

# Uloga +331 G/A mutacije progesteronskih receptora kod majki i djece na pojavnost prijevremenog poroda

---

**Bebek, Davorka**

**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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:921450>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-25**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET U OSIJEKU**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Davorka Bebek**

**ULOGA +331 G/A MUTACIJE  
PROGESTERONSKIH RECEPTORA  
KOD MAJKI I DJECE NA POJAVNOST  
PRIJEVREMENOG PORODA**

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET U OSIJEKU**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Davorka Bebek**

**ULOGA +331 G/A MUTACIJE  
PROGESTERONSKIH RECEPTORA  
KOD MAJKI I DJECE NA POJAVNOST  
PRIJEVREMENOG PORODA**

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je ostvaren u Laboratoriju za medicinsku genetiku pri Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

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

Rad ima 30 listova i 10 tablica.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Jasenki Wagner Kostadinović na pomoći i sugestijama tijekom izrade završnog rada.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1. 1. KATEGORIJE I POSLJEDICE PREURANJENOG PORODA.....	1
1. 2. RIZIČNI ČIMBENICI .....	2
1. 2. 1. Genetski čimbenici .....	3
1. 3. ENDOKRINI SUSTAV I POVEZANI GENSKI POLIMORFIZMI .....	4
1. 3. 1. Progesteron i njegova uloga u preuranjenom porodu .....	4
1. 3. 2. Progesteronski receptori.....	5
1. 4. PREVENCIJA PREURANJENOG PORODA.....	6
2. HIPOTEZA .....	7
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	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 polimerazom u stvarnom vremenu .....	10
4. 4. STATISTIČKE METODE .....	13
5. REZULTATI.....	14
5. 1. PRIKAZ APSOLUTNE I RELATIVNE FREKVENCije ALELA.....	14
5. 2. ANALIZA MUTACIJE.....	15
5. 3. INDEKS TJELESNE MASE (BMI) I DOB TRUDNICA KOJE SU RODILE PRIJEVREMENO .....	15
5. 4. ANALIZA MUTACIJE S OBZIROM NA VRIJEME PORODA .....	17
5. 5. PROGESTERON I PRIJEVREMENI POROD.....	17
6. RASPRAVA .....	19
7. ZAKLJUČAK .....	23
8. SAŽETAK .....	24
9. SUMMARY .....	25
10. LITERATURA .....	26
11. ŽIVOTOPIS .....	30

## POPIS KRATICA

PPROM – prijevremena preuranjena ruptura membrana (engl. *preterm premature rupture of membranes*)

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)

OXTR – receptor za oksitocin

*RLN2* – gen relaksin 2

FSHR – receptor za folikul stimulirajući hormon

PTGDR – prostaglandinski D receptor

IGF1R – tip 1 receptor faktora rasta sličnog inzulinu

IGFBP3 – faktor rasta sličan inzulinu protein 3

P4 – progesteron

PGR – progesteronski receptor

ISH – „*Isoform switch hipoteza*“

17 OHP-C – 17 - alfa hidroksiprogesteron kaproat

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

Real-Time PCR – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

MGB – fluorescentno obilježena proba (engl. *minor groove binder*)

NFQ – ne-fluorescentno obilježeni *quencher* (engl. *non fluorescent quencher*)

wt – divlji tip (engl. *wild type*)

mt – mutirani tip (engl. *mutant*)

SDS – engl. *Sequence detection system*

FRET – fluorescentni rezonantni prijenos energije (engl. *fluorescence resonance energy transfer*)

UNG – uracil-N-glikozilaza

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



## 1. UVOD

Prijevreteni je porod još uvijek jedan od najvećih problema u obstetriciji i najviše doprinosi neonatalnom mortalitetu i morbiditetu na globalnoj razini, čineći 70 % ukupne neonatalne smrtnosti (1). Definira se kao rođenje između 22. i 37. tjedna gestacije i prema gestacijskoj dobi dijeli se na ekstremno preuranjeni porod (između 24. i 28. tjedna gestacije), rani preuranjeni porod (između 28. i 34. tjedna gestacije) i kasni preuranjeni porod (između 34. i 37. tjedna gestacije) (2). Više od 60 % prijevremenih poroda javlja se u Africi i Južnoj Aziji. U zemljama s nižim dohotkom se u prosjeku prijevremeno rađa 12 % beba, dok se u bogatijim zemljama rađa njih 9 %. Siromašnije obitelji izložene su većem riziku (3). U 2010. godini bilo je oko 15 milijuna prijevremenih poroda u svijetu. U istom razdoblju u Hrvatskoj postotak prijevremenih poroda iznosio je između 5,19 % i 7,88 % svih rođenih, s tendencijom povećanja od 2008. godine (2).

### 1. 1. KATEGORIJE I POSLJEDICE PREURANJENOG PORODA

Otprilike jedna od deset beba rođena je prijevremeno. Etiologija spontanog prijevremenog poroda ima mnogo čimbenika i još uvijek ostaje uglavnom nepoznata. Nadalje, prevalencija prijevremenog poroda varira među etničkim skupinama i ova varijabilnost pripisuje se genetskim i ekološkim čimbenicima zajedno s genetskim čimbenicima majke koji čine do 20 % rizika za razvoj prijevremenog poroda (4). Prijevremeni porod rezultat je triju kliničkih stanja: medicinski potaknuto (jatrogeno) prijevremeno rođenje, prijevremena preuranjena ruptura membrana (engl. *PPROM*) i spontani (idiopatski) prijevremeni porod. Medicinski inducirani prijevremeni porod u odsutnosti *PPROM*-a ili spontani prijevremeni porod javlja se u oko 25 % svih prijevremenih poroda (5). Medicinski potaknuti prijevremeni porod radi se da bi se spasila majka ili dijete, osobito tijekom komplikacija u trudnoći kao što su preeklampsija, gestacijski dijabetes, fetalni stres, bubrežna bolest, neobjašnjeno krvarenje iz vagine, Rh senzibilizacija, kongenitalne malformacije, placenta previa i abrupcija posteljice (4). *PPROM*, nakon čega slijedi preuranjeni porod, čini 25 % svih prijevremenih poroda. To se stanje događa češće u siromašnoj populaciji i među afroameričkim ženama. Infekcija se obično smatra glavnim uzrokom *PPROM*-a. Spontani ili idiopatski prijevremeni porodi čine najmanje 50 % svih prijevremenih poroda. Rizični čimbenici uključuju pozitivnu obiteljsku anamnezu, društvene čimbenike i način života (5). Nedavne studije otkrile su da su bebe rođene prijevremeno, dugoročno ugrožene i povećan im je rizik od smrtnosti u ranim godinama odrasle dobi. Također, skloniji su smrtnosti u dobi od 18 do 36 godina zbog kardiovaskularnih, endokrinih i respiratornih problema. Posljedice prijevremenog poroda

moгу se čak osjetiti u sljedećim generacijama jer je manje vjerojatno da će djeca rođena prijevremeno imati potomstvo. Žene rođene prije vremena imaju povećane šanse za prijevremeni porod i tako nastavljaju začarani krug neonatalne smrtnosti i morbiditeta (6).

