnu ulogu u pokretanju poroda (14). Posljedično, progesteron može biti obećavajući kandidat za prevenciju prijevremenog poroda (14). Postoje dva glavna pripravka progesterona koji se koriste u terapiji / profilaksi prijevremenog poroda: hidrokspirogesteron kaproat, sintetički progesteron koji se obično koristi u dozi od 250 mg jednom tjedno, a daje se intramuskularno; i prirodni / mikronizirani progesteron u dozi od 100 mg dnevno koji se daje vaginalno (1). Također je rijetka primjena progesterona kao vaginalnog gela u dozi 90 - 200 mg. Najčešća upotreba preparata progesterona kao profilaksa prijevremenog poroda započinje od 16. do 20. gestacijskog tjedna i traje do 36. gestacijskog tjedna (1).

## HIPOTEZA

### **2. HIPOTEZA**

Točkaste mutacije u egzonima 4 i 5 (V660L i H770H) gena za progesteronski receptor predstavljaju rizik za prijevremeni porod.

## CILJ

### 3. CILJ

Cilj je dokazati da točkaste mutacije u egzonima 4 i 5 (V660L i H770H) gena za progesteronski receptor imaju utjecaj na prijevremeni porod.

### 4. ISPITANICI I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Retrospektivno istraživanje genetičkih varijacija (V660L i H770H) u genu za progesteronski receptor koje mogu uzrokovati prijevremeni porod.

#### 4.2. Ispitanici

U istraživanju su sudjelovale rodilje s Klinike za ginekologiju i opstetriciju KBC-a Osijek te njihova djeca. Istraživanje se sastojalo od ukupno 200 uzoraka krvi. Majčini uzorci dobiveni su venepunkcijom venske krvi, dok su uzorci krvi novorođenčadi dobiveni iz pupčane vrpce. Kontrolne skupine čini 100 uzoraka, od kojih su 50 majčinih (terminske trudnoće kojima je porod krenuo spontano), a 50 dječjih uzoraka. Isto vrijedi i za ispitivane skupine koje čini 50 majčinih i 50 dječjih uzoraka. Pretermenske su rodilje podijeljene u sljedeće skupine: rani prijevremeni porodi (< 28. gestacijskog tjedna), umjereni prijevremeni porodi (28. - 32. gestacijski tjedan) te kasni prijevremeni porodi (32. - 37. gestacijski tjedan). Ispitivala se povezanost između navedenih genetičkih mutacija te spontanijih prijevremenih poroda.

Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Osijeku odobrilo je provođenje istraživanja.

#### 4.3. Metode

##### 4.3.1. Izolacija DNA

Nakon dobivenog informiranog pristanka, jednokratno se uzorkovala venska krv majki te krv novorođenčadi iz pupčane vrpce. Izolacija DNA napravila se pomoću komercijalnog kita NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka) (15). On sadržava Proteinazu K, etanol, kolone, epruvete za prikupljanje uzorka (2 ml) te pufere B3, BW, B5 i BE (elucijski pufer). Prije početka izolacije, vodena kupelj i BE su bili zagrijani na 70 °C.

U prvom su koraku izolacije pipetirani uzorci krvi od 200 µl te lizirani dodavanjem 25 µl Proteinaze K (15). Proteinaza K je enzim koji razgrađuje proteine vezane uz DNA, a većinom razgrađuje hidrofobne aminokiseline (i aromatske i alifatske) (16). Liza stanica postiže se



