

Utjecaj PROGINS alu insercije na funkcioniranje progesteronskih receptora i modulaciju rizika prijevremenog poroda

Cibok, Sara

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:152:709511>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



Repository / Repozitorij:

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



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

Sara Cibok

**UTJECAJ PROGINS ALU INSERCIJE NA
FUNKCIONIRANJE PROGESTERONSKIH
RECEPTORA I MODULACIJU RIZIKA
PRIJEVREMENOG PORODA**

Završni rad

Osijek, 2019.

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

Sara Cibok

**UTJECAJ PROGINS ALU INSERCIJE NA
FUNKCIONIRANJE PROGESTERONSKIH
RECEPTORA I MODULACIJU RIZIKA
PRIJEVREMENOG PORODA**

Završni rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za medicinsku genetiku na Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentorica za završni rad: izv.prof.dr.sc. Jasenka Wagner Kostadinović

Rad ima 36 listova, 4 tablice i 6 slika.

Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jasenki Wagner Kostadinović na stručnim savjetima i pomoći pri izradi završnog rada.

Zahvaljujem zdr. lab. tehn. Neni Arvaj na praktičnoj pomoći pri izvedbi eksperimentalnog dijela završnog rada i ugodnom druženju u laboratoriju.

Zahvaljujem svojoj najboljoj prijateljici Mihaeli na strpljenju, podršci i pomoći pri izradi statističke analize za moj završni rad.

Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju, podršci i vjerovanju u mene tijekom cijeloga moga obrazovanja, kao i tijekom izrade završnog rada.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Prijevremeni porod.....	1
1.2. Uloga progesterona i proces porođaja	3
1.3. PROGINS alu insercija.....	4
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 komercijalnim kitom NucleoSpin® Blood	10
4.3.2. Provjera čistoće izolirane DNA pomoću Qubit™ Fluorometra	11
4.3.3. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze prema Qiagen komercijalnom kitu (Taq PCR Core Kit).....	11
4.3.4. Agarozna gel elektroforeza.....	13
4.3.5. Statističke metode.....	13
5. REZULTATI	15
5.1. Prikaz anamnestičkih podataka roditelja.....	16
5.2. Prikaz učestalosti genotipova po skupinama	16
5.3. Razina progesterona u krvi majki pri porodu	17

6. RASPRAVA	20
7. ZAKLJUČAK	22
8. SAŽETAK	23
9. SUMMARY	24
10. LITERATURA	25
11. ŽIVOTOPIS	30

1. UVOD

1.1. Prijevremeni porod

Prijevremeni porod veliki je medicinski i socioekonomski problem. Svaki porođaj prije navršenih 37 tjedana, neovisno o porođajnoj masi ploda, jest prijevremeni. Donja granica prijevremenog porođaja i spontanog pobačaja danas se nalazi na 22. tjednu trudnoće (odnosno pri težini fetusa od 500 g). Svaki dovršetak trudnoće prije navršenog 22. tjedna ulazi u domenu spontanog pobačaja, a porođaj nakon 22. tjedna, a prije 37. tjedna u područje prijevremenog porođaja (1). Prema gestacijskoj dobi, prijevremeni porod se dijeli na rani prijevremeni porod (između 22. i 28. tjedna trudnoće), umjereni prijevremeni porod (između 28. i 32. tjedna trudnoće) te kasni prijevremeni porod (između 32. i 37. tjedna trudnoće) (2).

Postotak prijevremenih poroda varira od 5% svih porođaja u Europi do 18% u južnoafričkom području (3). Postoje i varijacije postotka prijevremenih porođaja u različitim etničkim skupinama; na primjer, postotak prijevremenih porođaja je veći u populaciji Afroamerikanaca nego u populaciji bijelaca (4,5). U 2010. godini bilo je oko 15 milijuna prijevremenih porođaja u svijetu (3,5). U Hrvatskoj je, u istom razdoblju, postotak prijevremenih porođaja bio između 5,19% i 7,88% svih porođaja, s tendencijom povećanja od 2008. godine (6). Etiologija prijevremenih porođaja heterogena je i povezana s različitim metaboličkim putevima u ljudskom tijelu. Za gotovo 50% prijevremenih porođaja uzrok je nepoznat.

Prijevremeni porođaji dijele se na tri podtipa (2). Prvi podtip su spontani prijevremeni porodi. Porod ima spontani početak, javlja se u populaciji bez ikakvog faktora rizika i dogodi se u 50% slučajeva svih prijevremenih porođaja. Sljedeći podtip su prijevremeni porođaji zbog preuranjene ruptуре amnionske membrane (PPROM), dogode se u 25% svih prijevremenih porođaja te se češće javljaju u populaciji Afroamerikanaca. U većini slučajeva nastaju kao posljedica infekcije. Poslijednji podtip su jatrogeni prijevremeni porodi prije 37 tjedana trudnoće. Nastaju zbog zdravstvenih razloga majke ili fetusa, ili drugih nemedicinskih razloga koji bi mogli ugroziti zdravlje majke i/ili fetusa (na primjer preeklampsija, placenta previa, abrupcija posteljice, višestruka trudnoća, dijabetes te ekstremno visok ili nizak indeks tjelesne težine majke); do jatrogenog prijevremenog poroda dolazi u 25% svih prijevremenih poroda.

1. UVOD

Postoje četiri glavna faktora koji dovode do prijevremenih trudova (7–10): 1) patološko rastezanje maternice; 2) stres majke (preuranjena aktivacija majčinske ili fetalne hipotalamično-hipofizne adrenalne osi); 3) abrupcija (decidualno krvarenje) i 4) infekcija/pretjerana upalna reakcija. Svi navedeni procesi mogu dovesti do skraćenja cerviksa i mogu započeti mnogo prije nego što se pokažu očiti znakovi prijevremenog poroda (11). Iako počinju na različitim krajevima patofiziologije prijevremenog poroda, završavaju na isti način, aktivirajući horiodecidnu reakciju, kontraktilnost maternice i promjene cerviksa. Studije su pokazale da je rizik od prijevremenog porođaja veći kod žena koje su rođene prijevremeno. Žene koje su imale prijevremeni porođaj izložene su većem riziku da ponovno rode prijevremeno. Nakon prvog prijevremenog porođaja, vjerojatnost drugog prijevremenog porođaja kod iste majke podiže se na 30-50% (12). Identifikacija trudnica s povećanim rizikom za prijevremeni porod bila bi od velike važnosti kako bi početak prijevremenog poroda mogli spriječiti prevencijom i pravovremenom terapijom.

Nedavni podaci sugeriraju da je progesteron važan u održavanju maternice u drugoj polovici trudnoće ograničavanjem proizvodnje stimulativnih prostaglandina i inhibiranjem ekspresije proteinskih gena povezanih sa kontrakcijom miometrija (ionski kanali, oksitocin i prostaglandinski receptori) (13,14). Iako se razine progesterona u majčinoj cirkulaciji ne mijenjaju značajno u tjednima koji prethode porođaju, početak porođaja u terminu i prije trudnoće povezan je s funkcionalnim povlačenjem aktivnosti progesterona na razini maternice (13–17). Podaci poput ovih pružaju osnovu za korištenje dodatka progesterona u svrhu sprječavanja prijevremenog poroda.