## 1. 2. RIZIČNI ČIMBENICI

Etiologija prijevremenog poroda nije u potpunosti jasna. Smatra se da je to multifaktorijalni, složeni poremećaj koji uključuje fizio-patološke, genetske i okolišne čimbenike (7). Nedostatak željeza, folne kiseline i vitamina D tijekom trudnoće može povećati rizik za prijevremeni porod. Također, etnicitet značajno pridonosi riziku prijevremenog poroda. Palomer i sur. izvijestili su o povećanom riziku od prijevremenog porođaja ako je majka europska Amerikanka, a otac je Afroamerikanac. Afroamerikanke, za razliku od europskih Amerikanki češće boluju od anemije tijekom trudnoće. Afroamerikanke su također sklonije imati niže koncentracije folata u serumu i crvenim krvnim stanicama te imaju veći nedostatak vitamina D u usporedbi s europskim Amerikankama (8). Mnogi čimbenici povećavaju rizik prijevremenog poroda, a veći dio njih jesu bihevioralni i sociodemografski. Pod većim su rizikom žene nižeg socio-ekonomskog statusa, nižeg stupnja obrazovanja i žene mlađe životne dobi. Pušenje, konzumacija alkoholnih pića, uzimanje droga, anksioznost i depresija povećavaju mogućnost prijevremenog poroda. Višestruke trudnoće i prethodna povijest prijevremenog poroda također su čimbenici rizika. Oko 40% blizanačkih trudnoća ima duljinu trudnoće kraću od 37 tjedana te gotovo sve višestruke trudnoće završavaju prijevremeno (6). U medicinske razloge ubrajaju se stanja koja zahvaćaju majku i/ili dijete. Kritična stanja majke uključuju: ektrauterine infekcije, klinički korioamnionitis, traume poput ozljeda, rana ili šoka, ruptura uterusa, preeklampsija i eklampsija. S druge strane, intrauterina smrt fetusa i ograničeni rast, abnormalni otkucaji srca ili fiziologija fetusa, infekcije te višestruke trudnoće mogu potaknuti porod prije vremena (9). Sve više zagađivača okoliša i ksenobiotici postaju važni čimbenici preuranjenog poroda (npr. bisfenol A) kao i okoliš temeljen na plastici. Nadalje, drugi važan čimbenik povezan s preuranjenim porodom je zagađenje zraka sumpornim dioksidom. Život u blizini elektrana na ugljen također povećava rizik, što je zabilježeno i u Hrvatskoj. Žene koje žive u blizini nafte, petrokemijske industrije i brodogradnje u Kini imaju povećan rizik od preuranjenog poroda. Uobičajeni biološki putovi koji igraju važnu ulogu u patogenezi preuranjenog poroda su infekcija i upala, aktivacija nadbubrežne žlijezde majke ili fetusa, decidualni defekti i patološka stanja maternice. Mikrobiološke infekcije su glavni čimbenik rizika i to može biti posljedica sistemske intrauterine infekcije ili infekcije donjeg dijela genitalnog trakta. Prema

nekim konzervativnim procjenama, mikrobna intrauterina infekcija iznosi oko 25 – 40 % prijevremenih poroda. Endotoksini dovode do proizvodnje prostaglandina koji stimuliraju kontraktilnost maternice, što dovodi do preuranjenog poroda. Procjenjuje se da se samo u 50 % slučajeva zna točan uzrok prijevremenog poroda, u ostalim slučajevima etiologija ostaje nepoznata (6).

### 1. 2. 1. Genetski čimbenici

Jedan je od najvećih čimbenika rizika za preuranjeni porod osobna ili obiteljska anamneza, a istraživanja su pokušala kvantificirati koliko se varijacija spontanog prijevremenog poroda može pripisati genetskim razlikama. Kako majka tako i fetus ima aktivnu ulogu u procesu rađanja. Studije tvrde da je doprinos majčinskog genoma prijevremenom porodu pokazao da postoji rizik ponovnog pojavljivanja prijevremenog poroda kod potomaka rođenih prerano da i oni sami imaju preuranjeni porod. Prema tome, one tvrde da se rizik prenosi prvenstveno kroz majčinski genom, uz minimalni doprinos fetalnog genoma. Majčin i fetalni genom dijele otprilike 50 % sličnosti u sekvencama i može biti teško razlikovati učinke majčinskih gena i učinak gena naslijeđenih od majke (10). Fetalni geni čine samo mali dio ukupnog broja varijacija u prijevremenom porodu. Fetalni geni mogu biti važni za inducirani, ali ne i spontani, prijevremeni porod (11). Osim prethodnih prijevremenih poroda u anamnezi žene, povijest preuranjenog poroda njezine majke, sestre ili polusestre također značajno povećava rizik (12). Mnogo je vjerojatnije da je rizik ponavljanja proširen među mnoge gene tako da su relativni rizici povezani s pojedinačnim genima vrlo mali. Ti geni pojedinačno možda nemaju važan utjecaj, ali njihova identifikacija može pridonijeti razumijevanju mehanizama prijevremenog poroda (13). Kao i s drugim složenim bolestima mehanizmi koji dovode do preuranjenog poroda vjerojatno uključuju niz gen-gen i gen-okoliš interakcija. Majčin genom može doprinijeti čak 34 % u varijacijama preuranjenog poroda. Očev genetski utjecaj, s druge strane, nije značajan. Studija koju je proveo Li pokazala je da mijenjanje oca djeteta između trudnoća povećava rizik za prijevremeni porod. Slično tome, Palomar i sur. upućuju na to da očev genom utječe na trajanje trudnoće i povećava rizik ako je majka bjelkinja, a otac Afroamerikanac, čak i ako se oduzmu ostali sociodemografski čimbenici (14). Kontrola vremena rođenja uključuje mnogo faktora, a uobičajeni polimorfizmi uključeni u gestacijsku dužinu ili rizik prijevremenog poroda pojedinačno imaju mali utjecaj (15).

### 1. 3. ENDOKRINI SUSTAV I POVEZANI GENSKI POLIMORFIZMI

Ljudska trudnoća ovisi o koordiniranoj sintezi, izlučivanju i međudjelovanju hormona fetusa, majke i posteljice (6). Maternica prolazi kroz opsežne strukturne i funkcionalne prilagodbe tijekom trudnoće. Da bi se prilagodio fetalnom rastu, miometrij proširuje svoju veličinu kroz hiperplaziju i hipertrofiju glatkih mišićnih stanica u različitim fazama. Funkcionalno, dok miometrij ostaje miran tijekom trudnoće, upalni odgovori na vrijeme stimuliraju koordiniranu kontrakciju radi porođaja. U postporođajnom stadiju javlja se involucija maternice i njezina se veličina vraća u fazu prije trudnoće koja je ponovno spremna za trudnoću. Neregulirana funkcionalna prilagodba može dovesti do preranog porođaja i naknadnog prijevremenog poroda (16). Nekoliko važnih hormona uključeno je u proces poroda. Oksitocin uzrokuje kontrakcije miometrija i pomaže u sazrijevanju vrata maternice. Nedavno su neke studije izvijestile o povezanosti polimorfizama *OXTR* gena s rizikom prijevremenog poroda. Pokazalo se da su dva uobičajena SNP-a *OXTR*-a (rs4686302, rs237902) očigledno povezana s preuranjenim porodom. Relaksin je važan hormon koji sudjeluje u omekšavanju pubične simfize i remodeliranju kolagena tijekom trudnoće. Povećana ekspresija intrauterinog relaksina pojavljuje se kod žena s PPRM-om. Rizik od preranjenog poroda visok je kod majki koje imaju homozigotnost rijetkih alela (rs10115467 i rs4742076) u genu relaksin 2 (*RLN2*). Kod finskih su i afroameričkih majki SNP-ovi u receptoru za folikul stimulirajući hormon (FSHR) bili povezani s prijevremenim porodom. Polimorfizmi u genu za prostaglandinski D receptor (PTGDR) također povećavaju rizik od prijevremenog poroda u žena. Polimorfizam, kod tipa 1 receptora faktora rasta sličnog inzulinu (IGF1R) u fetusa i vezanje faktora rasta sličnog inzulinu protein 3 (IGFBP3) kod majke, također je povećao rizik od prijevremenog poroda (6). Mutacije se u progesteronskom receptoru također dovode u vezu s preuranjenim porodom.