## ISPITANICI I METODE

inkubacijom pune krvi u otopini koja sadrži velike količine kaotropnih iona u prisutnosti Proteinaze K (15). Kofaktor, kalcijev ion osigurava stabilnost enzima, no on ne može povećati aktivnost reakcije (16). Nakon dodavanja Proteinaze K, uzorcima se dodalo 200  $\mu$ l pufera B3, a zatim su se uzorci vorteksirali. Nakon toga, uzorci su se inkubirali 20 min na 70 °C. U sljedećem koraku svakom je uzorku dodano 210  $\mu$ l etanola (96 - 100 %) te su se ponovno vorteksirali. Uloga etanola je dehidracija i uklanjanje soli zbog razlike u solubilizaciji. Ukupan volumen svakog uzorka (635  $\mu$ l) premješten je u pojedinačnu NucleoSpin Blood kolonu koja se nalazila u epruveti za prikupljanje uzoraka. Kaotropni ioni koji su se nalazili u lizatu stvorili su hidrofobnu okolinu, a pod tim uvjetima silica membrana NucleoSpin kolone predstavlja vezno mjesto za DNA. Sljedeći korak bila je centrifuga lizata i odbacivanje sadržaja iz epruvete za prikupljanje. Nakon toga dodano je 500  $\mu$ l pufera BW pa 600  $\mu$ l pufera B5. Između dodavanja svakog pufera, uzorci su se centrifugirali, a sadržaj iz epruvete za prikupljanje se odbacio. U uvjetima visoke ionske jakosti, proteini, metaboliti i drugi kontaminanti ispiru se pomoću pufera BW i B5, a samo se DNA veže za kolonu. U sljedećem koraku preostali etanol uklonio se centrifugiranjem uzoraka bez dodavanja pufera. U posljednjem koraku NucleoSpin Blood kolone svakog uzorka premjestile su se u pojedinačne 1,5 ml epruvete za mikrocentrifugu (ne nalazi se u kitu) i dodano je 100  $\mu$ l prethodno zagrijanog pufera BE (70 °C). Uzorci su se nakon toga inkubirali na sobnoj temperaturi, a potom centrifugirali. Čista genomska DNA konačno se eluirala pod uvjetima niske ionske snage u blago alkalnom elucijskom puferu (15). Izolirani uzorci DNA čuvali su se na temperaturi od 4 °C.

### 4.3.2. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu je precizna i pouzdana metoda koja se temelji na mjerenju fluorescencijskog signala koji tijekom PCR reakcije raste proporcionalno s povećanjem broja kopija početne DNA. Razina fluorescencije mjeri se na kraju svakog PCR ciklusa pa je proces amplifikacije moguće pratiti u stvarnom vremenu.

Genotipizacija je obavljena pomoću Applied Biosystems™ TaqMan® SNP Genotyping Assays (Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD) na uređaju Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems LS 4351104, Waltham, MA, SAD) (17). Svi TaqMan® SNP Genotyping Assays (Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD) optimizirani su

## ISPITANICI I METODE

za upotrebu s TaqMan® Genotyping Master Mixom (Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD). Svaki test omogućuje individualnu genotipizaciju za jedan polimorfizam nukleotida (engl. *Single nucleotide polymorphism; SNP*).

Taqman® SNP Genotyping Assays (17) sadrži:

- Uzvodne početnice i nizvodne početnice specifične za amplifikaciju određenog SNP-a.
- Dvije Taqman MBG (engl. *Minor groove binder; MGB*) probe. Taqman probe sastoje se od specifičnih oligonukleotida koji sadrže:
  1. Reportersku boju na 5' kraju probe. Jedna je proba označena VIC bojom za otkrivanje sekvence Alela 1, a druga je označena FAM bojom za otkrivanje sekvence Alela 2 (Tablica 1).

Tablica 1. Povezanost fluorescentnog signala sa sekvencom uzorka.

Fluorescentni signal	Genotip uzorka
VIC signal	Homozigot za Alel 1
FAM signal	Homozigot za Alel 2
VIC i FAM signali	Heterozigot

Sekvenca probe za SNP rs1042838:

GCTTGGCTTTCATTTGGAACGCCCA[A/C]TGGCTGTGGGAGAGCAACAGCATCC

Sekvenca probe za SNP rs1042839:

CAAATAACAGCATCTGCCCACTGAC[A/G]TGTTTGTAGGATCTCCATCCTAGAC

2. Nefluorescentni hvatač boje; NFQ (engl. *Non-fluorescent quencher; NFQ*) na 3' kraju probe.
3. Vezujući element za mali utor; MGB (engl. *Minor groove binder; MGB*) na 3' kraju.

Sastojci koji su bili potrebni za izvođenje genotipizacije su: 2x Taqman® Master Mix, 20x Assay Working, DNA uzorak i voda (Tablica 2) (17).

Tablica 2. Sastojci i njihovi volumeni potrebni za izvođenje genotipizacije.

Sastojak	Broj jažica: 96
2X Taqman® Master Mix	12,5 µl
20X Assay Working	1,25 µl
DNA uzorak + voda	11,25 µl
<b>Ukupni volumen u jažici</b>	<b>25 µl</b>

PCR u stvarnom vremenu odvijao se u tri koraka (Tablica 3) (17) .