Kod žena s jednostrukom trudnoćom i poviješću spontanih prijevremenih porođaja, antenatalna progesteronska terapija najučinkovitija je strategija za smanjenje rizika od ponavljajućih prijevremenih poroda. Dodavanje progesterona korisno je kod ovih žena počevši od 16. do 24. tjedna trudnoće i nastavak od 34. tjedna gestacije (18–20). Vaginalni progesteron može se primijeniti kod žena koje nisu imale spontani prijevremeni porod, ako imaju duljinu cerviksa 20 mm ili manje prije 24. tjedna trudnoće. U randomiziranom, placebo kontroliranom pokusu, liječenje vaginalnim mikroniziranim progesteronom, 200 mcg dnevno, bilo je povezano sa 44%-tnim smanjenjem spontanih prijevremenih porođaja kod asimptomatskih žena s duljinom cerviksa od 15 mm ili manje na 20 do 25 tjedana trudnoće (20). Progesteron nije koristan kod višestrukih trudnoća.

1.2. Uloga progesterona i proces porođaja

Porođaj je pod kontrolom različitih hormonskih učinaka između fetusa, posteljice i majke. Jedan od esencijalnih hormona u započinjanju i održavanju trudnoće jest progesteron. Progesteron primarno luči žuto tijelo jajnika u vrijeme menstrualnog ciklusa žena i u manjoj mjeri kora nadbubrežne žlijezde. Oko 8. tjedna gestacije posteljica postaje primarno mjesto lučenja progesterona. Mjerenje progesterona u prvih 10 tjedana gestacije dobro je mjerilo za dijagnozu i liječenje jer suprimirane vrijednosti progesterona u prisutnosti mjerljivih hCG vrijednosti, ovisno o tjednu gestacije, mogu ukazati na rizik od pobačaja ili ektopičnu trudnoću.

Svoje fiziološke učinke progesteron iskazuje preko progesteronskih receptora (PGRs) (21). Postoje dva tipa progesteronskih receptora: nuklearni i membranski. Održavanjem trudnoće uglavnom se upravlja preko nuklearnih progesteronskih receptora jer su membranski progesteronski receptori manje osjetljivi na djelovanje progesterona (21). Progesteron svojim utjecajem na progesteronske receptore aktivira različite puteve i potiče ekspresiju drugih gena, što dovodi do aktivacije ili deaktivacije miometrija. Ti putevi uključuju aktiviranje određenih CAP (gena povezanih sa kontrakcijom), kao što su koneksin, ionski kanali (na primjer kalcijevi kanali), uterotoninski receptor i enzimi koji utječu na sintezu lokalnih prostaglandina (1).

Kako bi došlo do porođaja, moraju se dogoditi dvije veće promjene u ženskom reproduktivnom traktu. Prvu promjenu prolazi maternica, koja se pretvara u aktivni organ koji koordinira kontrakciju zajedno sa složenim isprepletenim mišićima, što rezultira redovitim kontrakcijama maternice. Ovo zahtijeva formiranje propusnih veza između stanica miometrija kako bi se omogućio prijenos kontraktilnog signala. Fetus može koordinirati taj prekidač u aktivnosti miometrija utjecajem na proizvodnju steroidnih hormona u placenti, mehaničkim odvajanjem maternice i izlučivanjem neurohipofiznih hormona i ostalih stimulatora sinteze prostaglandina (22).

Druga promjena odnosi se na cervikalno vezivno tkivo te glatke mišiće koji moraju biti u stanju dilatacije kako bi se omogućio prolazak fetusa iz maternice (22). Ove promjene popraćene su prebacivanjem dominacije s progesterona na estrogen, povećan je odgovor na oksitocin poboljšanjem regulacije oksitocinskog receptora miometrija, povećana je sinteza progesterona u maternici, poboljšavaju se međustanične veze miometrijskih stanica, smanjena

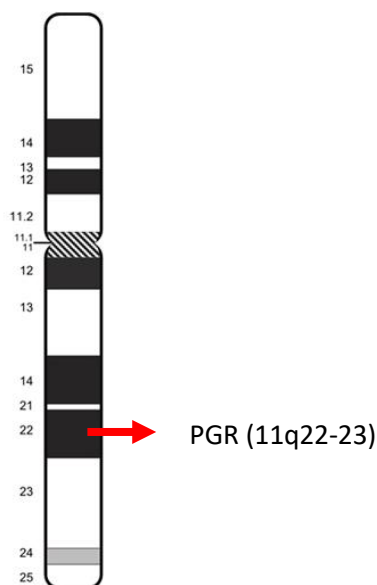
1. UVOD

je aktivnost dušikovog monoksida te povećan unos kalcija u miocite ATP ovisnim vezanjem miozina na aktin (23), povećanjem endotelina povećan je protok krvi u maternici i aktivnost miometrija.

Komplementarne promjene na grliću maternice uključuju pad progesterona i djelovanja prostaglandina i relaksina, izmjene vezivnog tkiva, kolagenolizom i smanjenjem stabilizacije kolagena pomoću inhibitora metaloproteinaze što sve dovodi do omekšavanja i dilatacije cerviksa (22). Nakon što ženski reproduktivni sustav prođe sve navedene promjene, dolazi do rađanja djeteta.

1.3. PROGINS alu insercija

Ljudski gen za progesteronski receptor smješten je na kromosomu 11q22-23. Sadrži osam egzona i sedam introna (A-G). Ovaj gen kodira dvije izoforme koje su identične, osim 165 dodatnih aminokiselina koje se nalaze na N-kraju B izoforme. Te izoforme reguliraju biološko djelovanje progesterona tako što izoforma A inhibira aktivaciju PR, dok izoforma B potiče aktivaciju PR (24,25).



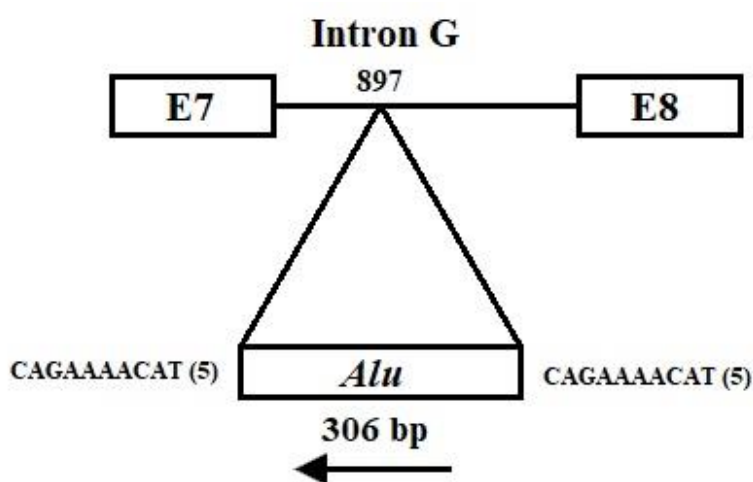
Slika 1. Ljudski gen za progesteronski receptor (PGR) na kromosomu 11q22-23. (prilagođeno prema kromosomskom dijagramu ISCN 2009. (26))

1. UVOD

PROGINS alel je česta genetička promjena u ljudskim progesteronskim receptorima. Prisutan je u više od 20% populacije i vrlo je dobro istražen kao genetička mutacija. Progesteronski receptori s PROGINS mutacijom manje su osjetljivi na aktivnost progesterona, a čini se da povlačenje progesterona uzrokuje početak porođajne kaskade (21).

Jedna od skupina znanstvenika, Romano i sur. (27), dokazala je da se PROGINS sastoji od alu insercije u intronu G i dvije točkaste mutacije; V660L u eksonu 4 (rs1042838 SNP) i H770H (tihom ili istovjetnom točkastom mutacijom) u eksonu 5 (rs1042839 SNP). Ove tri mutacije uvijek se javljaju zajedno te je, prema literaturnim podacima, za identifikaciju PROGINS mutacije dovoljno dokazati inserciju 306 pb u intronu G (alu inserciju). Mutacija introna G detektira se prisutnošću fragmenata 476 pb, dok prisustvo samo 170 pb fragmenata predstavlja alel divljeg tipa.