#### 1. 3. 1. Progesteron i njegova uloga u preuranjenom porodu

Progesteron (P4), steroidni hormon, uglavnom se proizvodi u jajnicima, placenti, mozgu i nadbubrežnoj žlijezdi, a potreban je za održavanje trudnoće. Uključen je u ženski menstrualni ciklus, trudnoću i genezu embrija većine sisavaca. Stimulira i regulira razne funkcije, pomaže u pripremi tijela za začecje i trudnoću, djeluje kao protuupalno sredstvo i regulira imunološki odgovor, razinu estrogena i tako sprječava rak endometrija (17). Progesteron je nužan za uspostavljanje i održavanje trudnoće, a njegovo povlačenje glavni je povod za porođaj (18). Kod mnogih vrsta pad progesterona u majčinom serumu (povlačenje progesterona) događa se prije spontanog poroda (19). Upotreba životinjskih modela za

proučavanje događaja do rođenja pružio je značajan uvid u mehanizme koji reguliraju porod, onaj na vrijeme i prijevremeni (20). Povlačenje progesterona je okidač za porod u viviparnih vrsta. U većini životinja rođenju prethodi smanjenje razine progesterona u cirkulaciji posredovano hormonalnim interakcijama koje inhibiraju proizvodnju progesterona u placenti ili žutom tijelu. Porodaj kod žena, događa se bez smanjenja progesterona, iako su stanice miometrija izložene visokim razinama progesterona. To upućuje na to da ljudsko rođenje ne zahtijeva povlačenje progesterona. Međutim, liječenje trudnica s antagonistima progesterona u bilo kojoj fazi trudnoće, može pokrenuti porodaj što sugerira da se porod u ljudi može potaknuti funkcionalnim, a ne nužno sistemskim povlačenjem progesterona (21). Sustavne razine P4 ne padaju prije poroda u ljudi i viših primata što sugerira da možda neki alternativni mehanizam inducira upalu (22).

### 1. 3. 2. Progesteronski receptori

Progesteronski su receptori članovi superobitelji receptora steroidnih hormona ligand-ovisnih transkripcijskih faktora (23). Glavni ciljevi progesterona su stromalne i epitelne stanice u endometriju, stanice glatkih mišića u miometriju, fibroblasti te žljezdane stanice u cerviksu. Identificirane su dvije skupine progesteronskih receptora: nuklearni, koji funkcioniraju kao ligandom – aktivirani transkripcijski faktori i posreduju genomski djelovanja te obitelj progesteronskih receptora koji se nalaze na površini stanice i strukturno su povezani s G-proteinskim receptorima i pojedinačnim transmembranskim receptorima posredujući izravnom ne-genomskom djelovanju progesterona. Ljudski su nuklearni progesteronski receptori kodirani jednim genom (PGR) koji se nalazi na kromosomu 11 (11q22-q23). Ekspresiju tog gena kontroliraju dva promotora te proizvode dva glavna mRNA transkripta koji kodiraju dva proteina: PR-A i PR-B. DNA vezna domena i domena vezanja liganda identične su u PR-A i PR-B, a razlika između dva receptora je u regulatornoj N-terminalnoj domeni koja je skraćena za 164 aminokiseline u PR-A (24). Uloga receptora PR-B jest da je on transkripcijski aktivator gena koji sudjeluju u održavanju trudnoće, a PR-A potiskuje aktivnost PR-B. Ovo opažanje dovelo je do formiranja tzv. "*Isoform switch hipoteze*" (ISH). Hipoteza predlaže da povećanje relativnog PR-A nasuprot PR-B vodi do potiskivanja PR-B i smanjuje transkripciju gena koji održavaju trudnoću, odnosno pripremaju maternicu za porod. Uobičajena varijanta ljudskog progesteronskog receptora je PROGINS alel. PROGINS alel prisutan je u nekim populacijama u frekvenciji većoj od 20 %. Pokazalo se da PROGINS utječe na trudnoću i porod ili direktno putem osjetljivosti na progesteron ili indirektno povećava rizika za stanja povezana s preuranjenim porodom (22). Tijekom

proteklog desetljeća identificirano je nekoliko SNP-ova u PGR genu; mnogi su nedosljedni, ali neki su povezani s rizikom od razvoja karcinoma dojke, endometrija, debelog crijeva i endometrioze. SNP-ovi se pojavljuju u egzonima i u promotorskoj regiji gena za koje se smatra da mijenjaju ekspresiju receptora (25). +331 G/A SNP progesteronskog receptora je novootkrivena mutacija. Ovaj polimorfizam mijenja G u A na položaju +331 promotorske regije, što mijenja ili funkciju ili ekspresiju progesteronskog receptora. To rezultira uvođenjem TATA-kutije, koja isključivo pojačava transkripciju PR-B čime se povećava omjer u korist PR-A (26). Moguća važnost te mutacije je da smanjuju transkripcijsku regulaciju progesteronskih ciljnih gena što dovodi do promjene signalnih putova i prijevremenog poroda (2). +331 G/A polimorfizam povezan je s rakom ženskog reproduktivnog sustava, iako točan mehanizam još uvijek nije poznat (26).

#### **1. 4. PREVENCIJA PREURANJENOG PORODA**

Nema dosljednih podataka da bilo kakva intervencija (uključujući hidrataciju, antibiotike ili tokolitičku terapiju) može odgoditi porod kod žena dulje od 24 do 48 sati nakon što se pojave trudovi. Zbog toga se mnogo pozornosti usmjerilo na preventivne strategije (27). Dokazano je da primjena progesterona smanjuje rizik od prijevremenog poroda i neonatalnog morbiditeta u žena s visokim rizikom, ali postoji neizvjesnost u pogledu dugoročnih učinaka na dijete (28). Progesteron se odavno smatra i kandidatom za regulaciju kontraktilnosti maternice i funkcije cerviksa, a time i početka i napredovanja poroda. Ranije su studije također raspravljale o potencijalnoj koristi od 17 - hidroksiprogesteron kaproata, sintetskog kaproat estera, prirodnog metabolita progesterona, za liječenje ili prevenciju prijevremenih trudova (29). Intramuskularne injekcije 17 - alfa hidroksiprogesterona kaproata (17 OHP-C) smanjuju rizik od ponovnog prijevremenog poroda za otprilike jednu trećinu. Nažalost, profilaktički 17 OHP-C nije uvijek učinkovit, a jedna trećina visoko rizičnih žena imat će rekurentni preuranjeni porod unatoč terapiji 17 OHP-C-om (30). Vaginalni je progesteron bio predložen za smanjenje učestalosti prijevremenih poroda u rizičnih žena, međutim on nije smanjio rizik pojave prijevremenog poroda i ne može se preporučiti ženama koje su već imale preuranjeni porod (31). Progesteron se i dalje rabi u profilaksi preuranjenog poroda, s tim da se moraju utvrditi rizični čimbenici kojima je izložena žena i otkriti jesu li povezani s prijevremenim porodom.

## **2. HIPOTEZA**

Osnovna je pretpostavka ovog istraživanja da +331 G/A mutacija progesteronskih receptora predstavlja genetički rizični čimbenik za prijevremeni porod.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

1. Ispitati povezanost genskih mutacija i pojave prijevremenih poroda te utvrditi jesu li navedene mutacije genetički rizični čimbenici za prijevremeni porod.
2. Identificirati +331 G/A mutaciju progesteronskih receptora kod trudnica jer bi to moglo otkriti genetički rizik za prijevremeni porod koji bi se pravovremenom intervencijom i terapijom mogao spriječiti.



## **4. ISPITANICI I METODE**

### **4. 1. USTROJ STUDIJE**

Retrospektivno istraživanje parova

### **4. 2. ISPITANICI**

Ispitivana populacija u ovom istraživanju su roditelje s Klinike za ginekologiju i obstetriciju KBC-a Osijek. Rodilje su podijeljene u nekoliko skupina:

1. rani prijevremeni porodi (prije 28. gest. tjedna),
2. umjereni prijevremeni (28. – 32. gest. tjedan),
3. kasni prijevremeni porodi (32. – 37. gest. tjedan).

Kriterij za isključivanje je jatrogeni prijevremeni porod (indukcije radi preeklampsije, dijabetesa i drugo).

Kontrolnu skupinu čine terminske trudnice kojima je porod krenuo spontano. Kontrolnih uzoraka je 100 : 50 uzoraka krvi majki i 50 uzoraka krvi novorođenčadi. Jednak broj je i ispitanika.

Krv trudnica (venska) i novorođenčadi (iz pupčane vrpce) uzorkovana je jednokratno, nakon dobivenog informiranog pristanka, te su analizirane opisane genske mutacije.