Tablica 3. PCR protokol

Početna denaturacija	10 minuta na 95 °C
Denaturacija tijekom 40 ciklusa	15 sekundi na 95 °C
Sinteza tijekom 40 ciklusa	1 minuta na 60 °C

PCR koristi 5' nukleaznu aktivnost AmpliTaq Gold® DNA polimeraze za cijepanje Taqman proba. Tijekom PCR-a, uzvodne i nizvodne početnice hibridiziraju se na komplementarne sekvence duž denaturiranih lanaca DNA. Taqman probe hibridiziraju se specifično na komplementarnu sekvencu. Kada je proba netaknuta, blizina reporterske boje i boje za prigušivanje rezultira suzbijanjem reporterske fluorescencije, prvenstveno Försterovim prijenosom energije (17).

Tijekom polimerizacije, DNA polimeraza cijepa samo probe koje su se hibridizirale na ciljnu sekvencu. Cijepanje razdvaja reportersku boju od probe. Odvajanje reporterske boje od boje za prigušivanje rezultira povećanom fluorescencijom reporterske boje. Porast fluorescencijskog signala događa se samo ako je ciljana sekvenca komplementarna probi i ako je amplificirana tijekom PCR-a. Zbog ovih uvjeta, nespecifična amplifikacija nije detektirana, a fluorescentni signal pokazuje koji su aleli u uzorku (17).

### 4.4. Statističke metode

Upotrijebila se deskriptivna statistička obrada. Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim relativnim frekvencijama (%). Numerički su se podatci opisali aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučajevima koji su slijedili normalnu raspodjelu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni u programu MedCalc (inačica 16.2.0., MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija). Povezanost kategorijskih varijabli testirana je  $\chi^2$  testom. Povezanost normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirana je Studentovim t testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlika je statistički značajna ako je  $p < 0,05$ .

## REZULTATI

### 5. REZULTATI

I u kontrolnoj i ispitivanoj skupini majki i djece istražena su tri genotipa mutacija V660L i H770H. Genotipi mutacije V660L bili su: homozigot divljeg tipa (GG), heterozigot (TG) i homozigot mutant (TT). Genotipi mutacije H770H bili su: homozigot divljeg tipa (CC), heterozigot (TC) i homozigot mutant (TT). Ispitivane skupine majki i djece bile su podijeljene u kategorije prijevremenog poroda: Rani prijevremeni porod, umjereni prijevremeni porod i kasni prijevremeni porod.

U kontrolnoj skupini majki za mutaciju V660L najčešći genotip bio je homozigot divljeg tipa (GG). U svim kategorijama prijevremenog poroda najčešći genotip bio je također homozigot divljeg tipa (GG) (Tablica 4).

Tablica 4. Prikaz učestalosti genotipova mutacije V660L u kontrolnoj i ispitivanoj skupini majki prema vremenu poroda.

Aleli	Kontrolna skupina (n=50)	RPP* (n=8)	UPP† (n=11)	KPP‡ (n=31)
	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)
GG	38 (76)	5 (62,5)	10 (90,91)	20 (64,52)
TG	11 (22)	1 (12,5)	0 (0)	10 (32,26)
TT	1 (2)	2 (25)	1 (9,09)	1 (3,22)

\* Rani prijevremeni porod

† Umjereni prijevremeni porod

‡ Kasni prijevremeni porod

U kontrolnoj skupini djece za mutaciju V660L najčešći genotip bio je homozigot divljeg tipa (GG). U kategoriji ranog prijevremenog poroda najčešći genotip bio je heterozigot (TG), dok je u kategorijama umjerenog i kasnog prijevremenog poroda najčešći genotip bio homozigot divljeg tipa (GG) (Tablica 5).

## REZULTATI

Tablica 5. Prikaz učestalosti genotipova mutacije V660L u kontrolnoj i ispitivanoj skupini djece ovisno o vremenu rođenja.

Aleli	Kontrolna skupina (n=50)	RPP* (n=8)	UPP† (n=11)	KPP‡ (n=31)
	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)
GG	35 (70)	3 (37,5)	9 (81,82)	18 (58,07)
TG	12 (24)	5 (62,5)	2 (18,18)	11 (35,48)
TT	3 (6)	0 (0)	0 (0)	2 (6,45)

\* Rani prijevremeni porod

† Umjereni prijevremeni porod

‡ Kasni prijevremeni porod

Najčešći genotip mutacije H770H u kontrolnoj i ispitivanoj skupini majki bio je homozigot divljeg tipa (CC) (Tablica 6).

Tablica 6. Prikaz učestalosti genotipova mutacije H770H u kontrolnoj i ispitivanoj skupini majki ovisno o vremenu poroda.