Alu insercija sadrži specifična mjesta koja polovično odgovaraju estrogenu / Sp1-vezujuće mjesto (Alu-ERE / Sp1), koje djeluje kao in-cis intronski pojačivač što dovodi do povećane transkripcije PROGINS alela kao odgovor na 17beta-estradiol (21). Također, alu insercije u ljudskom genomu često su metilirane. Neki podaci govore da PROGINS alu insercija ne utječe na transkripciju gena zbog metilacije DNA. Međutim, alu insercija smanjuje stabilnost transkripta PROGINS alela i ne generira varijante spajanja. PROGINS mutacija progesteronskih receptora manje reagira na progestin u usporedbi s najčešćim progesteronskim receptorima zbog smanjenih količina transkripta gena i smanjene aktivnosti proteina (27).



Slika 2. Prikaz PROGINS alu insercije u intronu G. (prilagođeno prema Rowe i sur. (28))

1. UVOD

U trudnoći se primjećuje utjecaj PROGINS-a u smanjenju učinkovitosti progesteronskih receptora na progesteron i povećan rizik za stanja povezana s prijevremenim porodom. Također, PROGINS alel se pokazao kao faktor rizika kod nekih pacijentica s karcinomom dojke i karcinomom endometrija (21).

2. HIPOTEZA

PROGINS alu insercija u genu za progesteronski receptor predstavlja genetički rizični čimbenik za prijevremeni porod.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Ispitati povezanost genske mutacije u progesteronskom receptoru (PROGINS alu insercija) i pojave spontanijh prijevremenijh poroda.
2. Utvrditi je li navedena mutacija genetički rizični čimbenik za prijevremeni porod.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno kao retrospektivno istraživanje parova.

4.2. Ispitanici

Ispitivana populacija u ovom istraživanju su roditelji s Klinike za ginekologiju i obstetriciju KBC Osijek. Istraživanje je provedeno na 200 ljudi. Ispitivana populacija sastoji se od 100 osoba (50 roditelji, 50 novorođenčadi). Roditelji su podijeljeni u nekoliko skupina: rani prijevremeni porodi (prije 28. gest. tjedna), umjereni prijevremeni porodi (28 -32.gest. tjedan) te kasni prijevremenih porodi (32.-37. gest. tjedan). Kriterij za isključivanje su jatrogeni prijevremeni porod (indukcije radi preeklampsije, dijabetesa i drugo). Kontrolnu skupinu od 100 uzoraka (50 roditelji, 50 novorođenčadi) čine terminske trudnice kojima je porod krenuo spontano. Sve osobe uključene u istraživanje su bijele rase.

Sve roditelji potpisale su informirani pristanak koji se nalazi u arhivu Laboratorija. Pri primitku u Laboratorij za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Osijek, uzorci su šifrirani jedinstvenim laboratorijskim oznakama.

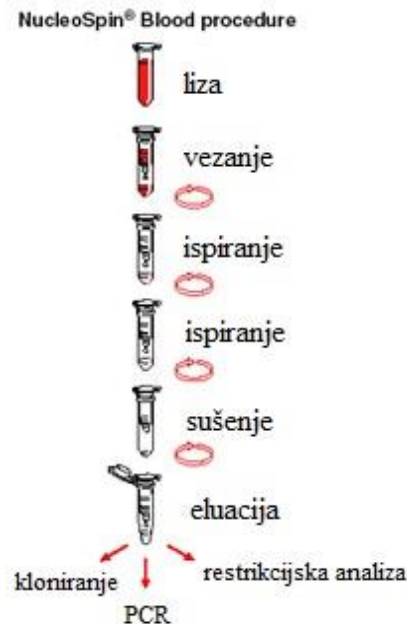
4.3. Metode

Nakon informiranog pristanka uzorkovala se krv trudnica jednokratno venepunkcijom, a krv novorođenčadi dobivena je iz pupčane vrpce. Krv je uzorkovana u epruvete s antikoagulansom EDTA. Uzorci su analizirani metodama koje se u radu Laboratorija za medicinsku genetiku koriste rutinski (izolacija DNA iz pune krvi, višestruka lančana reakcija polimerazom (PCR) te agarozna gel elektroforeza). DNA se do analize čuvala u AE puferu.

4.3.1. Izolacija DNA komercijalnim kitom NucleoSpin® Blood

NucleoSpin® Blood (Macherey-Nagel, Düren, Germany) komercijalni kit temelji se na posebno obrađenoj silicijevoj membrani s visokim kapacitetom vezanja nukleinskih kiselina. Dobivena DNA može se izravno upotrijebiti za PCR, Southern blotting, ili bilo koju vrstu enzimatskih reakcija. Kit omogućuje izolaciju 4–6 µg čiste genomske DNA od 200 µL pune krvi s omjerom čistoće A260/A280 između 1,60 i 1,90 te tipičnom koncentracijom od 40-60 ng po µL.

Pomoću kita NucleoSpin® Blood pripremljena je genomska DNA iz pune krvi. Prvi korak bilo je pipetiranje 25 µl Proteinaze K i 200 µl krvi u epruvetu od 1,5 ml. Sljedeći korak je dodavanje 200 µl pufera (Buffer B3) u epruvetu. Liza je postignuta inkubacijom pune krvi na 70°C u otopini koja sadrži velike količine kaotropnih iona u prisutnosti proteinaze K. Odgovarajući uvjeti za vezanje DNA na silicijsku membranu NucleoSpin® krvnih kolona stvoreni su dodavanjem 210 µl etanola u svaki uzorak. Proces vezanja je reverzibilan i specifičan za nukleinske kiseline. Kontaminacije su uklonjene ispiranjem s dva različita pufera (Buffer BW i Buffer B5). Čista genomska DNA konačno je eluirana pod uvjetima niske ionske snage u blago alkalnom elucijskom puferu (Elution Buffer BE). Vrijeme pripreme genomske DNA iz krvi s NucleoSpin® Blood bilo je manje od 30 minuta.



Slika 3. NucleoSpin® Blood mini spin kolona – shema postupka (prilagođeno prema priručniku NucleoSpin® Blood (29))

4.3.2. Provjera čistoće izolirane DNA pomoću Qubit™ Fluorometra

Čistoću izolirane DNA provjerili smo pomoću Qubit fluorometra (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Qubit™ Fluorometer je stacionarni fluorometar koji se može koristiti za kvantifikaciju DNA, RNA i proteina te za mjerenje integriteta i kvalitete DNA i RNA pomoću visoko osjetljivih i točnih Qubit™ testova na bazi fluorescencije. Koncentracija ciljanih molekula očitava se pomoću fluorescentne boje koja emitira signal samo kada se veže na ciljani molekulu, što minimalizira utjecaj onečišćenja na rezultat, uključujući degradiranu DNA ili RNA.

Uzorak se prije mjerenja dodaje u radnu otopinu u kojoj se nalazi fluorescentna boja. Dobivena otopina je izmiješana i inkubirana pri sobnoj temperaturi 5 minuta. Nakon što je na uređaju izabran odgovarajući tip analize, uređaj započinje mjerenje koncentracija prvog i drugog standarda. Kada su određeni standardi, slijedi mjerenje koncentracije uzoraka. Vrijeme potrebno za mjerenje koncentracija DNA, RNA ili proteina iznosi manje od 5 sekundi, a volumen uzorka koji je potreban za mjerenje koncentracije iznosi 1 µL.