### **4. 3. METODE**

Nakon informiranog pristanka, krv trudnica uzorkovana je jednokratno, venepunkcijom, a novorođenčadi iz pupčane vrpce. Krv je uzorkovana u epruvete s antiokoagulansom EDTA. Nakon toga napravljena je izolacija DNA i analiza navedene točkaste mutacije metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

#### **4. 3. 1. Izolacija DNA**

Izolacija DNA napravljena je pomoću komercijalnog kita NucleoSpinBlood (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). Kit sadržava pufere B3, BW, B5, BE i PB, liofiliziranu Proteinazu K, kolone i epruvete za prikupljanje uzorka (2 mL).

S metodom NucleoSpinBlood, genomska se DNA priprema iz pune krvi, kultiviranih stanica, seruma, plazme ili drugih tjelesnih tekućina. Osnovni princip ove metode jest da se liza postiže inkubacijom pune krvi u otopini koja sadrži velike količine kaotropnih iona u

prisutnosti Proteinaze K. Odgovarajući uvjeti za vezanje DNA na membranu od silicijevog dioksida postižu se dodavanjem etanola do lizata. Proces je vezanja reverzibilan i specifičan za nukleinske kiseline. Onečišćenja se uklanjaju jednim korakom ispiranja. Konačno se eluira čista genomska DNA u uvjetima slabe ionske snage u blago alkalnom elucijskom puferu.

Za izolaciju genomske DNA pomoću ovog kita, uzorci krvi mogu se pohraniti na sobnoj temperaturi, + 4 °C ili se mogu zamrznuti.

Prije početka protokola, puferu B5 dodaje se 96 – 100 % etanol da bismo dobili koncentrat B5, a Proteinazi K dodaje se pufer PB da bi se otopila liofilizirana proteinaza koja se nakon toga pohranjuje na – 20 °C. Inkubator ili vodena kupka postavi se na 70 °C, a pufer BE prethodno se zagrije na 70 °C.

Izolacija DNA započinje prvim korakom koji obuhvaća pipetiranje 200 µL krvi i 25 µL Proteinaze K u epruvetu od 1,5 mL. Zatim se dodaje 200 µL pufera B3, miješa se na vortexu oko 15 s i nakon toga inkubira 20 min na 70 °C. Drugi korak je podešavanje uvjeta vezanja DNA, uključuje dodavanje 210 µL 96 – 100 % etanola i miješanje 10-15 s na vortexu. Da bi se DNA vezala na kolonu, u trećem se koraku uzorak (635 µL) premjesti u NucleoSpinBlood Column i centrifugira 1min na 11000 x g. Slijede dva ispiranja silikonske membrane na koloni pomoću: prvo 500 µL pufera BW, a zatim 600 µL pufera B5, nakon svakog dodavanja pufera, uzorak se centrifugira na već navedeni način. Nakon ispiranja slijedi sušenje silikonske membrane još jednim centrifugiranjem, na taj način uklanja se etanol, ukoliko je prisutan. Sljedeći korak je elucija čiste DNA tako što se pipetira 100 µL prethodno ugrijanog pufera BE i uzorak se ponovo centrifugira. Dobivena DNA može se pohraniti na - 20 ili -80 °C.

#### 4. 3. 2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-time* PCR) je sposobnost praćenja napredovanja PCR-a dok se proces odvija, stoga se podaci prikupljaju tijekom PCR procesa, a ne na kraju PCR-a. U lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu, reakcije su obilježene točkom u vremenu tijekom ciklusa kada je prvo otkriveno umnažanje produkta, a ne količina nakon određenog broja ciklusa. Što je veći broj kopija početnih nukleinskih kiselina, to je prije došlo do značajnog povećanja fluorescencije (32).

Analiza točkaste mutacije izvedena je lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu na uređaju Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems LS 4351104, Waltham, MA,

USA). Applied Biosystems TaqMan SNP Genotyping Assays koriste TaqMan 5' nukleazu za amplifikaciju i detekciju specifičnih polimorfizama u pročišćenim uzorcima genomske DNA. Svaki test omogućuje genotipizaciju pojedinaca za polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP) i sastoji se od dva temeljna primera specifična za sekvencu i dvije TaqMan fluorescentno obilježene probe (MGB) s ne-fluorescentnim *quencherima* (NFQ). Jedna sonda označena je s bojom VIC za detekciju sekvence alela 1; druga sonda obilježena je s FAM bojom kako bi se detektirala sekvenca alela 2. Kao rezultat genotipizacije dobije se jedna od sljedeće tri mogućnosti: homozigot wt/wt (engl. *wild type*), heterozigot, homozigot mt/mt (engl. *mutant*). Rezultati real time PCR amplifikacije analizirani su pomoću 7500 Real time PCR SDS software-a v2.3.

Tvrtka Applied Biosystems razvila je dvije vrste kemija koje se koriste za otkrivanje PCR proizvoda, a koji koriste SDS (*Sequence Detection Systems*): TaqMan kemija (poznata i kao "fluorogenska 5' nukleazna kemija") i SYBR Green I kemija. U ovom istraživanju upotrijebljena je TaqMan kemija. TaqMan kemija koristi fluorogensku sondu kako bi omogućila detekciju specifičnog PCR proizvoda dok se akumulira tijekom PCR ciklusa. TaqMan kemija funkcionira na način da se konstruira oligonukleotidna proba koja sadrži reportersku fluorescentnu boju na 5' kraju i boju za gašenje (*quencher*) na kraju 3'. Dok je sonda netaknuta, blizina boje za gašenje uvelike smanjuje fluorescenciju koju emitira reporterska boja fluorescentnim rezonantnim prijenosom energije (FRET) kroz prostor. Ako je prisutna ciljna sekvenca, sonda se spušta nizvodno od jedne od početnih mjesta i nalazi se rascjepkana djelovanjem nukleaze 5' Taq DNA polimeraze kako se ovaj primer produžuje. Ovo cijepanje sonde odvaja reportersku boju od *quencher*a, povećavajući signal reporterske boje, uklanja sondu s ciljnog lanca, dopuštajući produljenje primera do kraja šablone (32).

Svaki test sadrži par neobilježenih početnica TaqMan sonda s FAM ili VIC naljepnicom na 5' kraju, te malim vezivnim kanalom (MGB) i nefluorescentnim *quencherom* (NFQ) na 3' kraju. Na početku lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, temperatura je povišena da se denaturira dvolančana DNA. Tijekom ovog koraka, signal iz fluorescentne boje na 5' kraju TaqMan sonde gasi se pomoću NFQ na 3' kraju. U sljedećem koraku, reakcijska temperatura se spušta kako bi se omogućilo početnici i sondi da se povežu. Taq DNA polimeraza sintetizira nove niti koristeći neoznačene početnice i predložak. Kada polimeraza dosegne TaqMan sondu, njegova endogena 5' nukleazna aktivnost cijepa sondu, odvajajući boju od *quencher*a. Sa svakim ciklusom PCR-a, oslobađa se više molekula boje,

što rezultira povećanjem intenziteta fluorescencije proporcionalno količini sintetiziranog amplikona (33).

U ovom istraživanju koristio se TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) koji sadrži:

- AmpliTaq Gold DNA polimeraza, UP (ultra pure)
- Uracil - N glikozilaza (UNG)
- dNTP s dUTP-om
- ROX Passive Reference
- Optimizirane komponente međusprennika

Postupak genotipizacije prikazan je u Tablici 1., dok se lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu provodi prema protokolu prikazanom u Tablici 2.

Tablica 1. Sastojci i volumeni potrebni za genotipizaciju

Sastojci	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
V (TaqMan Universal PCR Master Mix 2x)	12,5
V (TaqMan genotyping assay mix 240x)	1,25
V (d. d. $\text{H}_2\text{O}$ )	10,25
V (DNA / $\text{H}_2\text{O}$ )	1
<b>Ukupni volumen u jažici (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>25</b>

Tablica 2. Protokol lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

Početna denaturacija	10 minuta na 95 °C
Denaturacija tijekom 40 ciklusa	15 sekundi na 92 °C
Vežanje / sinteza tijekom 40 ciklusa	1 minuta na 60 °C

#### 4. 4. STATISTIČKE METODE

Za potrebe istraživanja korištena je deskriptivna statistička obrada. Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama, a numerički podaci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučajevima raspodjele koji slijede normalu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike u genetičkoj distribuciji i frekvenciji javljanja alela testirane su Hi kvadrat ( $\chi^2$ ) testom. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ , a sve P vrijednosti su dvostrane. Statistička obrada podataka napravljena je u programu RStudio (ver. 1.2.1335, RStudio Inc., Boston, MA, USA).