Aleli	Kontrolna skupina (n=50)	RPP* (n=8)	UPP† (n=11)	KPP‡ (n=31)
	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)
CC	39 (78)	5 (62,5)	10 (90,91)	20 (64,52)
TC	10 (20)	1 (12,5)	0 (0)	11 (35,48)
TT	1 (2)	2 (25)	1 (9,09)	0 (0)

\* Rani prijevremeni porod

† Umjereni prijevremeni porod

‡ Kasni prijevremeni porod

U kontrolnoj skupini djece najčešći genotip mutacije H770H bio je homozigot divljeg tipa (CC). U kategoriji ranog prijevremenog poroda najčešći genotip bio je heterozigot (TC), a u kategorijama umjerenog i kasnog prijevremenog poroda najčešći genotip bio je homozigot divljeg tipa (CC) (Tablica 7).

## REZULTATI

Tablica 7. Prikaz učestalosti genotipova mutacije H770H u kontrolnoj i ispitivanoj skupini djece ovisno o vremenu rođenja.

Aleli	Kontrolna skupina (n=50)	RPP* (n=8)	UPP† (n=11)	KPP‡ (n=31)
	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)
CC	35 (70)	3 (37,5)	9 (81,82)	18 (58,07)
TC	12 (24)	5 (62,5)	2 (18,18)	11 (35,48)
TT	3 (6)	0 (0)	0 (0)	2 (6,45)

\* Rani prijevremeni porod

† Umjereni prijevremeni porod

‡ Kasni prijevremeni porod

Statistička analiza  $\chi^2$  testom pokazala je da nema povezanosti između mutacija V660L i H770H s prijevremenim porodom (Tablica 8).

Tablica 8. Prikaz majčinih i dječjih p vrijednosti za mutacije V660L i H770H.

Mutacija	P vrijednost	
	Majke	Djeca
V660L	0,5689	0,5583
H770H	0,8473	0,5583

Prosječne vrijednosti progesterona u kontrolnoj skupini majki pri porodu bile su unutar referentnih vrijednosti. Snižene prosječne vrijednosti progesterona pojavile su se samo u kategoriji ranog prijevremenog poroda ispitivane skupine (Tablica 9). Također, ne postoji veliko odstupanje u dobi između kontrolnih i ispitivanih majki (Tablica 10).

## REZULTATI

Tablica 9. Prikaz prosječnih vrijednosti progesterona za kontrolnu i ispitivanu skupinu majki.

	Kontrolna skupina	RPP†	UPP‡	KPP§
	Aritmetička sredina (standardna devijacija)	Medijan (granice interkvartilnog raspona)	Medijan (granice interkvartilnog raspona)	Medijan (granice interkvartilnog raspona)
Progesteron*	484,54 (192,28)	27,4 (15,86 – 97,02)	68 (36,45 – 332,72)	283,43 (45,57 – 471,23)

\* Referentne vrijednosti za progesteron pri terminskom porodu su 314,82 – 1087,56 nmol/L, a za preuranjeni porod iznose 50,18 – 467,46 nmol/L (18).

† Rani prijevremeni porod

‡ Umjereni prijevremeni porod

§ Kasni prijevremeni porod

Tablica 10. Prosječne vrijednosti dobi kontrolne i ispitivane skupine majki.

	Kontrola	RPP*	UPP†	KPP‡
Dob[aritmetička sredina (standardna devijacija)]	31,56 (5,35)	28,25 (7,17)	28,64 (5,78)	32,21 (5,95)

\* Rani prijevremeni porod

† Umjereni prijevremeni porod

‡ Kasni prijevremeni porod

U kontrolnoj skupini većina terminskih roditelja imale su normalnu razinu progesterona. U ispitivanoj skupini samo je u kategoriji umjerenog prijevremenog poroda većina roditelja imala normalnu razinu progesterona. U kategorijama ranog te kasnog prijevremenog poroda većina roditelja imala je sniženu razinu progesterona (Tablica 11).

Tablica 11. Prikaz apsolutne i relativne frekvencije kontrolnih i ispitivanih roditelja s obzirom na sniženu, normalnu ili povišenu razinu progesterona.