4.3.3. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze prema Qiagen komercijalnom kitu (Taq PCR Core Kit)

Lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) metoda je kojom se DNA umnožava u velik broj identičnih kopija, a temelji se na enzimskoj reakciji DNA polimeraze. PCR je osjetljiva i specifična metoda. Potrebno je poznavati slijed nukleotida odsječka DNA koji se umnaža kako bi se mogle kreirati početnice (engl. primers).

Početnice su sintetizirane molekule DNA duljine 18 - 24 parova baza. Korištene su dvije početnice koje započinju sintezu u suprotnim smjerovima na komplementarnim lancima DNA. Početnice su odabrane prema protokolu opisanom u istraživanju Agoulnik i sur. (2004) u kojem se amplificira Intron G u genu za progesteronski receptor.

Korištene početnice su: {Forward: 5'GCCTCTAAAATGAAAGGCAGAAAGC3'i
Reverse: 5'GTATTTTCTTGCTAA ATGTCTC3'}, kako bi se umnožio intron G gena za progesteronski receptor.

4. ISPITANICI I METODE

DNA je umnožena do količine dovoljne za analizu upotrebom komercijalnog kita prema protokolu proizvođača Taq PCR Core Kit (Qiagen, Hilden, Germany) na uređaju AB Applied BioSystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Reakcijska smjesa sadržava Qiagen PCR pufer, smjesu dNTP-a, (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), dvije početnice, termostabilnu Taq DNA polimerazu te kalup DNA. PCR reakcija izvedena je u reakcijskom volumenu od 25 μ l.

Denaturacija molekule DNA odvija se pri temperaturi od 95°C kroz 15 minuta, pritom dolazi do razdvajanja lanaca dvostruke uzvojnice DNA kalupa. Slijedi 30 ciklusa: 94°C, 1 min, temperatura se snižava na 50°C na 1 minutu, kako bi došlo do vezanja početnica na lance DNA-kalupa. Pri 72°C kroz 1 minutu, DNA polimeraza sintetizira lanac DNA komplementaran kalupu početnica. Slijedi završno produljenje lanaca tijekom 10 min na 72°C. U svakoj PCR reakciji korištena je slijepa proba (destilirana voda umjesto kalupa DNA) kao kontrola. Jednim ciklusom umnažanja iz svake molekule kalupa nastaju dvije identične molekule DNA.



Slika 4. Uređaj za PCR 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems korišten u istraživanju (fotografija snimljena u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku, kolovoz 2019.)

4.3.4. Agarozna gel elektroforeza

Za detekciju fragmenata nakon PCR reakcije korištena je agarozna gel elektroforeza. Za pripremu 2%-tnog agaroznog gela, trebalo je dodati 0,6 g izvagane agaroze u 30 ml 1xTBE pufera. Otopina se do vrenja zagrijavala u mikrovalnoj pećnici. Važno je pripaziti da ne otopina ne ključa dugo kako ne bi isparila. Nakon što je otopina proključala dodana su 3 μL boje *Sybr Safe*. Dodavanjem boje *Sybr Safe*, otopina je postala blago narančaste boje. Mješavina se ohladila na približno 40 °C i ulivena je u pripremljenu kadnicu. Na kadnicu sa gelom stavljen je češalj za jažice. Agarozni gel se ostavi polimerizirati 20 min. Gel mora biti zaštićen od svjetlosti jer se učinkovitost *Sybr Safe* boje smanjuje pod utjecajem svjetla. Nakon što se gel polimerizirao, češalj za jažice je odvojen od gela, a agarozni gel stavljen je u uređaj za elektroforezu. Jažice za uzorke moraju biti na strani anode, kako bi se tijekom elektroforeze negativno nabijene molekule kretale prema katodi. Na agarozni gel treba uliveno je 1x TBE pufera volumena dovoljnog da pufer prekrije gel. DNA uzorci pomiješani su s bojom za nanošenje (DNA loading Dye, Lonza Group AG, Basel, Switzerland) na način da se stavi 3 μL boje i 15 μL uzorka DNA. Marker koji je korišten je SimplyLoad 100bp DNA Ladder. U prvu jažicu nanosena je slijepa proba, a u zadnju jažicu 5 μL markera. Između jažice sa slijepom probom i jažice s markerom nanoseni su DNA uzorci. Kada su nanoseni svi uzorci, zatvoren je uređaj za elektroforezu i spojen na protok struje od 80 V u periodu od 90 min.

Nakon završene elektroforeze, DNA vrpce vizualizirane su pomoću UV transiluminatora (UVITEC, Cambridge, UK) i *Sybr Safe* boje. Rezultati su fotografirani i dokumentirani pomoću sustava za snimanje gelova Image Quant 150 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden).

4.3.5. Statističke metode

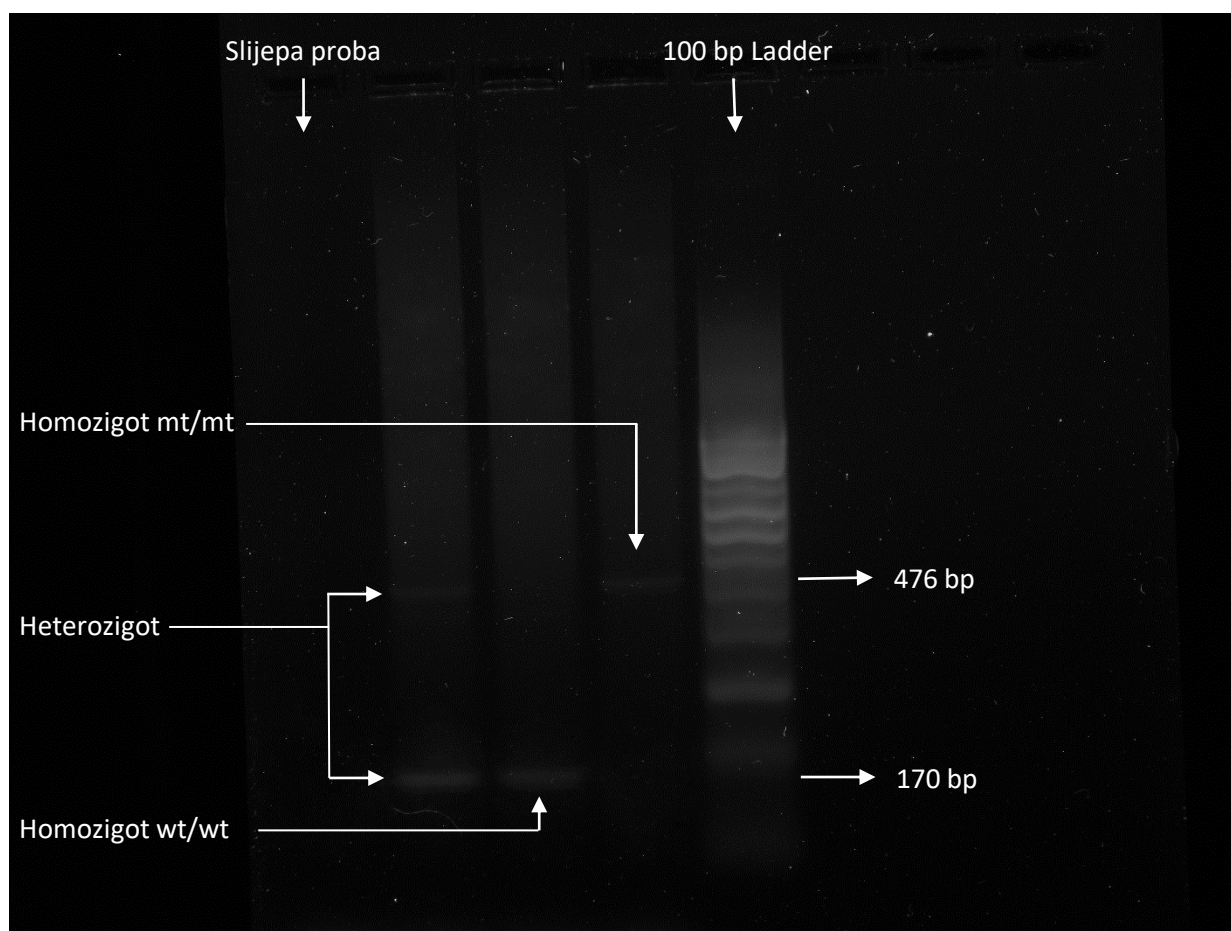
Napravljena je deskriptivna statistička obrada. Kategorijski podaci su predstavljeni apsolutnim relativnim frekvencijama, a numerički podaci opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu, a u ostalim slučajevima