## 5. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na ukupno 200 ispitanika. Kontrolnu skupinu čine terminske trudnice kojima je porod krenuo spontano. Kontrolnih uzoraka je 100 : 50 uzoraka krvi majki i 50 uzoraka krvi novorođenčadi. Jednak broj je i ispitanika. Svak uzorak krvi podvrgnut je postupku izolacije DNA te nakon toga analizi točkaste mutacije + 331 G/A metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu kako bi se otkrila povezanost s prijevremenim porodom. U Tablici 3. i Tablici 4. možemo vidjeti kod koliko je majki, odnosno djece identificirana prethodno navedena mutacija.

Tablica 3. Prikaz prisutnosti mutacija kod majki

SNP	Majke		Ukupno
	Ispitanici	Kontrole	
+ 331 G/A			
G/G	43	43	86
G/A	7	7	14
<b>Ukupno</b>	50	50	100

Tablica 4. Prikaz prisutnosti mutacija kod djece

SNP	Djeca		Ukupno
	Ispitanici	Kontrole	
+ 331 G/A			
G/G	45	44	89
G/A	5	6	11
<b>Ukupno</b>	50	50	100

### 5. 1. PRIKAZ APSOLUTNE I RELATIVNE FREKVENCIJE ALELA

Tablice 5. i 6. prikazuju raspodjelu alela za majke i djecu. Utvrđeno je da od 50 ispitanica, njih 14 % posjeduje mutaciju + 331 G/A , isti je postotak i kod kontrola, s druge strane, kod djece ispitanika je utvrđeno da njih 10 % posjeduje navedenu mutaciju, odnosno kod kontrolne skupine je postotak nešto veći i iznosi 12 %.

Tablica 5. Prikaz apsolutne i relativne frekvencije alela kod majki

SNP	Uzorak	Alel	Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)
+ 331 G/A	Ispitanici (majke)	G/G	43	86
		G/A	7	14
	Kontrole (majke)	G/G	43	86
		G/A	7	14

Tablica 6. Prikaz apsolutne i relativne frekvencije alela kod djece

SNP	Uzorak	Alel	Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)
+ 331 G/A	Ispitanici (djeca)	G/G	45	90
		G/A	5	10
	Kontrole (djeca)	G/G	44	88
		G/A	6	12

## 5. 2. ANALIZA MUTACIJE

Budući da imamo dovoljno podataka, genotip i frekvencije alela između ispitanika i kontrola uspoređeni su Hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testom posebno za majke i posebno za djecu. Korišten je Hi-kvadrat test jer su podatci kategorijski, odnosno gleda se prisutnost mutacije, tj. dva moguća ishoda: ima li ili nema mutacije. Utvrđeno je, za majke, da nema statistički značajne razlike u broju mutacija između ispitivane i kontrolne skupine ( $\chi^2 = 0$ ; Df = 1;  $p > 0,99$ ), isti rezultat dobiven je i za djecu.

## 5. 3. INDEKS TJELESNE MASE (BMI) I DOB TRUDNICA KOJE SU RODILE PRIJEVREMENO

Indeks tjelesni mase (BMI), kao i dob trudnice predstavljaju rizični čimbenik za prijevremeni porod. BMI je jedan od načina procjene uhranjenosti i referentni interval iznosi 18,5 – 24,9 kg/m<sup>2</sup> za oba spola prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji za europsko stanovništvo. U ovoj studiji dobiveno je da 30 od 50 trudnica (60 %) koje su rodile prijevremeno, imaju BMI veći od 24,9 kg/m<sup>2</sup> kako je prikazano u Tablici 7.

Tablica 7. Prikaz broja trudnica koje su imale povišeni BMI i BMI unutar referentnog intervala

BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Trudnice koje su rodile prijevremeno	Trudnice koje su rodile u terminu	Ukupno
> 24,9	30	30	60
18,5 - 24,9	20	20	40
<b>Ukupno</b>	50	50	100

Usporedbom podataka navedenih u Tablici 7. htjelo se utvrditi utječe li povećani indeks tjelesne mase na prijevremeni porod. Uporabom Hi-kvadrat testa utvrđeno je da nema statistički značajne povezanosti između povećanog indeksa tjelesne mase i pojavnosti preuranjenog poroda ( $\chi^2 = 0$ ; Df = 1; p > 0,99).

Opće je poznato da dob trudnice, veća od 35, povećava rizik od komplikacija u trudnoći. U ovom istraživanju trudnice koje su rodile prijevremeno podijeljene su u tri dobne skupine i dobiveni su rezultati vidljivi u Tablici 8.

Tablica 8. Podjela trudnica koje su rodile prijevremeno i u terminu u tri dobne skupine

Dob	Trudnice rodile prijevremeno	Trudnice rodile u terminu	Ukupno
<b>Do 20 godina</b>	2	1	3
<b>20 - 30 godina</b>	19	21	40
<b>30 i više godina</b>	29	28	57
<b>Ukupno</b>	50	50	100

Podaci vidljivi u Tablici 8. analizirani su Hi-kvadrat testom jer se htjela utvrditi povezanost između dobi trudnice i prijevremenog poroda, no pokazalo se da nema statistički značajne povezanosti, odnosno starija dob trudnice ne utječe na pojavnost prijevremenog poroda ( $\chi^2 = 0,451$ ; Df = 2; p = 0,79).



#### 5. 4. ANALIZA MUTACIJE S OBZIROM NA VRIJEME PORODA

Trudnice u ispitivanoj skupini podijeljene su u tri skupine prema tjednu gestacije kako je prikazano u Tablici 9.

Tablica 9. Podjela trudnica prema gestacijskom tjednu i prikaz apsolutne i relativne frekvencije alela

Tjedan trudnoće	Alel	Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)
24. - 28.	G/G	11	22
	G/A	0	0
28. - 34	G/G	14	28
	G/A	3	6
34. - 37.	G/G	18	36
	G/A	4	8

Korištenjem Hi-kvadrat testa o jednakosti distribucija, uspoređeno je postoji li statistički značajna razlika u genotipovima između ove tri grupe preuranjenih poroda i dobiveno je da nema statistički značajne razlike među genotipovima, odnosno zastupljenost pojedinog genotipa u određenom tjednu trudnoće ne utječe na prijevremeni porod ( $\chi^2 = 2,298$ ; Df = 2; p = 0,32).

#### 5. 5. PROGESTERON I PRIJEVREMENI POROD

Trudnicama ispitivane i kontrolne skupine izmjerene su vrijednosti progesterona neposredno prije poroda. U Tablici 10. prikazan je broj trudnica koje su imale sniženi, odnosno normalni ili povišeni progesteron prije poroda s obzirom na referentne vrijednosti za preuranjeni porod koje iznose 50,18 - 467,46 nmol/L i 314,82 - 1087,56 nmol/L za terminski porod (34).

Tablica 10. Prikaz broja trudnica sa sniženom, odnosno povišenom ili normalnom koncentracijom progesterona

<b>Progesteron</b>	<b>Trudnice koje su rodile prijevremeno</b>	<b>Trudnice koje su rodile u terminu</b>	<b>Ukupno</b>
<b>Snižen</b>	15	7	22
<b>Unutar intervala ili povišen</b>	35	43	78
<b>Ukupno</b>	50	50	100

Usporedbom podataka u Tablici 10. htjelo se utvrditi utječe li pad koncentracije progesterona ispod referentnih vrijednosti na početak poroda. Uporabom Hi-kvadrat testa dobiveno je da nema statistički značajne povezanosti među ovim podacima, odnosno pad koncentracije progesterona ne utječe na početak poroda ( $\chi^2 = 3,729$ ; Df = 1; p = 0,05).