Razina progesterona	Kontrolna skupina (n=50)	RPP* (n=8)	UPP† (n=11)	KPP‡ (n=31)
	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)
Snižena	7 (14)	5 (62,5)	4 (36,36)	15 (48,4)
Normalna	43 (86)	3 (37,5)	7 (63,64)	8 (25,81)
Povišena	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (25,81)



## REZULTATI

\* Rani prijevremeni porod

† Umjereni prijevremeni porod

‡ Kasni prijevremeni porod

U kontrolnoj i ispitivanoj skupini nije bilo pothranjenih majki ( $< 18,5 \text{ kg/m}^2$ ). U kontrolnoj skupini gotovo jednako ima majki idealne te prekomjerne tjelesne mase. Većina ispitivanih roditelja imala je idealnu tjelesnu masu u kategoriji umjerenog prijevremenog poroda, dok je većina roditelja u kategorijama ranog te kasnog prijevremenog poroda bila prekomjerne tjelesne mase (Tablica 12).

Tablica 12. Prikaz apsolutne i relativne frekvencije indeksa tjelesne mase kontrolnih majki i majki ispitnica s obzirom na vrijeme poroda.

Indeks tjelesne mase	Kontrola majke (n=50)	RPP* (n=8)	UPP† (n=11)	KPP‡ (n=31)
	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)	Apsolutna frekvencija (relativna frekvencija %)
Idealna tjelesna masa (18,5 – 24,9 $\text{kg/m}^2$ )	20 (40)	2 (25)	6 (54,55)	12 (38,71)
Prekomjerna tjelesna masa (25 – 29,9 $\text{kg/m}^2$ )	19 (38)	4 (50)	3 (27,27)	17 (54,84)
Pretilost (30 $\text{kg/m}^2 >$ )	11 (22)	2 (25)	2 (18,18)	2 (6,45)

\* Rani prijevremeni porod

† Umjereni prijevremeni porod

‡ Kasni prijevremeni porod

Statističke analize pokazale su da nema povezanosti između dobi, indeksa tjelesne mase i vrijednosti razine progesterona s prijevremenim porodom (Tablica 13).

## REZULTATI

Tablica 13. Prikaz p vrijednosti ostalih rizičnih čimbenika na prijevremeni porod: Dob, indeks tjelesne mase i razina progesterona.

Obilježje	P vrijednost
Dob majki* †	0,4814
Indeks tjelesne mase majki‡	0,7303
Razina progesterona majki‡	0,8668

\* Nedostaju dva podatka u ispitivanoj skupini majki.

† Studentov t test

‡  $\chi^2$  test

## 6. RASPRAVA

U ovom radu istraživala se povezanost PROGINS mutacija, odnosno V660L i H770H, sa spontanim prijevremenim porodom. Statističkom analizom odgovarajućim testovima u programu MedCalc (inačica 16.2.0., MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija) pokazalo se da ne postoji povezanost između mutacija V660L i H770H sa spontanim prijevremenim porodom. Za dob i indeks tjelesne mase također se pokazalo da nemaju utjecaj na spontani prijevremeni porod. Potrebno je spomenuti da se ovo istraživanje provodilo na malom broju uzoraka te da bi se rezultati vjerodostojnije prikazali na većem broju uzoraka.

U Meksiku je provedeno ispitivanje u kojem su kao uzorke upotrijebili placentalu DNA 64 pacijentice koje su imale prijevremeni porod i 54 pacijentice kontrolne skupine. DNA je genotipizirana na 4 polimorfizma, V660L, H770H, PROGINS alele i +331G/A metodom PCR. Hi-kvadrat test i t test korišteni su za izračunavanje statističke značajnosti. Neravnoteža veze izračunata je korištenjem programa *Linkage Disequilibrium Analyzer*. P vrijednost za polimorfnu varijantu V660L iznosila je 0,271, a za H770H 0,181. Ovo istraživanje sugerira da navedeni polimorfizmi gena receptora za progesteron nisu povezani s povećanim rizikom prijevremenog poroda u meksičkoj populaciji (19).

U istraživanju provedenom u SAD-u, DNA je izdvojena u pacijentica s prijevremenim porodom ( $n = 78$ ) i pacijentica koje su činile terminske kontrole ( $n = 415$ ). Genotipizacija je obavljena za tri SNP-a (+331 [G > A], +770 [C > T], +660 [G > T]) pomoću MALDI-MS. Podatci su analizirani hi-kvadrat testom i logističkom regresijskom analizom. Majčini aleli +660 G/T ili +660 T/T nisu bili povezani s povećanim rizikom od spontanog prijevremenog poroda ( $p = 0,92$ ). Međutim, postojanje polimorfizma V660L bilo je značajno povezano s povećanim rizikom za prijevremeni porođaj kod žena s BMI < 18,5 kg / m<sup>2</sup> ( $p = 0,02$ ), ali ne i u žena s BMI  $\geq$  18,5 kg / m<sup>2</sup>. Postojanje polimorfizma +770 C/T ili +770 T/T nije pokazalo povećani rizik od prijevremenog poroda u usporedbi s +770 CC ( $p = 0,67$ ). Međutim, majčin polimorfizam H770H povezan je sa značajno povećanim rizikom za prijevremeni porod kod žena s BMI < 18,5 kg / m<sup>2</sup> ( $p = 0,02$ ), aline u žena s BMI  $\geq$  18,5 kg/m<sup>2</sup> (20). U našem istraživanju nitko od roditelja nije imao BMI < 18,5 kg/m<sup>2</sup>, a sveukupno gledano BMI nije statistički značajan ( $p = 0,7303$ ) te nije povezan s prijevremenim porodom.