4. ISPITANICI I METODE

medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Za statističku obradu kvalitativnih vrijednosti korišten je χ^2 -test, dok je za statističku obradu kvantitativnih vrijednosti korišten Student t-testu u slučaju normalne razdiobe, a u slučaju izostanka normalne razdiobe korišten je Mann-Whitney U test. Statistička analiza obrađena je u programu MedCalc Statistical Software verzija 18 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>;2019). Razina značajnosti postavljena je na $p = 0,05$.

5. REZULTATI

Na temelju rezultata nastalih analizom 200 uzoraka krvi (100 ispitanici, 100 kontrolna skupina), svakom uzorku dodijeljen je odgovarajući genotip. Mutacija u Intronu G otkrivena je prisutnošću fragmenata 476 bp, dok je prisutnost samo fragmenata 170 bp predstavljala alel divljeg tipa. Osobe s insercijom u intronu G na oba alela odgovaraju genotipu mutiranog homozigota (homozigot mt/mt). Osobe koje imaju inserciju u intronu G samo na jednom alelu, a drugi alel je bez mutacije, odgovaraju genotipu heterozigota. Osobe koje nemaju inserciju u intronu G niti na jednom alelu odgovaraju genotipu homozigota divljeg tipa (homozigot wt/wt).



Slika 5. Mutacija u Intronu G otkrivena je prisutnošću fragmenata 476 bp, dok je prisutnost samo fragmenata 170 bp predstavljala alel divljeg tipa. (fotografija snimljena u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku, kolovoz 2019.)

5.1. Prikaz anamnestičkih podataka roditelja

Tablica 1. prikazuje prosječne vrijednosti dobi, trajanja trudnoće u tjednima i indeksa tjelesne težine po skupinama ovisno o terminu poroda roditelja. Dob roditelja, kao i indeks tjelesne težine koji mogu biti rizični čimbenici prijevremenog poroda, u ovom slučaju nisu se pokazali kao takvi. U skupinama roditelja koje su rodile prijevremeno nalazi se podjednak broj pretilih roditelja kao i u skupini roditelja koje su rodile u terminu. Pothranjenih roditelja nema ni u jednoj skupini.

Tablica 1. Prikaz anamnestičkih podataka roditelja (prosječne vrijednosti pojedinih podataka o roditeljama po skupinama)

	Terminske trudnice (N)	Rani prijevremeni porod (N)	Umjereni prijevremeni porod (N)	Kasni prijevremeni porod (N)
Trajanje trudnoće u tjednima i danima	39+2	26+2	29+6	35
Dob	31,56 (50)	28,25 (8)	28,64 (11)	32,21 (31)
Idealna tjelesna težina (BMI 20-25)	23 (20)	23,25 (2)	22,48 (6)	23,65 (12)
Prekomjerna tjelesna težina (BMI 25-30)	27,36 (19)	26,53 (4)	27,33 (3)	26,86 (16)
Pretilost (BMI >30)	32,98 (11)	30,5 (2)	31,7 (2)	33,67 (3)

5.2. Prikaz učestalosti genotipova po skupinama

U tablicama 2 i 3. prikazane su apsolutne i relativne frekvencije genotipova ispitanika i kontrola. Uspoređeni su genotipovi ispitanika i kontrola, odnosno učestalost PROGINS alu insercije kod roditelja koje su rodile prijevremeno i njihove djece, kao i učestalost PROGINS alu insercije kod kontrolne skupine.

Tablica 2. sadrži podatke s kojima su uspoređene majke iz kontrolne skupine i ispitanice ($\chi^2 = 1.392$, $p = 0.8456$); dok se tablica 3. odnosi na usporedbu djece iz kontrolne skupine i djece ispitanika ($\chi^2 = 2.997$, $p = 0.558$). Dobiveni rezultati prate normalnu razdiobu.

5.REZULTATI

Nakon statističke analize χ^2 - testom u programu MedCalc i dobivenih vrijednosti utvrđeno je da nema značajne razlike između ispitanika i kontrolne skupine ($\chi^2 = 2.447, p = 0.654$).

Tablica 2. Prikaz učestalosti genotipova po skupinama ovisno o terminu poroda (majke).

GENOTIP (rodilje)	Terminski porod (N _{uk} *=50)	Rani prijevremeni porod (N _{uk} =8)	Umjereni prijevremeni porod (N _{uk} =11)	Kasni prijevremeni porod (N _{uk} =31)
	AF (RF %)†	AF (RF %)†	AF (RF %)†	AF (RF %)†
Heterozigot	11 (22)	1 (12,5)	0 (0)	11 (35,48)
Homozigot wt/wt	38 (76)	5 (62,5)	10 (90,9)	20 (64,52)
Homozigot mt/mt	1 (2)	2 (25)	1 (9,1)	0 (0)

*N_{uk} – ukupan broj rodilja u skupini

† AF (RF %) – apsolutna i relativna frekvencija (χ^2 - test)

Tablica 3. Prikaz učestalosti genotipova po skupinama ovisno o terminu poroda (djeca).

GENOTIP (djeca)	Terminski porod (N _{uk} *=50)	Rani prijevremeni porod (N _{uk} =8)	Umjereni prijevremeni porod (N _{uk} =11)	Kasni prijevremeni porod (N _{uk} =31)
	AF (RF %)†	AF (RF %)†	AF (RF %)†	AF (RF %)†
Heterozigot	12 (24)	5 (62,5)	2 (18,18)	11 (35,48)
Homozigot wt/wt	35 (70)	3 (37,5)	9 (81,82)	18 (58,06)
Homozigot mt/mt	3 (6)	0 (0)	0 (0)	2 (6,46)