## 6. RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitivanu populaciju čine roditelje s Klinike za ginekologiju i obstetriciju KBC-a Osijek. Rodilje su podijeljene prema terminima poroda, odnosno na one koje su rodile prijevremeno (prije 37. tjedna gestacije) i trudnice koje su rodile u terminu. Kriterij za isključivanje bio je jatrogeni prijevremeni porod (indukcije radi preeklampsije, dijabetesa i dr.), također isključene su i blizanačke trudnoće. Ukupno je obrađeno 200 uzoraka. Podijeljeni su na kontrole koje čine 50 trudnica i 50 beba rođenih u terminu i ispitanike kojih ima isto toliko, samo su djeca rođena prijevremeno. Krv trudnica je venska, kod novorođenčadi iz pupčane vrpce, uzorkovane su jednokratno nakon potpisanog informiranog pristanka te su nakon izolacije DNA i analize točkaste mutacije + 331 G/A lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu dobiveni sljedeći rezultati. Utvrđeno je da od 50 ispitivanih trudnica, njih 14 % ima mutaciju prisutnu u krvi, isti postotak je i kod kontrolne skupine. Kod ispitivane novorođenčadi, njih 10 % ima identificiranu mutaciju, odnosno 12 % kod kontrolne skupine.

Preuranjeni porod najviše pridonosi neonatalnom mortalitetu i morbiditetu i uz to ima dugotrajne posljedice na zdravlje. Svjetska je zdravstvena organizacija 2013. godine objavila da je najviše preuranjenih poroda u Africi i Južnoj Aziji, točnije Indiji. Signalni put koji pridonosi nastanku preuranjenog poroda je svakako progesteronski signalni put. Progesteron je steroidni hormon koji ima važnu ulogu u održavanju trudnoće i imunosnom odgovoru, njegovim fiziološkim djelovanjem upravlja progesteronski receptor. Opisano je nekoliko mutacija PGR-a, ali jedna se posebno ističe, a to je PROGINS mutacija koja rezultira smanjenjem završne aktivnosti progesterona. PROGINS je prvo opisan kao Alu element (306 bp) u intronu 7, ali je također uključivao i missense SNP u egzonu 4 (V660L, rs1042838) te SNP u egzonu 5. Ta tri polimorfizma zajedno čine spomenuti kompleks PROGINS (35). Ljudski PGR postoji u dvije različite izoforme: PR-A i PR-B. Posljednji ima ulogu transkripcijskog aktivatora gena uključenih u održavanje trudnoće, dok PR-A smanjuje aktivnost PR-B te njegova aktivnost jača kako se trudnoća bliži kraju. Dodatni SNP + 331 G/A otkriven je u promotorskoj regiji progesteronskog gena. Budući da se ovaj SNP nalazi nizvodno od PR-B-a, ali uzvodno od PR-A, njegova prisutnost povećava ekspresiju PR-B-a u odnosu na PR-A, a povećanje omjera PR-B : PR-A povezano je s početkom poroda.

Provedena su slična istraživanja na ovu temu. Jedno od njih provedeno je 2008. godine na 78 ispitanika i 415 kontrola. Ispitivala se povezanost SNP-a + 331 G/A s prijevremenim

porodom. Zaključeno je da nema statistički značajne razlike između genotipova ispitanika i kontrola te je identificirano tek 5,1 % trudnica koje su imale mutaciju što ne odstupa od prosjeka koji iznosi 7-11 % u bjelačkoj populaciji. Također je utvrđeno da majka kao nositeljica SNP-a + 331 G/A ne povećava ukupni rizik za prijevremeni porod. Utvrđeno je da se povlačenje progesterona prije poroda ne događa kod svih žena, kod nekih su koncentracije progesterona tijekom poroda slične onima izmjerenima tjedan prije, što dokazuje da smanjenje koncentracije progesterona nije nužno za početak poroda (36). U ovom istraživanju proučavane su koncentracije progesterona trudnica koje su rodile prijevremeno i koncentracije progesterona trudnica koje su rodile u terminu. Među ispitivanom skupinom trudnica, njih 30 % imalo je vrijednosti progesterona niže od referentnih, dok je u kontrolama tek 14 % trudnica imalo snižen progesteron prije poroda. Cilj je bio utvrditi dolazi li do značajnog pada vrijednosti progesterona prije samog početka poroda. Utvrđeno je da to smanjenje nije statistički značajno ( $\chi^2 = 3,729$ ; Df = 1; p = 0,05), što je u skladu s „*Isoform switch*“ hipotezom.

Sljedeće istraživanje rađeno je na populaciji Tajvana 2010. godine. Pretpostavka je bila da je PROGINS mutacija povezana s opetovanim gubitkom ploda. Istraživanje je obuhvatilo 121 ženu s poviješću spontanih pobačaja i 179 kontrola, odnosno žena koje su svoju trudnoću iznijele do kraja. Pokazalo se da su frekvencije genotipa funkcionalnog SNP-a + 331 G/A značajno više kod žena koje su imale pobačaje (35).

Studija napravljena 2014. godine u Sjevernoj Indiji, gdje je stopa prijevremenih poroda najveća, proučava povezanost genetskih faktora s preuranjenim porodom, između ostalog i utjecaj PROGINS mutacija. Sudjelovale su 403 trudnice. Kriterij za isključivanje bile su godine niže od 18. i više od 45. te neka medicinska stanja poput HIV-a, tuberkuloze i razne infekcije. Također nije pronađena statistička značajnost među genotipovima kontrola i ispitanika, iako je raspodjela PROGINS mutacija bila nešto viša kod trudnica koje su rodile prijevremeno (5,26 %). Slično ispitivanje proveli su Aruna i sur. (2010.) i Kurz i sur. (2001.) na populaciji Australije te su dobili iste rezultate koji potvrđuju teoriju da PROGINS mutacije ne utječu na preuranjeni porod ili malu porođajnu masu djeteta (37).

2008. godine provedeno je ispitivanje na latinoameričkoj populaciji s ciljem otkrivanja povezanosti povećane frekvencije mutiranih alela progesteronskog receptora s prijevremenim porodom. Genotipizirana je placentna DNA 64 pacijenta koji su imali prijevremeni porod i 54 kontrole na 4 polimorfizma progesteronskog receptora. Utvrđeno je kako ne postoji

povezanost PROGINs polimorfizama, uključujući i + 331 G/A s prijevremenim porodom u latinoameričkoj populaciji (38).

Sva četiri prethodno navedena istraživanja nisu našla poveznicu + 331 G/A polimorfizma s prijevremenim porodom, odnosno dobivene frekvencije alela uklapaju se u interval od 7 do 11 % koliko je mutacija u prosjeku prisutna u populaciji. U ovom istraživanju također je napravljena izolacija DNA dobivena iz pune krvi te analiza točkaste mutacije lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu te nije nađena statistički značajna razlika u broju mutacija između ispitivane i kontrolne skupine ni kod majki, kao ni kod djece te je rezultat isti ( $\chi^2 = 0$ ; Df = 1;  $p > 0,99$ ). Rezultati nisu isključivi jer razlog ne pronalaženja povezanosti između mutacije i prijevremenog poroda može biti i u malom broju uzoraka te su stoga potrebna daljnja istraživanja. Uz prisutnost mutacije, proučavana su još tri parametra koja se smatraju rizičnim čimbenicima za prijevremeni porod, a to su BMI, dob trudnice i tjedan gestacije. Trudnice su u ovoj studiji bile podijeljene prema kategorijama prijevremenog poroda u tri skupine i ispitivala se zastupljenost pojedinog genotipa mutacije + 331 G/A s obzirom na tjedan poroda, nije pronađena statistički značajna povezanost ( $\chi^2 = 2,298$ ; Df = 2;  $p = 0,32$ ), no uzorak je premali i daljnja istraživanja su potrebna. Indeks tjelesne mase u ovoj studiji je pokazao da nije rizični čimbenik za prijevremeni porod. Budući da se proučavao mali broj uzoraka, tj. 50 trudnica koje su rodile prijevremeno i 50 trudnica koje su rodile u terminu, utvrđeno je da nema statističke povezanosti između povećanog indeksa tjelesne mase i pojavnosti prijevremenog poroda, odnosno ukoliko je on veći od 24,9 kg/m<sup>2</sup> ( $\chi^2 = 0$ ; Df = 1;  $p > 0,99$ ). Taj zaključak nije u skladu s prethodnim istraživanjima koja su napravljena 2005. i 2017. godine, no kao što je već rečeno, uzorak na kojem je proučavan ovaj parametar ima mali broj sudionika. Istraživanje iz 2005. godine proučavalo je 597 žena koje su bile pretile prije trudnoće i otkrili su povezanost indeksa tjelesne mase s prijevremenim porodom (39). Studija iz 2017. godine provedena je na populaciji Irske i uključuje 38528 poroda te također potvrđuje tezu da tjelesna masa ima utjecaj na prijevremeni porod (40).