## RASPRAVA

Na Sveučilištu Iowa ispitanici su bili prerano rođena dojenčad. DNA je prikupljena od majke, novorođenčeta i oca. Od ukupno 440 nedonoščadi, 312 je rođeno kao jednorodeno, a ostatak je rezultat trudnoće s višestrukim plodom (103 blizanke i 25 trojki /četvorki). Trojke i četvorkke isključene su iz analize, čime je 415 novorođenčadi uključeno u ovu analizu. Jednorodne trudnoće analizirane su odvojeno od višeplođnih (blizanačkih) trudnoća. Jedno slučajno odabrano novorođenče odabrano je između parova blizanaca radi uključivanja u bilo koju genetsku analizu koja je koristila blizance, tako da je samo jedno novorođenče dalo podatke o genotipu. U našem su istraživanju blizanci isključeni iz analize. DNA je izolirana iz krvi pupčane vrpce za novorođenčad rođenu u dječjoj bolnici na Sveučilištu Iowa, ili iz odbačene krvi ili bukalnog brisa za novorođenčad koja je prebačena u bolnicu. Za prikupljanje roditeljske DNA uzeli su uzorke venske krvi ili bukalni bris pomoću standardnih protokola. Ispitano je 17 pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama (SNP) i varijanta insercije/delecije u PGR u 415 obitelji. Rezultati su zatim analizirani pomoću testova neravnoteže i analize temeljene na log-linearnom modelu. DNA sekvenciranje PGR gena također je provedeno kod 92 majke nedonoščadi. Nekoliko funkcionalnih varijanti PGR-a bilo je ili testirano u ovom istraživanju (PROGINS Alu insercija) ili su bile u potpunoj veznoj neravnoteži s SNP-om koji je testiran [varijanta V660L (rs1042838) je u potpunoj neravnoteži s rs1042839 testiranom u ovom istraživanju (mutacija H770H)]. Od četiri SNP-a koja pokazuju  $p < 0,05$  u fetalnom ili majčinskom istraživanju učinjenom ovdje, dva, koja pokazuju značajnu razliku u majci (rs653752 i rs503362), u potpunoj su neravnoteži s V660L i PROGINS insercijom, što sugerira da ove varijante mogu pružiti etiološki mehanizam na kojem se temelji ispitivanje promatrano ovdje (21).

Istraživanja iz Meksika (19) i SAD-a (20) pokazala su da ne postoji povezanost između prijevremenog poroda i PROGINS mutacije. Istraživanje u SAD-u moglo bi se izdvojiti jer su ipak dobili statistički značajnu razliku za žene s BMI  $< 18,5$  kg/m<sup>2</sup>. U našem istraživanju nijedna roditeljica nije imala BMI  $< 18,5$  kg/m<sup>2</sup>, a  $p$  vrijednost nije bila statistički značajna. S druge strane, ispitivanje koje je provelo Sveučilište u Iowi (21) pokazalo je da postoji povezanost između H770H i V660L varijanti polimorfizma s prijevremenim porodom.

### 7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Ne postoji povezanost između polimorfne varijante PROGINS-a V660L i prijevremenog poroda na ispitivanoj populaciji koju su činile roditelje s Klinike za ginekologiju i opstetriciju KBC-a Osijek te njihova djeca.
- Ne postoji povezanost između polimorfne varijante PROGINS-a H770H i prijevremenog poroda na ispitivanoj populaciji koju su činile roditelje s Klinike za ginekologiju i opstetriciju KBC-a Osijek te njihova djeca.
- BMI nije rizični čimbenik za prijevremeni porod u ovom istraživanju.
- Dob nije rizični čimbenik za prijevremeni porod u ovom istraživanju.