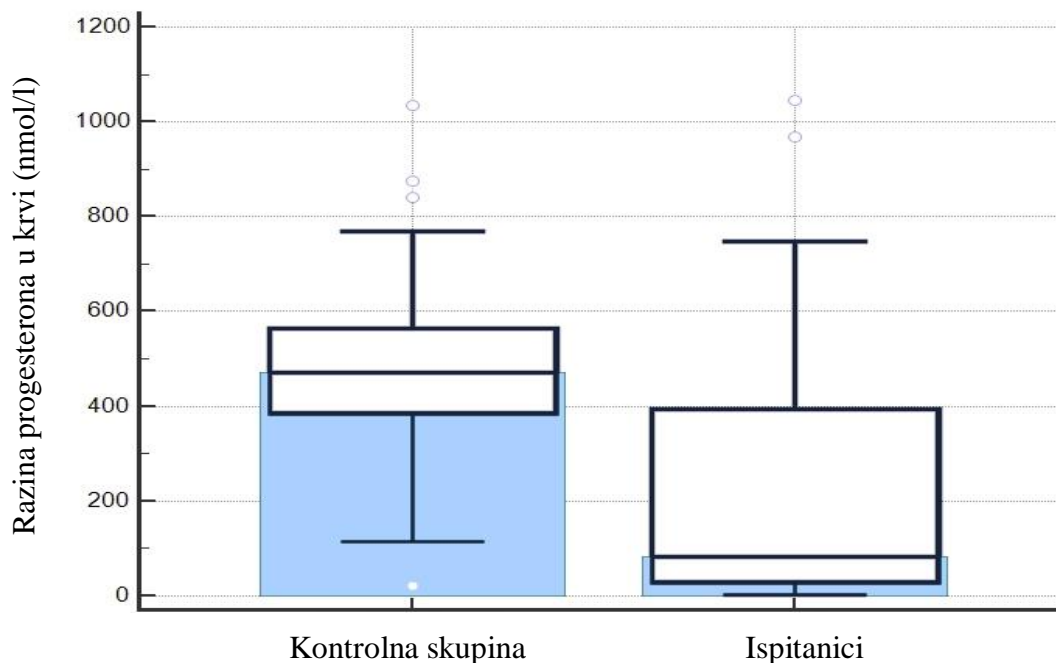
*N_{uk} – ukupan broj djece u skupini

† AF (RF %) – apsolutna i relativna frekvencija (χ^2 - test)

5.3. Razina progesterona u krvi majki pri porodu

Rodiljama je pri porodu izmjerena razina progesterona u krvi. Kod rodilja koje su rodile prijevremeno ne postoji normalna razdioba. Najniža razina progesterona kod rodilja koje su rodile prijevremeno iznosi 1,92 nmol/l, a najviša razina iznosi 1046,58 nmol/l.

Nasuprot tome, kod terminskih trudnica uočena je normalna razdioba u razini progesterona te je aritmetička sredina razine progesterona roditelja koje su rodile u terminu iznosila 484,54 nmol/l.



Slika 6. Usporedba izmjerenih razina progesterona kontrolne skupine i roditelja koje su rodile prijevremeno. Vrijednosti progesterona kontrolne skupine prate normalnu razdiobu, za razliku od skupine roditelja koje su rodile prijevremeno.

U tablici 4. nalaze se prosječne vrijednosti izmjerenog progesterona trudnica pri porodu, ovisno o terminu poroda. U slučaju normalne razdiobe korištena je aritmetička sredina i standardna devijacija, dok je u slučaju odstupanja od normalne razdiobe korišten medijan i granice interkvartilnog raspona. Pomoću statističke analize Mann-Whitney U testom za nezavisne uzorke dobivena je vrijednost $p < 0.0001$, što potvrđuje značajnu razliku u razinama izmjerenog progesterona za kontrolnu skupinu i skupinu ispitanika.

Tablica 4. Prikaz prosječnih vrijednosti progesterona po skupinama ovisno o terminu poroda trudnice.

	Terminske trudnice (nmol/l)	Rani prijevremeni porod (nmol/l)	Umjereni prijevremeni porod (nmol/l)	Kasni prijevremeni porod (nmol/l)
Razina progesterona	484,54 ±192,28	27,41 (15,9-97,1)	68 (36,4-332,7)	283,4 (45,6-471,2)

5.REZULTATI

Referentne vrijednost za progesteron iznose 314,82-1087,56 nmol/l za terminski porod te 50,18-467,46 nmol/l za preuranjeni porod (30). U kontrolnoj skupini (N=50) nalazi se sedam trudnica čije vrijednosti progesterona nisu u granicama referentnih vrijednosti, ali nisu od patološkog značaja. Kod skupine roditelja koje su imale rani prijevremeni porod (N=8) pet je roditelja čije su vrijednosti progesterona ispod referentnih intervala, a u skupini roditelja koje su imale umjereni prijevremeni porod (N=11) nalaze se četiri roditelje čije su vrijednosti progesterona ispod referentnih intervala. U zadnjoj skupini roditelja, roditelja kasnog prijevremenog poroda (N=31), devet je roditelja koje imaju vrijednost progesterona ispod granice referentnog intervala te osam roditelja čija je vrijednost progesterona iznad granice referentnog intervala.

Značajne razlike i odstupanja su očekivani budući da se radi o usporedbi terminskog poroda s prijevremenim porodom. Progesteron može imati ulogu u pokretanju prijevremenog poroda s obzirom na to da je dokazano da se porođaj može inducirati inhibicijom njegove aktivnosti.

6. RASPRAVA

Temeljem provedenog istraživanja može se zaključiti da PROGINS alu insercija u genu za progesteronski receptor ne utječe značajno na vrijeme u kojem će trudnica roditi. Iz navedenog proizlazi da rezultati istraživanja provedenog na 200 ljudi pokazuju da navedena mutacija progesteronskog receptora (PROGINS alu insercija) ne predstavlja genetički rizični čimbenik za prijevremeni porod.

Dobiveni rezultati ne slažu se s ostalim provedenim studijama. Neke studije (Langmia i sur., 2015; Ehn i sur., 2007; Tiwari i sur., 2014; Mann i sur., 2012.) (31–34) otkrile su da mutacije progesteronskih receptora imaju značajan utjecaj na modulaciju prijevremenog porođaja. Postoji mogućnost da mutacija majčinog ili fetalnog PGR gena dovede do razlike i, prema tome, prijevremenog porođaja. Ehn i sur. (32) otkrili su da mutacija u fetalnom i majčinskom PRG pridonosi većoj mogućnosti prijevremenog porođaja. Ostale studije samo su potvrdile da žene s tim mutacijama imaju veći rizik od prijevremenog porođaja.

U rezultatima dobivenim u ovom istraživanju uočeno je da je povezanost između genotipa novorođenčadi i majki značajna te iz tog proizlazi zaključak da je genetski utjecaj oca na rizik za prijevremeni porođaj minimalan. Dobiveni rezultati slažu se s opsežnom studijom provedenoj u Švedskoj 2010. godine. Navedena studija pokazala je da su i majčini i fetalni geni uključeni u rizik za prijevremeni porođaj (35,36). Fetalni genetski faktori činili su 13,1% varijacije u gestacijskoj dobi tijekom porođaja, dok su genetski čimbenici majki činili 20,6% (34). Drugo istraživanje, Svensson i sur., pokazalo je da je 25% varijacija prijevremenih porođaja objašnjeno genetičkim učincima majke, a 5% fetalnim genetskim učinkom (37). Ovo istraživanje, kao i druga istraživanja, pokazalo je da je očev genetički utjecaj na rizik za prijevremeni porođaj minimalan (do 5%) ili da uopće nema utjecaja. Ta je činjenica u neskladu s dvije norveške studije (38,39). U istoj studiji Svensson i sur. (37) pokazano je da je fetalni genetski učinak veći ako je prijevremeni porod uzrokovan iz medicinskih razloga.

Osim toga, dokazano je da mutacije progesteronskih receptora različito utječu na porođaj, ovisno o rasi. U provedeno istraživanje bile su uključene samo bjelkinje, stoga iz dobivenih rezultata ne možemo usporediti koliki utjecaj u riziku za prijevremeni porod ima

rasa. Međutim, studije su pokazale da je postotak prijevremenih porođaja veći u populaciji Afroamerikanaca nego u populaciji bijelaca (4,5).

Također, rođiljama je pri porodu mjerena razina progesterona u krvi budući da progesteron može imati ulogu u pokretanju prijevremenog porođaja s obzirom na to da je dokazano da se porođaj može inducirati inhibicijom njegove aktivnosti. Razine progesterona u provedenom istraživanju ne slažu se sa studijom koja kaže da su zabilježene veće razine progesterona u serumu u 28.-32-og tjedna trudnoće kod žena koje su imale prijevremeni porođaj (40). U dobivenim rezultatima razina progesterona kod rođilja umjerenih prijevremenih poroda je kod gotovo polovice rođilja niža od referentnog intervala. Izmjerene razine progesterona u krvi rođilja koje su rodile prijevremeno i rođilja koje su rodile u terminu razlikuju se, ali nisu patološke te stoga nisu od velikog značaja. Dob rođilja, kao i indeks tjelesne težine koji mogu biti rizični čimbenici prijevremenog poroda, u ovom slučaju nisu se pokazali kao takvi.

Budući da se rezultati provedenog istraživanja u sklopu ovog završnog rada ne slažu sa prethodno provedenim studijama, u budućnosti bi trebalo ponoviti istraživanje na većoj skupini ispitanika kako bi povećali vjerojatnost za dokazivanje povezanosti PROGIN5 alu insercije s prijevremenim porodom žena koje nose navedenu mutaciju na progesteronskom receptoru.

7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja, u kojem su ispitanici bile 50 rodilja koje su rodile prijevremeno te njihova novorođenčad rođena prijevremeno i kontrolna skupina od 50 terminskih trudnica i njihova novorođenčad rođena na vrijeme, može se zaključiti da nema značajne razlike u učestalosti PROGINS alu insercije između ispitanika i kontrolne skupine. Iz navedenih rezultata istraživanja možemo zaključiti da PROGINS alu insercija u genu za progesteronski receptor ne utječe značajno na prijevremeni porod, stoga navedena mutacija ne predstavlja genetički rizični čimbenik za prijevremeni porod.

8. SAŽETAK

HIPOTEZA: PROGINS alu insercija u genu za progesteronski receptor predstavlja genetički rizični čimbenik za prijevremeni porod.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA: Ciljevi ovog istraživanja bili su ispitati povezanost genske mutacije u progesteronskom receptoru (PROGINS alu insercija) i pojave spontanih prijevremenih poroda i utvrditi je li navedena mutacija genetički rizični čimbenik za prijevremeni porod.

USTROJ STUDIJE: Retrospektivno istraživanje parova.

ISPITANICI I METODE: Ispitivana populacija u ovom istraživanju su roditelje s Klinike za ginekologiju i obstetriciju KBC Osijek. Ispitivana populacija trudnica koje su rodile prijevremeno sastoji se od 100 uzoraka (50 roditelje, 50 novorođenčad). Kontrolnu skupinu (50 roditelje, 50 novorođenčad) čine terminske trudnice kojima je porod krenuo spontano. Kriterij za isključivanje su jatrogeni prijevremeni porod (indukcije radi preeklampsije, dijabetesa i drugo). Uzorkovala se krv trudnica jednokratno venepunkcijom, a krv novorođenčadi dobivena je iz pupčane vrpce. DNA je izolirana iz pune krvi komercijalnim spin kolonama te primjenom PCR-a i elektroforeze ispitano postojanje PROGINS alu insercije. Rezultati su statistički analizirani.

REZULTATI: Svakom uzorku dodijeljen je odgovarajući genotip. Nakon statističke analize uočeno je da nema značajne razlike u učestalosti PROGINS alu insercije između ispitanika i kontrolne skupine. Usporedba roditelja iz kontrolne skupine i roditelja ispitanica ($p = 0.8456$); usporedba djece iz kontrolne skupine i djece ispitanika ($p = 0.558$). Korišteni su Hi kvadrat test, Student t-test te Mann-Whitney U test za nezavisne uzorke. Razina značajnosti postavljena je na $p = 0,05$.

ZAKLJUČAK: Iz navedenih rezultata istraživanja možemo zaključiti da PROGINS alu insercija u genu za progesteronski receptor ne predstavlja rizični čimbenik za prijevremeni porod.

KLJUČNE RIJEČI: prijevremeni porod; progesteron; progesteronski receptor; progins alu insercija

9. SUMMARY

The influence of progins alu insertion on the function of progesterone receptors and the modulation of premature delivery risk

HYPOTHESIS: PROGINS alu insertion in the progesterone receptor gene is a genetic risk factor for preterm delivery.

OBJECTIVES: The objectives of this study were to investigate the association of gene mutation in the progesterone receptor (PROGINS alu insertion) with the occurrence of spontaneous preterm birth and to determine whether the mutation is a genetic risk factor for preterm delivery.

STUDY DESIGN: Retrospective study.

PARTICIPANTS AND METHODS: The study population in this study is a maternity ward from the Clinic for Gynecology and Obstetrics, Clinical Hospital Center Osijek. The study population of pregnant women who gave birth prematurely consists of 100 samples (50 women giving birth, 50 newborns). The control group (50 women giving birth, 50 newborns) consists of term pregnant women who have given birth spontaneously. Exclusion criteria are iatrogenic preterm delivery (induction for preeclampsia, diabetes and more). The blood of pregnant women was sampled by venipuncture, and the blood of newborns was obtained from the umbilical cord. DNA was isolated from whole blood by commercial spin columns and the existence of PROGINS alu insertion was examined using PCR and electrophoresis. The results were statistically analyzed.

RESULTS: Each sample was assigned a corresponding genotype. After the statistical analysis, it was found that there was no significant difference in the frequency of PROGINS alu insertion between the subjects and the control group. Comparison of maternity control and respondent groups ($p = 0.8456$); comparison of children from the control group and children of the subjects ($p = 0.558$). Tests that were used are Chi-squared test, Student t-test and Mann-Whitney U test for independent samples. The significance level was set at $p = 0.05$.

CONCLUSION: From the aforementioned research results we can conclude that PROGINS alu insertion in the progesterone receptor gene is not a genetic risk factor for preterm delivery.

KEYWORDS: preterm delivery, progesterone; progesterone receptor, progins alu insertion

10. LITERATURA

1. Wen SW, Smith G, Yang Q, Walker M. Epidemiology of preterm birth and neonatal outcome. *Semin Fetal Neonatal Med* 2004;6:429-35.
2. Moutquin JM. Classification and heterogeneity of preterm birth. *BJOG -Int J Obst Gy* 2003;110:30-3.
3. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, Adler A, Garcia CV, Rohde S, Say L, Lawn J. National, regional, and world wide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet* 2012;379:2162-72.
4. Anum EA, Springel EH, Shriver MD, Strauss JF. Genetic contributions to disparities in preterm birth. *Pediatric Res* 2009;65:1-9
5. Sheikh IA, Ahmad E, Jamal MS, Rehan M, Assidi M, Tayubi IA, et al. Spontaneous preterm birth and single nucleotide gene polymorphisms: a recent update. *BMC Genomics* [Internet]. 2016 Oct 17. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5073925/>. Datum pristupa: 5.8.2019.
6. Stanojević M. Prevention of preterm birth – neonatologists' point of view. *Paediatr Croat*, 2016;60:137-45.
7. Romero R, Espinoza J, Kusanovic J, Gotsch F, Hassan S, Erez O, Chaiworapongsa T, Mazor M. The preterm parturition syndrome. *BJOG Int J Obst Gy* 2006;113:17-42.
8. Gotsch F, Romero R, Erez O, Vaisbuch E, Kusanovic JP, Mazaki-Sovi T, Kim SK, Hassan S, Yeo L. The preterm parturition syndrome and its implications for understanding the biology, risk assessment, diagnosis, treatment and prevention of preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009; 22: 5-23..
9. Lockwood CJ, Kuczynski E. Markers of risk for preterm delivery. *J Perinat Med* 1999; 27(1):5-20.