Poznato je da dob trudnice povećava mogućnost komplikacija, ne samo u vidu prijevremenog poroda, nego i razvoja dijabetesa i drugih kroničnih bolesti. Tijekom ovog ispitivanja 58 % trudnica koje su rodile prijevremeno je starije od 30 godina, iako ovaj rezultat ne može biti isključiv zbog premalog broja uzoraka. Unatoč postotku, nije dokazano da dob trudnice utječe na pojavnost preuranjenog poroda, što može biti posljedica malog broja uzoraka koji su proučavani ( $\chi^2 = 0,451$ ; Df = 2;  $p = 0,79$ ). Nedavna studija iz 2018. godine je obuhvatila 182000 poroda diljem Kanade i utvrđeno je da je dob žene od 30 i više godina

povezana s niskim rizikom za preuranjeni porod te da on značajno raste ukoliko žena ima 40 ili više godina (41).

+ 331 G/A polimorfizam istraživani je i u smislu drugih patoloških stanja poput raka dojke ili raka jajnika. Većina istraživanja ne može potvrditi povezanost navedene mutacije s ovim stanjima. Istraživanje iz 2003. godine proučavalo je 990 žena oboljelih od raka dojke i htjelo se utvrditi je li ovaj polimorfizam rizični faktor za rak dojke. Pokazalo se da + 331 G/A mutacija može pomoći pojačanom rastu tumorskih stanica dojke, iako to nisu mogli sa sigurnošću potvrditi (42). Tri godine poslije napravljena je studija na jugu Njemačke koja je uključila žene s rakom dojke i rakom jajnika. Također se nije mogla utvrditi povezanost mutacije, iako se i u ovoj studiji vidjelo da je ona prisutna kod oboljelih žena i može pomoći tumorskom rastu (43). Na ovu je temu 2017. godine napravljena meta-analiza koja je obuhvatila sva dosadašnja istraživanja i također nisu mogli pronaći poveznicu te je potrebno još novih spoznaja da bi se donio točan zaključak (44).

Poboljšano razumijevanje molekularnih mehanizama progesteronskog djelovanja pomoći će kliničarima u prepoznavanju žena koje bi mogle imati koristi od nadomjesne terapije progesteronom te bi se na taj način smanjio broj preuranjenih poroda.

## **7. ZAKLJUČAK**

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

- Nije pronađena povezanost polimorfizma + 331 G/A s preuranjenim porodom
- BMI ne predstavlja rizični čimbenik za preuranjeni porod
- Dob trudnice nije rizični čimbenik za preuranjeni porod

## 8. SAŽETAK

### Uloga + 331 G/A mutacije progesteronskih receptora kod majki i djece na pojavnost prijevremenog poroda

**Cilj istraživanja:** Ciljevi ovog istraživanja su ispitivanje povezanosti genskih mutacija i prijevremenih poroda te utvrđivanje jesu li te mutacije genetički rizični čimbenici za prijevremeni porod prije svega identifikacija + 331 G/A mutacije progesteronskih receptora kod trudnica koja bi mogla biti genetički rizični čimbenik za prijevremeni porod.

**Nacrt studije:** Retrospektivna studija parova

**Ispitanici i metode:** Analizirano je 200 uzoraka, 100 uzoraka krvi ispitanika koje čine 50 uzoraka krvi trudnica koje su rodile prijevremeno te 50 uzoraka krvi njihove djece i isto toliko kontrolnih uzoraka trudnica i njihove djece rođene u terminu. Nakon venepunkcije, krv je podvrgnuta izolaciji DNA te analizi točkaste mutacije metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

**Rezultati:** U ovom istraživanju nije nađena statistički značajna razlika u broju mutacija između ispitivane i kontrolne skupine ni kod majki, kao ni kod djece te su rezultati Hi-kvadrat testa jednaki ( $\chi^2 = 0$ ; Df = 1;  $p > 0,99$ ). Uz to, zastupljenost pojedinog genotipa mutacije + 331 G/A u određenom tjednu trudnoće ne utječe na prijevremeni porod ( $\chi^2 = 2,298$ ; Df = 2;  $p = 0,32$ ) te je utvrđeno da BMI ( $\chi^2 = 0$ ; Df = 1;  $p > 0,99$ ) i dob trudnice ( $\chi^2 = 0,451$ ; Df = 2;  $p = 0,79$ ) nisu rizični čimbenici za prijevremeni porod. Također je utvrđeno da pad koncentracije progesterona na početku poroda nije značajan ( $\chi^2 = 3,729$ ; Df = 1;  $p = 0,05$ ).

**Zaključak:** Mutacija + 331 G/A progesteronskih receptora ne predstavlja genetički rizični čimbenik za prijevremeni porod.

KLJUČNE RIJEČI: preuranjeni porod; progesteron; progesteronski receptor; PR mutacija



## 9. SUMMARY

### **Role of + 331 G/A progesterone receptor mutation in mothers and children in premature delivery**

**Objectives:** The aim of this study is to investigate the association between gene mutations and preterm births and to determine whether these mutations are genetically risk factors for preterm birth, primarily to identify a + 331 G/A mutation of progesterone receptors in pregnant women that could be a genetic risk factor for preterm delivery.

**Study design:** A retrospective study of pairs

**Participants and methods:** 200 samples were analysed: 100 blood samples of which 50 blood samples were taken of pregnant women who gave birth prematurely and 50 blood samples of their children, as well as the same number of control samples of pregnant women and their children born in term. After venepuncture, the blood was subjected to DNA isolation and point mutation analysis on Real-Time PCR.

**Results:** In this study, no statistically significant difference was found in the number of mutations between the test and control groups in both mothers and children, and the results of the Hi-square test were the same ( $\chi^2 = 0$ ; Df = 1;  $p > 0,99$ ). In addition, preterm birth was not affected by the presence of a single +331 G/A mutation genotype at a given week of pregnancy ( $\chi^2 = 2,298$ ; Df = 2;  $p = 0,32$ ), and BMI ( $\chi^2 = 0$ ; Df = 1;  $p > 0,99$ ) and the age of the pregnant woman ( $\chi^2 = 0,451$ ; Df = 2;  $p = 0,79$ ) are not risk factors for preterm delivery. It was also found that the decrease in progesterone concentration at the onset of birth is not significant ( $\chi^2 = 3,729$ ; Df = 1;  $p = 0,05$ ).

**Conclusion:** The mutation of the + 331 G/A progesterone receptor does not represent a risk factor for preterm delivery.