U ovom istraživanju nije se uspjela dokazati povezanost između PROGINS mutacija V660L i H770H i prijevremenog poroda. Ključni čimbenik mogao bi biti i mali broj uzoraka na kojima se obavljalo istraživanje. Zbog multifaktorijalne prirode prijevremenog poroda, nije moguće isključiti ulogu genetike jer postoje i drugi povezani polimorfizmi koji bi mogli različito utjecati na porod.

### 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Dokazati da su točkaste mutacije u egzonima 4 i 5 (V660L i H770H) gena za progesteronski receptor rizični čimbenici za prijevremeni porod.

**Ustroj studije:** Retrospektivno istraživanje genetičkih varijacija u genu za progesteronski receptor koje mogu dovesti do prijevremenog poroda.

**Ispitanici i metode:** Istraživanje je provedeno na roditeljama s Klinike za ginekologiju i opstetriciju KBC-a Osijek i njihovoj djeci. Skupljeno je 200 uzoraka. 100 uzoraka činilo je kontrolne skupine koje su se sastojale od terminskih trudnica (n = 50) i njihove djece (n = 50). 100 uzoraka činilo je ispitivane skupine u kojima su bile pretermalne trudnice (n = 50) i njihova djeca (n = 50). Pretermalne roditelje podijeljene su u sljedeće skupine: rani prijevremeni porodi (prije 28. gest. tjedna), umjereni prijevremeni porodi (28. - 32. gest. tjedan) te kasni prijevremeni porodi (32. - 37. gest. tjedan). Prvi korak u istraživanju bila je izolacija DNA pomoću komercijalnog kita NucleoSpin Blood iz uzoraka venske krvi majki i krvi iz pupčane vrpce djece. Drugi korak bila je genotipizacija DNA pomoću PCR-a u stvarnom vremenu prema protokolu Taqman SNP Genotyping Assay na uređaju Applied Biosystems. Upotrijebila se deskriptivna statistička obrada. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni u programu MedCalc (inačica 16.2.0., MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija).

**Rezultati:** Ispitivane mutacije V660L i H770H nemaju statističku značajnost za prijevremeni porod. Isto vrijedi za dob i BMI.

**Zaključak:** Istraživanje je pokazalo da mutacije V660L i H770H nisu rizični čimbenici za prijevremeni porod na ispitivanoj populaciji. Dob i BMI također nisu rizični čimbenici za prijevremeni porod.

**Ključne riječi:** Mutacija; Polimorfizam; Prijevremeni porod; Progesteron; Progesteronski receptor A; Progesteronski receptor B.

## SUMMARY

### 9. SUMMARY

**Title:** The influence of point mutations in exon 4 and 5 (V660L and H770H) of the progesterone receptor gene on the risk for premature delivery.

**Objectives:** To prove that point mutations in exons 4 and 5 (V660L and H770H) of the progesterone receptor gene are risk factors for preterm delivery.

**Study design:** A retrospective study of genetic variations in the progesterone receptor gene that may lead to preterm birth.

**Participants and methods:** The study was conducted on postnatal mothers and their children at the Clinic for Gynaecology and Obstetrics of the Clinical Hospital Center Osijek. A total of 200 samples were collected. A 100 of them constituted control groups consisting of term mothers (n = 50) who gave birth spontaneously and their children (n = 50). The other 100 samples comprised the study groups consisting of preterm mothers (n = 50) and their children (n = 50). Preterm births were divided into the following groups: early preterm births (before 28th gestational week), moderate preterm births (28th - 32nd gestational weeks) and late preterm births (32nd - 37th gestational weeks). The first step in the study was DNA isolation using a commercial NucleoSpin Blood kit from maternal venous blood and from children blood samples from the umbilical cord. The second step was DNA genotyping using real-time PCR according to the TaqMan SNP Genotyping Assay protocol on an Applied Biosystems device. Descriptive statistical processing was performed. The obtained results were statistically processed in MedCalc (version 16.2.0., MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium).

**Results:** The tested V660L and H770H mutations have no statistical significance for premature birth. Also, age, BMI and p4 have no statistical significance.

**Conclusion:** The study showed that the V660L and H770H mutations are not risk factors for preterm birth in the study population. Age and BMI are also not risk factors for premature birth.

**Keywords:** Mutation; Polymorphism; Premature Birth; Progesterone; Progesterone receptor A; Progesterone receptor B.

## 10. LITERATURA

1. Kadivnik M, Muller A, Milić Vranješ I, Šijanović S, Wagner J. PROGINS Mutation of Progesterone Receptors and Its Role in Premature Birth – An Overview. *SEEMEDJ*. 2017;1(2):55-70.
2. Blencowe H, Cousens S, Chou D, Oestergaard M, Say L, Moller AB i sur. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health*. 2013;10(Dodatak 1):S2.
3. WHO. Preterm birth. Dostupno na adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>  
Datum pristupa: 10. 07. 2019.
4. Menon R. Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: Etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. *Acta Obstetricia et Gynecologica*. 2008; 87:590-600.
5. Sheikh IA, Ahmad E, Jamal MS, Rehan M, Assidi M, Tayubi IA i sur. Spontaneous preterm birth and single nucleotide gene polymorphisms: a recent update. *BMC Genomics*. 2016;17(Dodatak 9):759.
6. WHO. Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth. Dostupno na adresi: [https://www.who.int/pmnch/media/news/2012/201204\\_borntooosoon-report.pdf](https://www.who.int/pmnch/media/news/2012/201204_borntooosoon-report.pdf). Datum pristupa: 22. 07. 2019.
7. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova Medicinska biokemija. Treće izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. pog 14. str. 337-338.
8. Patel B, Elguero S, Thakore S, Dahoud W, Bedaiwy M, Mesiano S. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Hum Reprod Update*. 2015; 21(2):155-73.
9. Wetendorf M, DeMayo FJ. Progesterone receptor signaling in the initiation of pregnancy and preservation of a healthy uterus. *Int J Dev Biol*. 2014;58(2-4):95-106.
10. Huang P, Chandra V, Rastinejad F. Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:247-72.
11. Chen R, Yu Y, Dong X. Progesterone receptor in the prostate: A potential suppressor for benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2017; 166:91-96.



## LITERATURA

12. Swaggart KA, Pavlicev M, Muglia LJ. Genomics of Preterm Birth. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5:023127.
13. Romano A, Delvoux B, Fischer DC, Groothuis P. The PROGINS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. *J Mol Endocrinol.* 2008;38:331-350.
14. Kuon RJ, Abele H, Berger R, Garnier Y, Maul H, Schleussner E i sur. Progesterone for Prevention of Preterm Birth – Evidence-based Indications. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2015; 219:125-135.
15. Machery-Nagel. NucleoSpin® Blood. Dostupno na adresi: [https://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM\\_gDNABlood.pdf](https://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM_gDNABlood.pdf). Datum pristupa: 30. 07. 2019.
16. Genetic Education. Proteinase K DNA extraction method. Dostupno na adresi: <http://geneticeducation.co.in/proteinase-k-dna-extraction-method/>. Datum pristupa: 30. 07. 2019.
17. Thermo Fischer Scientific. TaqMan® SNP Genotyping Assays USER GUIDE. Dostupno na adresi: [https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0009593\\_TaqManSNP\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0009593_TaqManSNP_UG.pdf). Datum pristupa: 30. 07. 2019.
18. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Spong CY, Dashe JS, Hoffman BL i sur. *Williams Obstetrics*. 24 izd. New York: McGraw-Hill Education; 2014.
19. Diaz-Cueto L, Dominguez-Lopez P, Cantillo-Cabarcas J, Perez-Figueroa G, Arechavaleta-Velasco M, Arechavaleta-Velasco F. Progesterone receptor gene polymorphisms are not associated with preterm birth in a Hispanic population. *Int J Gynaecol Obstet.* 2008; 103(2):153-7.
20. Guoyang L, Morgan T, Bahtiyar MO, Snegovskikh VV, Schatz F, Kuczynski E i sur. Single nucleotide polymorphisms in the human progesterone receptor gene and spontaneous preterm birth. *Reprod Sci.* 2008;15(2):147-55.
21. Ehn NL, Cooper ME, Orr K, Shi M, Johnson MK, Caprau D i sur. Evaluation of fetal and maternal genetic variation in the progesterone receptor gene for contributions to preterm birth. *Pediatr Res.* 2007;62(5):630-5.

# ŽIVOTOPIS

## 11. ŽIVOTOPIS

### Opći podatci:

- Ime i prezime: Ines Krstanović
- Datum i mjesto rođenja: 03. 09. 1997., Osijek
- Adresa: Ulica Franje Račkog 16b, 31431 Čepin

### Obrazovanje:

- 2016. – danas Preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike, Osijek
- 2012. – 2016. 1. gimnazija Osijek, Osijek

### Akadska članstva:

- 2019. – danas Član Studentskog zbora Medicinskog fakulteta Osijek
- 2019. – danas Član Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta Osijek