10. LITERATURA

10. Risk stratification and pathological mechanisms in preterm delivery. - PubMed - NCBI
Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520402>. Datum pristupa: 5.8.2019.
11. Moroz LA., Sihman HN. Rate of sonographic cervical shortening and biologic pathways of spontaneous preterm birth. *AmJ Obstet Gynec* 2014;210.6:555. e1-555. e5.
12. Laughon SK, Albert PS, Leishear K, Mendola P. The NICHD Consecutive Pregnancies Study: recurrent preterm delivery by subtype. *Am J Obstet Gynecol* 2013;210:131.e1–8.
13. Norwitz ER, Robinson JN, Challis JRG. The control of labor. *N Engl J Med*. 1999;341:660–666.
14. Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev*. 2000;21:514–550
15. Condon JC, Jeyasuria P, Faust JM, et al. A decline in the levels of progesterone receptor coactivators in the pregnant uterus at term may antagonize progesterone receptor function and contribute to the initiation of parturition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:9518–9523.
16. Oh SY, Kim CJ, Park I, et al. Progesterone receptor isoform (A/B) ratio of human fetal membranes increases during term parturition. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193:1156–1160.
17. Mesiano S, Wang X, Norwitz ER. Progesterone receptors in the human pregnancy uterus: do they hold the key to birth timing? *Reprod Sci*. 2011;18:6–19
18. Hassan SS, Romero R, Vidyadhari D, et al. for the PREGNANT Trial, authors. Vaginal progesterone reduces the rate of preterm birth in women with a sonographic short cervix: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011;38:18–31
19. Iams JD. Clinical practice. Prevention of preterm parturition. *N Engl J Med* 2014;370: 254–261.

10. LITERATURA

20. Fonseca EB, Celik E, Parra M, et al. Fetal Medicine Foundation Second Trimester Screening Group. Progesterone and the risk of preterm birth among women with a short cervix. *N Engl J Med.* 2007;357:462–469
21. Kadivnik M, Muller A, Vranješ IM, Šijanović S, Wagner J. PROGINS Mutation of Progesterone Receptors and Its Role in Premature Birth – An Overview. *Southeast Eur Med J.* 2017;55–70.
22. Kota SK, et al. Endocrinology of parturition. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013;17:50–59. doi: 10.4103/2230-8210.107841.
23. Pauerstein CJ, Zauder HL. Autonomic innervation, sex steroids and uterine contractility. *Obstet Gynecol Surv.* 1970;25:617–30.
24. Gimenes C, Bianco B, Mafra FA, Rosset V, Christofolini DM, Barbosa CP. The progins progesterone receptor gene polymorphism is not related to endometriosis-associated infertility or to idiopathic infertility. *Clinics.* 2010;65:1073–6
25. Mani SK, Oyola MG. Progesterone signaling mechanisms in brain and behavior. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:7. Published 2012 Jan 30. doi:10.3389/fendo.2012.00007
26. Chia N. Chromosome 11 diagrams. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.* ISCN 2009. Dostupno na adresi: <http://atlasgeneticsoncology.org/ISCN09/Chrom11ISCN09.html>
Datum pristupa: 23.7.2019.
27. Romano A, Delvoux B, Fischer DC, Groothuis P. The PROGINS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. *JMol Endocrinol* 2007;38:331-50.
28. Rowe SM, Coughian SJ, McKenna NJ, Garrett E, Kieback DG, Carney DN, et al. Ovarian carcinoma-associated TaqI restriction fragment length polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. *Cancer Res.* 1995;55:2743-2745
29. NucleoSpin Blood priručnik. Dostupno na adresi: <https://www.mnnet.com/ProductsBioanalysis/DNAandRNApurification/DNA/DNAfro>

mbloodandbiologicalfluids/NucleoSpinBlood/tabid/1343/language/en-US/Default.aspx
Datum pristupa: 29.7.2019.

30. Cunningham, F. G., Leveno, K. J., Bloom, S. L., Spong, C. Y., Dashe, J. S., Hoffman, B. L., Sheffield, J. S. (2014). *Williams obstetrics*(24th edition.). New York: McGraw-Hill Education.
31. Langmia IM, Apalatomy YD, OmarSZ, Mohamed Z. Progesterone Receptor(PGR) gene polymorphism is associated with susceptibility to preterm birth.BMC Med Genet 2015;16:63.
32. Ehn NL, Cooper ME, Orr K, Shi, MIN, Johnson MK, Capria D, Dagle J, Steffen K, Johnson K, Marazita ML, Merrill D, Murray JZ. Evaluation of fetal and maternal genetic variation in the progesterone receptor gene for contributions to preterm birth. *PediatrRes* 2007;62 (5):630
33. 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.*MetaGene* 2015;3:31-42
34. Mann PC, Cooper ME., Ryckman KK., Comas B, Gili J, Crumley S, Bream ENA, Byers HM, Piester T, Schaefer A, Christine PJ, Lawrence A, Schaa LL, Kelsey KLP, Berends SK; Momany AM, Gadow E, Cosentino V, Castilla EE, Lopez Camelo L, Saleme C, Day LJ, England SK, Marazita ML, Dahgle JM, Murray JC. Polymorphisms in the fetal progesterone receptor and a calcium-activated potassium channel isoform are associated with preterm birth in an Argentinian population. *J Perinatol* 2013;33:336-40.
35. Swaggart KA, Pavlicev M, Muglia LJ. Genomics of preterm birth. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;5:a023127.
36. York TP, Eaves LJ, Lich P, Neale MC, Svensson A, Latendresse S, Langstrom N, Strauss JF. Fetal and maternal genes' influence on gestational age in a quantitative genetic analysis of 244,000 Swedish births. *Am J Epidemiol* 2013; 178: 543–55.
37. Svensson AC, Sandin S, Cnattingius S, Reilly M, Pawitan Y, Hultman CM, Lichtenstein P. Maternal Effects for Preterm Birth: A Genetic Epidemiologic Study of 630,000 Families. *Am J Epidemiol* 2009;170(11);1365–72.

10. LITERATURA

38. Lunde A, Melve KK, Gjessing HK, Skjærven R, Irgens LM. Genetic and environmental influences on birth weight, birth length, head circumference, and gestational age by use of population-based parent-offspring data. *Am J Epidemiol* 2007;165(7):734-41.
39. Lie RT, Wilcox AJ, Skjærven R. Maternal and paternal influences on length of pregnancy. *Obstet Gynecol* 2006;107(4):880-5.
40. Feng T, Allen JC, Ng MJ, Yeo GSH, Kwek KYC, Chern BSM, et al. The association between serum progesterone level and preterm delivery. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet*. 2018 Sep;142(3):308–14.

11. ŽIVOTOPIS

SARA CIBOK

Datum i mjesto rođenja:

- 8.7.1997., Virovitica

Obrazovanje:

- 2016. – 2019. Medicinski fakultet Osijek, preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike
- 2012. – 2016. Srednja škola Marka Marulića Slatina, opća gimnazija
- 2006.-2012. Osnovna glazbena škola Slatina (danas Glazbena škola Milka Kelemena)
- 2004.-2012. Osnovna škola Eugena Kumičića Slatina