**KEYWORDS:** preterm delivery; progesterone; progesterone receptor; PR mutation

**10. LITERATURA**

1. Sen C. Preterm labour and preterm birth. *J Perinat Med.* 2017; 45(8): 911–913.
2. 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.
3. World Health Organisation. Preterm birth. Dostupno na adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>. Datum pristupa: 21. 07. 2019.
4. Langmia IM, Apalatomy YD, Omar SZ, Mohamed Z. Progesterone receptor (PGR) gene polymorphism is associated with susceptibility to preterm birth. *BMC Med Genet.* 2015; 16: 63.
5. Moutquin JM. Classification and heterogeneity of preterm birth. *BJOG- Int J Obst Gy.* 2003; 110: 30-3.
6. 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: 759.
7. Tiwari D, Bose PD, Das S, Das CR, Datta R, Bose S. MTHFR (C677T) polymorphism and PR (PROGINS) mutation as genetic factors for preterm delivery, fetal death and low birth weight: A Northeast Indian population based study. *Meta Gene.* 2015; 3: 31-42.
8. Anum EA, Springel EH, Shriver MD, Strauss JF. Genetic contributions to disparities in preterm birth. *Pediatr Res.* 2009; 65: 1-9.
9. Villar J, Papageorghiou AT, Knight HE, Gravett MG, Iams J, Waller SA, i sur. The preterm birth syndrome: a prototype phenotypic classification. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206(2): 119-123.
10. Parets SE, Knight AK, Smith AK. Insights into genetic susceptibility in the etiology of spontaneous preterm birth. *Appl Clin Genet.* 2015; 8: 283-290.
11. Svensson AC, Sandin S, Cnattingius S, Reilly M, Pawitan Y, Hultman CM, i sur. *Am J Epidemiol.* 2009; 170: 1365-1372.
12. Boyd HA, Poulsen G, Wohlfahrt J, Murray JC, Feenstra B, Melbye M. *Am J Epidemiol.* 2009; 170: 1358-1364.
13. Wilcox AJ, Skjaerven R, Lie RT. Familial Patterns of Preterm Delivery: Maternal and Fetal Contributions. *Am J Epidemiol.* 2008; 167: 474-479.

14. Kumar D, Springel E, Moore RM, Mercer BM, Philipson E, Mansour JM, i sur. Progesterone inhibits in vitro fetal membrane weakening. *Am J Obstet Gynecol.* 2015; 213(4): 520.e1-9.
15. Zhang G, Feenstra B, Bacelis J, Liu X, Muglia LM, Juodakis J, i sur. Genetic Associations with Gestational Length and Spontaneous Preterm Birth. *N Engl J Med.* 2017; 377(12): 1156-1167.
16. Wu SP, DeMayo FJ. Progesterone Receptor Signaling in Uterine Myometrial Physiology and Preterm Birth. *Curr Top Dev Biol.* 2017; 125: 171-190.
17. Aruna M, Nagaraja T, Andal S, Tarakeswari S, Sirisha PVS, Reddy AG, i sur. Role of Progesterone Receptor Polymorphisms in the Recurrent Spontaneous Abortions: Indian Case. *Plos ONE.* 2010; 5(1): e8712.
18. Brubaker D, Barbaro A, Chance MR, Mesiano S. A dynamical systems model of progesterone receptor interactions with inflammation in human parturition. *BMC Syst Biol.* 2016; 10(1): 79.
19. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, i sur. The preterm parturition syndrome. *BJOG.* 2006; 113(3): 17-42.
20. Bezold KY, Karjalainen MK, Hallman M, Teramo K, Muglia LJ. The genomics of preterm birth: from animal models to human studies. *Genome Med.* 2013; 5(4): 34.
21. Tan H, Yi L, Rote NS, Hurd WW, Mesiano S. Progesterone Receptor-A and -B Have Opposite Effects on Proinflammatory Gene Expression in Human Myometrial Cells: Implications for Progesterone Actions in Human Pregnancy and Parturition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97(5): E719-E730.
22. Swaggart KA, Pavlicev M, Muglia LJ. Genomics of Preterm Birth. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015; 5: a023127.
23. Abdel-Hafiz HA, Horwitz KB. Post-translational Modifications of the Progesterone Receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014; 140: 80-89.
24. 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.
25. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. PGR (progesterone receptor). Dostupno na adresi: [http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_PGR.html](http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_PGR.html). Datum pristupa: 21. 07. 2019.
26. Li D, Cheng J, Li W, Ma W, Zhou X, Zheng L, i sur. Association between male infertility and either the +331 G/A or the proins polymorphism of the progesterone receptor gene in Chinese population. *Iran J Reprod Med.* 2015; 13(1): 35-40.

27. Norwitz ER, Phaneuf LE, Caughey AB. Progesterone Supplementation and the Prevention of Preterm Birth. *Rev Obstet Gynecol.* 2011; 4(2): 60-72.
28. Norman JE, Marlow N, Messow CN, Shennan A, Bennett PR, Thornton S, i sur. Vaginal progesterone prophylaxis for preterm birth (the OPPTIMUM study): a multicentre, randomised, double blind trial. *Lancet.* 2016; 387(10033): 2106-2116.
29. Kuon RJ, Shi SQ, Maul H, Sohn C, Balducci J, Maner WL, i sur. Pharmacological actions of progestins to inhibit cervical ripening and prevent delivery depend upon their properties, the route of administration and the vehicle. *Am J Obstet Gynecol.* 2010; 202(5): 455. e1-455. e9.
30. Manuck TA, Esplin MS, Biggio J, Bukowski R, Parry S, Zhang H, i sur. Predictors of Respons to 17-alpha hydroxyprogesterone caproate for Prevention of Recurren Spontaneous Preterm Birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2016; 214(3): 376e1-376e8.
31. Crowther CA, Ashwood P, McPhee AJ, Flenady V, Tran T, Dodd JM, i sur. Vaginal progesterone pessaries for pregnant women with a previous preterm birth to prevent neonatal respiratory distress syndrome (the PROGRESS Study): A multicentre, randomised, placebo controlled trial. *PLoS Med.* 2017; 14(9): e1002390.
32. ThermoFisher Scientific. Essentials of Real-Time PCR. Dostupno na adresi: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>. Datum pristupa: 25. 07. 2019.
33. ThermoFisher Scientific. How TaqMan Assays Work. Dostupno na adresi: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>. Datum pristupa: 27. 07. 2019.
34. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Spong CY, Dashe JS, Hoffman BL, i sur. *Williams obstetrics.* 24. izd. New York: McGraw-Hill Education; 2014.
35. Su MT, Lee IW, Chen YC. Association of progesterone receptor polymorphism with idiopathic recurrent pregnancy loss in Taiwanese Han population. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28: 239-243.
36. Luo G, Morgan T, Bahtiyar MO, Snegovskikh VV, Shatz F, i sur. Single nucleotide polymorphisms in the human progesterone receptor gene and spontaneous preterm birth. *Reprod Sci.* 2008; 15(2): 147-55.
37. Tiwari D, Bose PD, Das S, Das CR, Datta R, Bose S. MTHFR (C677T) polymorphism and PR(PROGINS) mutation as genetic factors for preterm delivery, fetal death and low birth weight: A Northeast Indian population based study. *Meta Gene.* 2015; 3: 31-42.

38. 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.
39. Hendler I, Goldenberg RL, Mercer BM, Iams JD, Meis PJ, Moawad AH, et al. The Preterm Prediction Study: association between maternal body mass index and spontaneous and indicated preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192(3): 882-6.
40. Vinturache A, McKeating A, Daly N, Sheehan S, Turner M. Maternal body mass index and the prevalence of spontaneous and elective preterm deliveries in an Irish obstetric population: a retrospective cohort study. *BMJ Open.* 2017; 7: e015258.
41. Fuchs F, Monet B, Ducruet T, Chaillet N, Audibert F. Effect of maternal age on the risk of preterm birth: A large cohort study. *PLoS One.* 2018; 13(1): e0191002.
42. De Vivo I, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ. A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk. *Cancer Res.* 2003; 63(17): 5236-8.
43. Romano A, Lindsey PJ, Fischer DC, Delvoux B, Paulussen AD, Janssen RG, et al. Two functionally relevant polymorphisms in the human progesterone receptor gene (+331 G/A and progins) and the predisposition for breast and/or ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2006; 101(2): 287-95.
44. Qi XL, Yao J, Zhang Y. No association between the progesterone receptor gene polymorphism (+331G/A) and the risk of breast cancer: an updated meta-analysis. *BMC Med Genet.* 2017; 18:123.

## 11. ŽIVOTOPIS

DAVORKA BEBEK

Datum i mjesto rođenja:

- 6. travnja 1997. godine u Osijeku

Obrazovanje:

- 2012. – 2016. – I. gimnazija, Osijek
- 2016. – 2019. – Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku