

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Tea Mladenić

VARIJABILNOST GENOMA ŽENE KAO PREDISPOZICIJA ZA
IDIOPATSKI SPONTANI PRIJEVREMENI POROD

Doktorski rad

Rijeka, 2025.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Tea Mladenić

VARIJABILNOST GENOMA ŽENE KAO PREDISPOZICIJA ZA
IDIOPATSKI SPONTANI PRIJEVREMENI POROD

Doktorski rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Sanja Dević Pavlić

Komentor: prof. dr. sc. Borut Peterlin

Rijeka, 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Tea Mladenić

VARIABILITY OF THE MATERNAL GENOME AS A
PREDISPOSITION FOR IDIOPATHIC SPONTANEOUS
PRETERM BIRTH

Doctoral thesis

Rijeka, 2025.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Sanja Dević Pavlić, dipl. ing.

Komentor: prof. dr. sc. Borut Peterlin, dr. med.

Doktorski rad obranjen je dana ____ 2025. na Medicinskom fakultetu

Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Jadranka Vraneković, prof. biol. i kemije

2. izv. prof. dr. sc. Ana Katušić Bojanac, dipl. ing. mol. biol.

3. doc. dr. sc. Marko Klarić, dr. med.

Rad ima 76 stranica, 11 slika, 20 tablica i 185 literaturna navoda.

UDK: _____

Predgovor

Rad je izrađen na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sanje Dević Pavlić i komentorstvom prof. dr. sc. Boruta Peterlina, u sklopu doktorskog studija Biomedicina pri Medicinskom fakultetu u Rijeci. Istraživanje je provedeno uz potporu projekata Sveučilišta u Rijeci, uključujući projekt izv. prof.dr.sc. Sanje Dević Pavlić *Uloga varijabilnosti genoma žene u idiopatskom spontanom prijevremenom porodu* (uniri-iskusni-biomed-23-195) te projekt prof. dr. sc. Saše Ostojića *Genetički i epigenetički čimbenici u etiologiji ponavljajućih spontanih pobačaja i spontanih prijevremenih poroda* (br.18-131). Dio istraživanja proveden je na Kliničkom institutu za genomsku medicinu, Sveučilišnog kliničkog centra Ljubljana u okviru projekta *Ginekologija i reprodukcija: Genomika za personaliziranu medicinu* (br.P3-0326), financiranog od Javne agencije za istraživačku djelatnost Republike Slovenije.

Zahvale

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoje li u genomu žena varijante gena koje bi mogle predstavljati čimbenike rizika za idiopatski spontani prijevremeni porod (ISPP). Dodatno, specifični ciljevi istraživanja bili su: utvrditi panel gena kandidata koji je doprinio nastanku ISPP-a, utvrditi prisutnost čestih varijanti u panelu gena kandidata, te utvrditi jesu li postojale značajne rijetke varijante u tom panelu ili u novim genima kandidatima koje bi mogle predstavljati čimbenike rizika za obiteljski i/ili sporadični ISPP.

Ispitanici i metode: U prvom koraku, sustavnim pregledom literature i metaanalizom, identificiran je panel gena kandidata koji značajno doprinosi riziku za ISPP. U drugom koraku, istražena je genetička povezanost odnosno prisustvo ili odsustvo čestih varijanti u panelu gena kandidata u 573 ispitanice (248 sa sporadičnim ISPP-om, 44 s obiteljskim ISPP-om te 281 kontrola). U trećem koraku, sekvenciranjem cjelokupnog egzoma te provođenjem analize opterećenja na ukupno 188 ispitanica (31 s obiteljskim ISPP-om, 59 sa sporadičnim ISPP-om i 98 kontrola), istraženo je postoje li rijetke predviđeno patogene (RPP) varijante u panelu gena kandidata, te jesu li prisutne RPP varijante u novim genima koji bi mogli biti povezani s ISPP-om.

Rezultati: Analizom RPP varijanti identificirano je 56 novih gena kandidata među ispitanicama s ISPP-om. RPP varijante bile su statistički značajno češće u skupini s obiteljskim ISPP-om u usporedbi s sporadičnim slučajevima ($P=0.037$). Na temelju učestalosti dijeljenih RPP varijanti, posebno se istaknuo gen *PRUNE2*, prisutan u dvije obitelji s ISPP-om. Analiza bioloških puteva ukazala je na metabolizam pirimidina ($P_{adj}=0.002$). Također su analizirane RPP varijante unutar panela od 36 gena kandidata, definiranih sustavnim pregledom i metaanalizom. Iako analiza opterećenja nije pokazala statistički značajno obogaćenje RPP varijantama unutar cijelog panela ($P>0.05$), identificirane su varijante u 6 gena iz panela. Unutar istog panela, česta varijanta rs2963463 u genu *EBF1* pokazala je značajnu povezanost s ISPP-om ($P_{adj}=0.03$); ispitanice s *minor* CC genotipom imale su 3 do 4 puta niži rizik za razvoj ISPP-a.

Zaključak: Ovim je istraživanjem potvrđena polazišna hipoteza istraživanja, da je genetička predispozicija za ISPP određena varijabilnošću genoma žene. Identificirane su RPP varijante češće zastupljene u obiteljskim slučajevima ISPP-a, što dodatno podupire ulogu nasljednih čimbenika u razvoju ovog stanja.

Ključne riječi: Genetička varijabilnost; Istraživanje genetičke povezanosti; Prijevremeni porod; Sekvenciranje cjelokupnog egzoma

SUMMARY

Objectives: The aim of this study was to determine whether there are genetic variants in the genome of women that could represent risk factors for idiopathic spontaneous preterm birth (ISPTB). In addition, the specific aims were: to identify a panel of candidate genes that contribute to ISPTB, to determine the presence of common variants within this panel, and to investigate whether significant rare variants exist in these candidate genes or in newly identified genes that may be risk factors for familial and/or sporadic ISPTB.

Patients and Methods: In a first step, a systematic literature search and meta-analysis were performed to identify a panel of candidate genes significantly associated with ISPTB risk. In the second step, a genetic association study was conducted on 573 participants (248 with sporadic ISPTB, 44 with familial ISPTB and 281 controls) to determine the presence or absence of common variants in the candidate gene panel associated with ISPTB risk. In the third step, whole-exome sequencing and burden analysis were performed on a total of 188 participants (31 with familial ISPTB, 59 with sporadic ISPTB and 98 controls) to evaluate the presence of rare predicted pathogenic (RPP) variants in the candidate gene panel and to identify whether RPP variants exist in new genes potentially associated with ISPTB.

Results: Analysis of RPP variants identified 56 novel candidate genes among individuals with ISPTB. RPP variants were significantly more frequent in the familial ISPTB group compared to sporadic cases ($P=0.037$). Among the identified variants, the *PRUNE2* gene emerged as a prominent candidate, with shared RPP variants observed in two unrelated families affected by ISPTB. Pathway analysis highlighted pyrimidine metabolism as the most significantly enriched biological process ($P_{adj}=0.002$). RPP variants were also analysed within a panel of 36 candidate genes previously defined through a systematic review and meta-analysis. Although burden analysis did not show statistically significant enrichment of RPP variants within the entire panel ($P>0.05$), variants were identified in six genes from the panel. Within the same panel, a common variant, rs2963463 in the *EBF1* gene, showed a significant association with ISPP ($P_{adj}=0.03$); individuals with the minor CC genotype had a 3- to 4-fold lower risk of developing ISPTB.

Conclusion: This study confirmed the initial hypothesis that genetic predisposition to ISPTB is determined by the variability of the maternal genome. The identified RPP variants occurred more frequently in familial cases of ISPTB, further supporting the role of inherited factors in the development of this condition.

Key words: Genetic Variations; Genetic Association Study; Preterm birth; Whole Exome Sequencing

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Definicija prijevremenog poroda	1
1.2. Prevalencija prijevremenog poroda.....	1
1.3. Podjela prijevremenog poroda	1
1.4. Patogeneza prijevremenog poroda	2
1.4.1. Kaskada poroda	2
1.4.2. Početak spontanog prijevremenog poroda.....	2
1.5. Čimbenici rizika za prijevremeni porod.....	4
1.6. Genetička predispozicija za idiopatski spontani prijevremeni porod	5
1.6.1. Istraživanja gena kandidata	6
1.6.2. Cjelogenomska asocijacijska istraživanja	7
1.6.3. Sekvenciranje cjelokupnog egzoma.....	7
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	9
3. ISPITANICI I METODE	10
3.1. Ispitanice	10
3.2. Metode	12
3.2.1. Sustavni pregled i metaanaliza	12
3.2.1.1. Odabir istraživanja i prikupljanje podataka	12
3.2.1.2. Metode sinteze i metaanaliza.....	13
3.2.1.3. Izrada panela gena kandidata	13
3.2.2. Izolacija genomske DNA.....	14
3.2.3. Analiza čestih varijanti iz panela gena kandidata	14
3.2.3.1. Statistička obrada rezultata genotipizacije	16
3.2.4. Analiza rijetkih predviđeno patogenih varijanti sekvenciranjem cjelokupnog egzoma..	16
3.2.4.1. Sekvenciranje cjelokupnog egzoma i anotacija varijanti.....	17
3.2.4.2. Analiza rijetkih predviđeno patogenih varijanti u cjelokupnom egzomu i panelu gena kandidata.....	17

3.2.4.3. Analiza opterećenja panela gena kandidata rijetkim predviđeno patogenim varijantama.....	18
3.2.4.4. Analiza puteva novih gena kandidata s rijetkim predviđeno patogenim varijantama.	18
4. REZULTATI.....	20
4.1. Panel gena kandidata utvrđen sustavnim pregledom i metaanalizom	20
4.1.1. Karakteristike uključenih istraživanja.....	21
4.1.1.1. Pristup temeljen na hipotezi (engl. <i>hypotesis-based</i>)	21
4.1.1.2. Pristup bez unaprijed definirane hipoteze (engl. <i>hypotesis-free</i>)	30
4.1.2. Panel gena kandidata	32
4.2. Česte varijante iz panela gena kandidata	32
4.2.1. Karakteristike uključenih ispitanica	32
4.2.2. Povezanost polimorfizama ispitivanih gena s idiopatskom spontanom prijevremenim porodom.....	33
4.2.3. Usporedba učestalosti polimorfizama gena između skupina ispitanica, prema genetičkim modelima.....	34
4.3. Rijetke predviđeno patogene varijante iz panela gena kandidata.....	36
4.3.1. Opterećenje panela gena kandidata rijetkim predviđeno patogenim varijantama	37
4.4. Rijetke predviđeno patogene varijante novootkrivenih gena kandidata iz cjelokupnog egzoma	38
4.4.1. Signalni putevi u koje su uključeni novi geni kandidati	43
5. RASPRAVA	44
5.1. Novi geni kandidati	44
5.2. Panel gena kandidata	46
5.2.1. Rijetke predviđeno patogene varijante	48
5.2.2. Česte varijante.....	49
5.3. Prednosti i nedostaci istraživanja.....	50
6. ZAKLJUČCI.....	52
7. LITERATURA	53
ILUSTRACIJE	66

Popis slika	66
Popis tablica	66
POPIS POKRATA.....	68
PRIVITCI	70
ŽIVOTOPIS	72

1. UVOD

1.1. Definicija prijevremenog poroda

Prijevremeni porod (PP, od engl. *preterm birth*), prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, od engl. *World Health Organization*), označava svaki porod živorođenčeta navršen prije 37. tjedna gestacije [1].

1.2. Prevalencija prijevremenog poroda

PP je globalni zdravstveni izazov koji svake godine zahvaća oko 13,4 milijuna novorođenčadi diljem svijeta te je vodeći uzrok mortaliteta djece mlađe od 5 godina [2,3]. Nadalje, PP znatno povećava rizik za neurološke razvojne poremećaje te respiratorne, kardiovaskularne i gastrointestinalne komplikacije u prijevremeno rođene djece u odnosu na novorođenčad rođenu terminski [4]. Unatoč značajnom napretku perinatalne skrbi i sve boljem razumijevanju rizičnih čimbenika, incidencija PP-a ne pokazuje trend smanjenja, već bilježi porast u većini industrijaliziranih zemalja usprkos brojnim javnozdravstvenim i medicinskim intervencijama usmjerenima na njegovo smanjenje [5].

U Hrvatskoj se godišnje 6-7% novorođenčadi, odnosno ukupno oko 2500 djece, rađa prijevremeno [6]. S mortalitetnom stopom od 2.5 na 1000 živorođenih, PP predstavlja vodeći uzrok dojenačke smrtnosti u Hrvatskoj [6,7].

1.3. Podjela prijevremenog poroda

Klinički se PP s obzirom na način nastanka može klasificirati kao spontani (SPP, od engl. *spontaneous preterm birth*) ili medicinski indiciran (MIPP, od engl. *medically indicated*). MIPP je porod koji se planirano izaziva ili dovršava prije prirodnog početka zbog medicinskih razloga koji ugrožavaju zdravlje majke ili djeteta (npr. preeklampsija/eklampsija, predležeca posteljica, abrupcija posteljice, intrauterini zastoj rasta, fetalni distres) [4]. Dvije trećine PP-a posljedica su spontanog početka prijevremenog porođaja, bilo kontrakcijama bez prsnuća vodenjaka ili prijevremenim prsnućem plodovih ovoja (PPPO), barem sat vremena prije početka trudova [8]. Prema WHO smjernicama, PP se s obzirom na gestacijsku dob može podijeliti u tri kategorije: (I) izrazito ili ekstremno rani PP, prije navršenih 28 tjedana, (II) vrlo rani PP, između 28 i 31^{+6/7} tjedana te (III) umjereni ili kasni PP, između 32 i 36^{+6/7} tjedana [9]. Iako novorođenčad rođena između 34. i 36. tjedna gestacije čini najveći udio u skupini prijevremeno rođenih beba (75%), njihove kliničke manifestacije općenito su blaže u usporedbi s djecom rođenom u ranijim gestacijskim tjednima [5].

1.4. Patogeneza prijevremenog poroda

1.4.1. Kaskada poroda

Trudnoća se dijeli u četiri faze: nulta faza (relaksacija maternice), faza I (aktivacija miometrija), faza II (stimulacija miometrija) i faza III (involucija).

Nultu fazu (tiha faza), koja traje veći dio trudnoće (95%), karakterizira relaksacija miometrija djelovanjem brojnih inhibitora, uključujući progesteron, prostacikline, relaksin, dušikov oksid te peptid povezan s paratiroidnim hormonom [10].

Faza I započinje kao rezultat dvaju ključnih procesa: aktivacije fetalne hipotalmusno-hipofizno-nadbubrežne (HPA, od engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal*) osi i mehaničkog rastezanja maternice [11]. Aktivacija HPA osi, koja se događa uslijed sazrijevanja ploda, dovodi do pojačanog stvaranja kortizola u fetalnim nadbubrežnim žlijezdama. Kortizol potiče sintezu ciklooksigenaze-2 (COX-2, od engl. *cyclooxygenase-2*) i prostaglandina, koji dalje stimuliraju proizvodnju estrogena [10, 12]. Estrogen smanjuje aktivnost progesteronskih receptora, te priprema miometrij za porod. Istovremeno, rastezanje maternice zbog rasta ploda uzrokuje povećanu sintezu proteina povezanih s kontrakcijama (CAPs, od engl. *contraction-associated proteins*), kao što su koneksin 43, oksitocinski receptori (OXTR, od engl. *oxytocin receptor*) i proteini ionskih kanala. Ovi proteini olakšavaju međustaničnu komunikaciju i koordinaciju kontrakcija miometrija [10, 12]. Njihov izražaj pozitivno je reguliran estrogenom, a negativno progesteronom, čime se uspostavlja ravnoteža potrebna za uspješan početak poroda.

Faza II uključuje kompleksnu kaskadu događaja, pri čemu ključnu ulogu ima kortikotropin-oslobađajući hormon (CRH, od engl. *corticotropin-releasing hormone*) koji stimulira kontrakcije miometrija i smanjuje osjetljivost na progesteron. Prostaglandini, čija se sinteza pojačava pod utjecajem estrogena, CRH-a, kortizola i proupalnih citokina poput IL-1 β (od engl. *interleukin-1 beta*) i TNF- α (od engl. *tumor necrosis factor alpha*), igraju ključnu ulogu u sazrijevanju cerviksa i sinkronizaciji kontrakcija miometrija.

Konačno, faza III označava involuciju, odnosno povratak maternice i vrata maternice u stanje prije trudnoće, nakon poroda novorođenčeta i posteljice.

1.4.2. Početak spontanog prijevremenog poroda

SPP često se tretira kao jedno stanje, no sve više dokaza sugerira da je riječ o sindromu koji proizlazi iz niza patoloških procesa [13]. U osnovi, SPP može predstavljati "kratki spoj" ili preopterećenje normalnog kaskadnog procesa poroda, pri čemu dolazi do prerane aktivacije ključnih komponenti, kao što su sazrijevanje cerviksa, povećanje kontraktilne aktivnosti miometrija i PPPO-a.

Neki od mogućih poznatih mehanizama nastanka SPP-a (Slika 1) su:

I. Infekcija

Najmanje 40% SPP-a povezano je s intrauterinom infekcijom, koja može nastati uslijed infekcija majke (npr. bakterijska vaginoza, infekcija mokraćnih puteva), infekcije plodovih ovoja (npr. korioamnionitis) ili infekcije unutar posteljice [14,15]. Mehanizmi kojima intrauterine infekcije uzrokuju SPP povezani su s aktivacijom urođenog imunološkog odgovora: mikroorganizmi i njihovi produkti aktiviraju TLRs (od engl. *toll-like receptors*), što potiče oslobađanje kemokina (npr. IL-8, IL-1, CCL-2) i citokina (npr. IL- β , TNF- α) [16]. Oni potom stimuliraju proizvodnju prostaglandina, proteaza i drugih upalnih medijatora koji razgrađuju izvanstanični matriks. Prostaglandini potiču kontrakcije maternice, dok razgradnja izvanstaničnog matriksa u plodovim ovovima može dovesti do PPPO-a [16].

II. Uteroplacentarna ishemija i/ili krvarenje

Uteroplacentarna ishemija i/ili krvarenje, uzrokovani poremećenom homeostazom decidue, mogu dovesti do SPP-a. Predložena su dva mehanizma: prvi uključuje promjene u renin-angiotenzin-aldosteronskom sustavu, dok drugi upućuje na povišene koncentracije trombina. Uteroplacentarna ishemija potiče stvaranje renina u maternici, a njegov metabolit, angiotenzin II, može izravno ili neizravno pojačati kontrakcije maternice [17]. U slučaju teške ishemije, nekroza decidue i popratno krvarenje potiču prekomjerno lučenje trombina, koji dodatno stimulira kontrakcije miometrija i doprinosi degradaciji izvanstaničnog matriksa, što vodi do SPP-a [18].

III. Patološko/prekomjerno širenje maternice

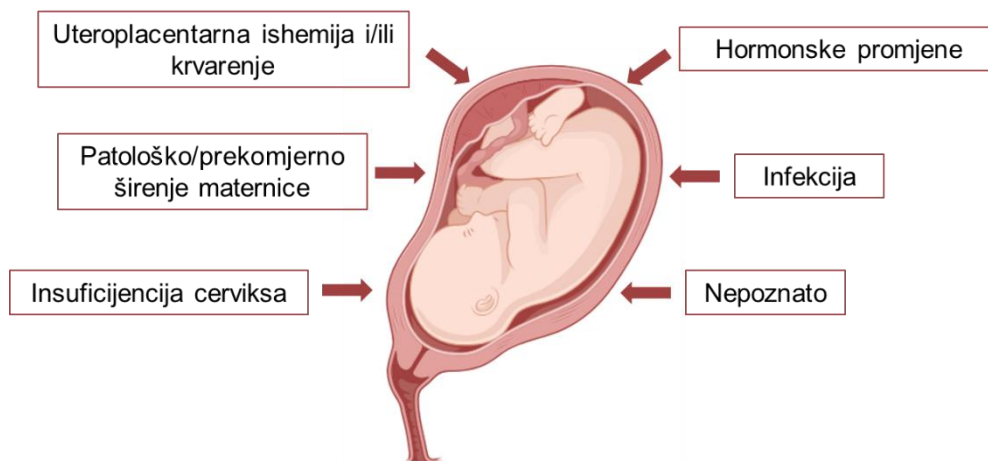
Polihidramnion, makrosomija i višeploidne trudnoće povećavaju rizik od SPP-a [17]. Mehanizmi koji dovode do SPP-a u ovi slučajevima nisu potpuno poznati, no pretpostavlja se da širenje maternice inducira ekspresiju proteina povezanih s kontrakcijama, poput OXTR-a i koneksina-43 [19]. Posljedično, dolazi do oslobađanja prostaglandina, koji povećava proizvodnju IL-8 i kolagenaze, čime se olakšava zrenje cerviksa. Ovaj mehanizam rastezanja, fiziološki je izražen u kasnoj trudnoći i porodu, no zbog nedostatka eksperimentalnih modela, još uvijek nije u potpunosti jasno kako uzrokuje SPP.

IV. Insuficijencija cerviksa

Insuficijencija cerviksa podrazumijeva otvorenost cerviksa i/ili urođenu ili stečenu smanjenu čvrstoću cervikalnog tkiva [20]. Među moguće uzroke ubrajaju se urođeni poremećaji (npr. hipoplastični cerviks) te stečeni faktori, poput kirurških zahvata (npr. konizacija, LLETZ) ili infekcija te oštećenja cervikalne strukture uslijed ponovljenih dilatacija [17]. Unatoč pokušajima liječenja cervikalne insuficijencije serklažom i/ili progesteronom, cervikalna insuficijencija i dalje ostaje jedan od glavnih rizičnih faktora za izrazito rani PP [17].

V. Hormonske promjene

Svi prethodno spomenuti hormoni, uključujući progesteron i estrogene, imaju ključnu ulogu u regulaciji trudnoće. Progesteron održava trudnoću smanjujući kontraktilnost miometrija, sprječavajući sazrijevanje cerviksa i inhibirajući upalne procese, dok estrogeni djeluju suprotno, potičući kontrakcije i sazrijevanje cerviksa. Neravnoteža u njihovom djelovanju može potaknuti SPP-a [21].



Slika 1. Predloženi mehanizmi nastanka spontanog prijevremenog poroda

1.5. Čimbenici rizika za prijevremeni porod

Unatoč brojnim dosad opisanim mehanizmima koji mogu dovesti do nastanka SPP-a, etiologija ostaje nepoznata u više od 45–50 % slučajeva, pri čemu se takvi slučajevi klasificiraju kao idiopatski SPP (ISPP, od engl. *idiopathic spontaneous preterm birth*) [22]. Multifaktorijalnoj patofiziologiji ISPP-a pridonose različiti čimbenici rizika poput: dobi majke, višeplođnih trudnoća, kraćeg intervala između trudnoća, etničke pripadnosti te socioekonomskog statusa, zlouporabe opojnih sredstava, pušenja, konzumacije alkohola te prehrane.

Istraživanja pokazuju da žene mlađe od 17 ili starije od 35 godina imaju veći rizik za PP [23–25]. Povećani rizik također je prisutan i u žena s višeplođnom trudnoćom (15–20 % svih PP), pri čemu se oko 40 % blizanaca rađa spontano prijevremeno [5]. Budući da potpomognuta oplodnja i stimulacija ovulacije povećavaju vjerojatnost višeplođnih trudnoća, žene koje su začele uz pomoć medicinski potpomognute oplodnje imaju veći rizik za PP [26]. Nadalje, važno je istaknuti da i kraći interval između trudnoća (< 6 mjeseci) predstavlja neovisan čimbenik rizika za PP [5, 27].

Stope PP-a variraju među etničkim skupinama, pa tako pripadnost afroameričkoj rasi povišuje rizik za izrazito ili ekstremno rani PP (<28 tjedna gestacije) čak 3 puta [26, 28, 29]. Fizički i

psihosocijalni stres također su povezani s većim rizikom, a lošiji socioekonomski status, mjerljiv niskim prihodima ili nižom razinom obrazovanja, često je u korelaciji [26, 30]. Iako mehanizam koji povezuje psihosocijalni stres s povećanim rizikom od PP-a nije poznat, predložena je uloga kortikotropin-oslobađajućeg hormona [5]. Mehanizmi kojima pušenje utječe na stopu PP-a nisu potpuno razjašnjeni, no poznato je da nikotin i ugljikov monoksid, kao snažni vazokonstriktori, oštećuju posteljicu i smanjuju uteroplacentarni protok krvi, što posljedično dovodi do zaostajanja rasta ploda [31, 32]. Osim aktivnog pušenja tijekom trudnoće, nekoliko recentnih istraživanja pokazuje je da i pasivno izlaganje duhanskom dimu povećava rizik od PP-a [33–35]. Pretjerana konzumacija alkohola također je povezana s PP-om, pri čemu se blaga konzumacija u ranim fazama trudnoće općenito ne smatra čimbenikom rizika [36–38]. S druge strane, uporaba kokaina i drugih opojnih sredstava povećava rizik od PP-a 3-4 puta prema rezultatima provedene metaanalize [39, 40].

Osim navedenog i prehrana, odnosno stanje uhranjenosti majke tijekom trudnoće opisano pomoću indeksa tjelesne mase (ITM) igra ulogu u nastanku PP-a. Nizak ITM majke prije trudnoće povezan je s visokim rizikom od PP-a, jer mršavost često dovodi do smanjenog volumena krvi i protoka krvi kroz maternicu, a također može biti rezultat smanjenog unosa vitamina i minerala, čije niske koncentracije povećavaju rizik od infekcija [41, 42]. Žene s visokim ITM-om imaju pak veću vjerojatnost razvoja preeklampsije i dijabetesa, čime se povećava rizik za MIPP [26].

1.6. Genetička predispozicija za idiopatski spontani prijevremeni porod

Osim prethodno opisanih čimbenika rizika koji utječu na trajanje gestacije i početak poroda, sve je više dokaza koji ukazuju na značajnu ulogu genetičkih i epigenetičkih čimbenika te njihovih interakcija s okolišem u razvoju ISPP-a. S obzirom na složene interakcije između majke i ploda, istraživanja sve više naglašavaju ulogu genetičke predispozicije majke, pri čemu pozitivna osobna ili obiteljska anamneza postaje jedan od najsnažnijih prediktora rizika za ISPP. Nedavno provedena metaanaliza pokazuje da je ukupni rizik od ponovljenog ISPP-a oko 30% [43]. Iako mehanizam ponavljanja još nije potpuno razjašnjen, sve je više dokaza koji ukazuju na ključnu ulogu genetičke predispozicije majke u njegovom nastanku.

Dosadašnja istraživanja naglašavaju ulogu nasljednosti u pojavi ISPP-a, ističući majčinu i predispoziciju ploda. Istraživanja blizanaca pokazuju da nasljednost varira od 15% do 40% [44–46], a prema rezultatima obiteljskih istraživanja, žene koje su rođene prijevremeno ili imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu ISPP-a izložene su većem riziku od ISPP-a. Nadalje, žene čije su sestre rodile prijevremeno imaju 80% veći rizik od PP-a [46].

Uloga predispozicije ploda na nastanak ISPP-a ispitivana je u nekoliko znanstvenih, no dobiveni su rezultati neujednačeni. Dok su York i sur. procijenili da predispozicija ploda

doprinosi približno 13%, istraživanje Svensson i sur. pokazalo je znatno manji doprinos (<5%) [46, 47], što ukazuje da uloga genoma ploda u ISPP-u i dalje nije u potpunosti razjašnjena. S druge strane, očinska predispozicija rjeđe je istraživana, a dosadašnji rezultati upućuju na zanemariv ili vrlo mali doprinos (<5%) [44].

S ciljem identifikacije varijanti koje pridonose riziku za ISPP, provedena su brojna istraživanja genetičke predispozicije za ISPP koristeći različite pristupe. Većina se temelji na istraživanjima specifičnih ciljnih gena, tzv. istraživanjima gena kandidata (engl. *candidate gene studies*), odabranih na temelju njihove funkcije. Nasuprot tome, manji broj studija koristi sveobuhvatne genomske metode, poput cjelogenomskih asocijacijskih istraživanja (GWAS, od engl. *genome-wide association studies*) i sekvenciranja cjelokupnog egzoma (WES, od engl. *whole exome sequencing*), koje slijede pristup bez unaprijed postavljene hipoteze za otkrivanje novih varijanti povezanih s ISPP-om.

1.6.1. Istraživanja gena kandidata

U okviru istraživanja gena kandidata istražuju se genske varijante, najčešće polimorfizmi jednog nukleotida (SNP, od engl. *single nucleotide polymorphism*), unutar odabranih gena, s ciljem identifikacije varijanti koje su učestalije (ili rjeđe) u žena s ISPP-om u usporedbi s kontrolnom populacijom [48]. Budući da ovaj pristup predstavlja jednu od prvih strategija korištenih za identifikaciju predisponirajućih čimbenika za ISPP, većina dosadašnjih istraživanja temelji se upravo na ovom pristupu. Do danas su identificirani brojni polimorfizmi u genima koji su u nastavku opisani prema svojim funkcijama i putevima [49, 50].

I. Polimorfizmi gena povezanih s upalnim i imunološkim putevima

Polimorfizmi u genima uključenima u imunološki odgovor tijekom trudnoće mogu potaknuti pretjerane upalne reakcije, koje igraju ključnu ulogu u regulaciji trajanja trudnoće i samom porodu [51]. Među najistraživanijim SNP-ovima su oni u genima za proupalne (npr. *TNF- α* , *IL-1* te *IL-6*), ali i protuupalne citokine (npr. *IL-10*) [52–61].

II. Polimorfizmi gena povezanih s putevima remodeliranja tkiva

Tijekom trudnoće i poroda dolazi do intenzivnog remodeliranja tkiva; maternica povećava udio glatkih mišića i vezivnog tkiva, dok se cerviks opušta i širi u pripremi za porod [62]. Polimorfizmi unutar gena koji sudjeluju u biosintezi kolagena te sintezi i inhibiciji MMP-ova (od engl. *matrix metalloproteinases*) pokazali su značajnu povezanost s PP-om [63, 64]. Uz to, geni koji kodiraju hormone povezane s porodom, poput progesterona, folikulostimulirajućeg hormona i relaksina također mogu utjecati na PP [64–68].

III. Polimorfizmi gena povezanih s metaboličkim putevima i faktorima rasta

Održavanje metaboličke homeostaze ključno je za embrionalni razvoj i preživljavanje. Polimorfizmi u genima uključenim u homeostazu glukoze, sintezu folata te metabolizam i skladištenje vitamina D i drugih minerala povezuju se s PP-om [69–74], kao i polimorfizmi u

genima *IGF1* (od engl. *insulin-like growth factor 1*) i njegovom receptoru, koji sudjeluju u regulaciji rasta, uključujući fetoplacentni razvoj [75].

IV. Polimorfizmi gena povezanih s hematološkim, vaskularnim i endotelnim putevima
Ova skupina obuhvaća polimorfizme gena koji kodiraju faktore zgrušavanja, FII i FV [74, 76, 77] te gene za čimbenike rasta uključene u vaskulogenezu, angiogenezu, i rast endotela poput gena *VEGF* (od engl. *vascular endothelial growth factor*) [78]. Dodatno u ovu skupinu pripadaju polimorfizmi u genima za sintezu dušikovog oksida koji mogu utjecati na relaksaciju glatkih mišića krvnih žila, što dodatno potvrđuje ulogu vaskularnog i endotelnog sustava u PP-u [77].

1.6.2. Cjelogenomska asocijacijska istraživanja

Cjelogenomska asocijacijska istraživanja analiziraju velik broj ispitanika i istovremeno testiraju povezanost brojnih čestih varijanti (engl. *common variant*), najčešće SNP-ova, koji su prisutni u više od 5% populacije. Iako nisu izravni uzročnici bolesti ili stanja, ove varijante mogu biti povezane s povećanom podložnošću ili zaštitnim učinkom za određeni fenotip, poput ISPP-a. Zbog višestrukog testiranja, u ovakvim istraživanjima često se koristi fiksni prag P-vrijednosti od 5×10^{-8} kako bi se osigurala statistički značajna povezanosti na razini cjelokupnog genoma. Prema broju sudionika najveće do sada provedeno primarno istraživanje od 40000 žena proveli su Zhang i sur., a ono je omogućilo sveobuhvatnu analizu ISPP-a. U tom istraživanju identificirana su 4 SNP-a sa značajnom povezanosti na razini cijelog genoma, u 2 gena: *EBF1* (od engl. *early B-cell factor 1*) i *EEFSEC* (od engl. *eukaryotic translation elongation factor sec*) [79]. Uslijedilo je nekoliko istraživanja koja nisu pronašla SNP-ove sa značajnom povezanosti na razini cijelog genoma [80, 81]. Međutim, u posljednjim godinama Gupta i sur. identificirali su dva globalno značajna signala u genima *ASTN1* (od engl. *astrotactin 1*) i *MAST1* (od engl. *microtubule associated serine/threonine kinase 1*) [82].

1.6.3. Sekvenciranje cjelokupnog egzoma

Pristup sekvenciranja cjelokupnog egzoma omogućuje otkrivanje rijetkih varijanti (engl. *rare variants*), koje su prisutne u manje od 1% populacije i čine glavninu genetičke heterogenosti u ljudi te potencijalno imaju važnu ulogu u patogenezi složenih bolesti. Kod ovakvih istraživanja prag statističke značajnosti se postavlja na P-vrijednost od 1×10^{-6} , što upućuje na potencijalno snažnu povezanost s određenim fenotipom, poput PP-a [83].

Prvo istraživanje koje je koristilo WES pristup proveli su McElroy i sur. na parovima majki i njihovih kćeri, otkrivši povećano opterećenje rijetkim varijantama u koagulacijskoj kaskadi, no bez utvrđene statističke značajnosti [84]. Pet godina kasnije, Huusko i sur. otkrili su značajno opterećenje puta signalizacije glukokortikoidnog receptora te istaknuli najznačajniji gen u tom putu – *HSPA1L* (od engl. *heat shock protein family a member 1-like*) [85].

Unatoč brojnim dosadašnjim istraživanjima predispozicije za ISPP, genetička osnova obiteljske pojavnosti ostaje nedovoljno razjašnjena. Povećani rizik za ISPP kod žena čije su majke ili sestre imale isti ishod do danas nije u potpunosti objašnjen, što ukazuje na nedostatak sustavne analize nasljednih čimbenika koji pridonose razvoju ISPP-a.

Upravo zbog tog nedostatka, ovo istraživanje po prvi puta uključuje jasno razgraničenje ispitanica na skupine s obiteljskim i sporadičnim oblicima ISPP-a, čime se povećava mogućnost identifikacije varijanti koje specifično doprinose obiteljskom nasljeđivanju. Dosadašnja istraživanja bila su primarno usmjerena na identifikaciju čestih varijanti povezanih s ISPP-om. U ovom istraživanju dodatno će se provjeriti njihova prisutnost i značaj u Hrvatskoj i Slovenskoj populaciji, ali i istražiti doprinos rijetkih potencijalno patogenih (RPP) varijanti u istim genima te na razini cjelokupnog egzoma. Takav pristup omogućuje identifikaciju novih gena kandidata koji do sada nisu bili povezani s ISPP-om.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Polazišna hipoteza istraživanja jest da je genetička predispozicija za ISPP određena varijabilnošću genoma žene, s posebnim naglaskom na doprinos rijetkih potencijalno patogenih varijanti, za koje se pretpostavlja da imaju izraženiju ulogu u obiteljskim slučajevima ISPP-a u usporedbi sa sporadičnima.

Iz navedene hipoteze proizlazi osnovni cilj ovog istraživanja kojime se nastoji utvrditi postoje li česte i/ili rijetke potencijalno patogene varijante u genomu žena koje predstavljaju čimbenike rizika za ISPP.

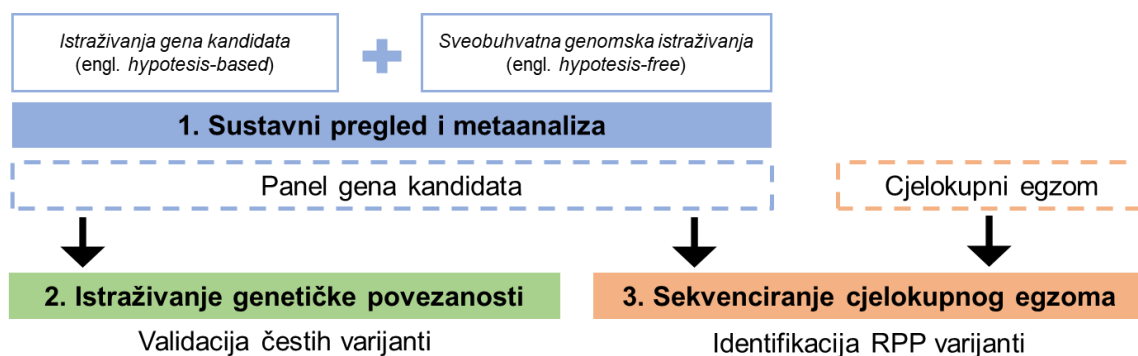
Specifični ciljevi istraživanja su sljedeći:

- I. sustavnim pregledom literature i metaanalizom utvrditi panel gena kandidata koji specifično doprinosi nastanku ISPP-a
- II. istraživanjem genetičke povezanosti utvrditi prisustvo, odnosno odsustvo čestih varijanti u panelu gena kandidata, koje su čimbenici rizika za ISPP
- III. sekvenciranjem cjelokupnog egzoma utvrditi postoje li značajne rijetke predviđeno patogene varijante u panelu gena kandidata koje su čimbenici rizika za obiteljski i/ili sporadični ISPP
- IV. sekvenciranje cjelokupnog egzoma utvrditi postoje li rijetke predviđeno patogene varijante u novim genima kandidatima koje su čimbenici rizika za obiteljski i/ili sporadični ISPP

3. ISPITANICI I METODE

Istraživanje je organizirano u skladu s prethodno navedenim specifičnim ciljevima te je podijeljeno u 3 koraka (Slika 2):

- I. U prvom koraku istraživanja proveden je sustavni pregled literature i metaanaliza čime je utvrđen panel gena kandidata koji specifično doprinosi nastanku ISPP-a;
- II. U drugom koraku istraživanja provedeno je istraživanje genetičke povezanosti na populaciji žena iz Hrvatske i Slovenije s ciljem validacije prisustva/odsustva čestih varijanti u panelu gena kandidata, koje su čimbenici rizika za ISPP;
- III. U trećem koraku istraživanja provedeno je sekvenciranje cjelokupnog egzoma čime su utvrđene rijetke predviđeno patogene varijante u panelu gena kandidata te u potencijalnim novim genima kandidatima, koje su čimbenici rizika za ISPP.



Slika 2. Dizajn istraživanja

3.1. Ispitanice

Drugi i treći korak istraživanja provedeni su kao istraživanje parova (engl. *case-control study*), a uključene su ispitanice čiji su uzorci genomske DNA retrospektivno prikupljeni iz biobanki Zavoda za medicinsku biologiju i genetiku, Medicinskog fakulteta u Rijeci i Medicinskog fakulteta u Osijeku te Kliničkog instituta za genomsku medicinu, Sveučilišnog kliničkog centra Ljubljana (KIGM od slo. *Klinični inštitut za genomsko medicino, Univerzitetni klinični center Ljubljana*). Osim retrospektivno prikupljenih uzoraka, u sklopu ovog doktorskog rada prikupljeni su i dodatni uzorci genomske DNA ispitanica s obiteljskim ISPP-om putem neprofitne organizacije „Klub roditelja nedonoščadi Palčići“.

Istraživanje uključuje ukupno 573 ispitanice od čega 292 ispitanice s ISPP-om (179 ispitanica iz Hrvatske i 113 ispitanica iz Slovenije) te 281 kontrolnu ispitanicu (157 ispitanica iz Hrvatske i 124 ispitanica iz Slovenije).

Skupina ispitanica s ISPP-om podijeljena je u dvije podskupine:

- I. *skupina s obiteljskim ISPP-om*: 44 ispitanice s pozitivnom osobnom i obiteljskom anamnezom po majčinoj liniji tj. žene čija je majka, sestra ili baka imala jedan ili više ISPP-a (31/44 ispitanice imale su pozitivnu obiteljsku anamnezu u prvom koljenu, a 13/44 u drugom koljenu); i
- II. *skupina sa sporadičnim ISPP-om*: 248 ispitanica s pozitivnom osobnom, ali negativnom obiteljskom anamnezom ISPP-a.

Glavni uključni kriterij za skupinu ispitanica s ISPP-om podrazumijevao je porod prije 37. tjedna trudnoće koji je započeo spontano. Prema strogim isključnim kriterijima, iz istraživanja su isključene sve ispitanice s poznatim uzrocima PP-a (npr. začće potpomognutom oplodnjom, višeplovna trudnoća, anomalije maternice, prethodni zahvati na vratu maternice, dokazana upala donjeg reproduktivnog trakta, kronične bolesti poput hipertenzije, dijabetesa melitusa, bolesti bubrega), kao i one s komplikacijama u trudnoći (npr. gestacijski dijabetes, preeklampsija). Također, isključene su ispitanice čija su djeca bila mrtvorodena ili čija su novorođena djeca imala prirođene anomalije i/ili dokazane infekcije.

Skupina kontrolnih ispitanica uključuje zdrave žene koje su imale barem jednu jednoplodnu trudnoću završenu prirodnim putem između 38. i 42. tjedna gestacije nakon nekomplikirane trudnoće, s rođenjem zdravog djeteta bez prirođenih anomalija.

Za prikupljanje epidemioloških i kliničkih podataka korišteni su strukturirani upitnici, koji su popunjeni u razgovoru s ispitanicama na dan prikupljanja uzorka (Privitak 1). Svaka ispitanica je prilikom uključivanja u istraživanje upoznata sa svrhom i metodologijom istraživanja, a svoj pristanak za sudjelovanje u istraživanju, kao i suglasnost za korištenje pohranjene krvi i DNA uzorka, potvrdila je davanjem pismene informirane suglasnosti.

Istraživanje je provedeno u skladu s etičkim načelima Helsinške deklaracije i Nürnberškog kodeksa, poštujući najviše standarde zaštite prava i privatnosti sudionika. Medicinski podaci i humani uzorci prikupljeni su u skladu s etičkim i bioetičkim načelima, uz osiguranje privatnosti ispitanica i zaštitu povjerljivosti podataka. Identitet ispitanica ostaje anoniman, jer su prilikom uključivanja u istraživanje korištene šifre. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Rijeci (2170-29-02/1-19-2 i 211 0-24-04-3/1-22-3), Etičko povjerenstvo za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Osijeku (602-04/18-08/07 i 20/07/2018) i Državna komisija za biomedicinsku etiku Slovenije, Etičko povjerenstvo (98/12/10 i 90/02/15 i 05/01/2017).

3.2. Metode

3.2.1. Sustavni pregled i metaanaliza

Sustavnim pregledom literature i metaanalizom istraživanja koja su ispitivala povezanost između majčina genoma i ISPP-a, identificiran je panel gena kandidata koji statistički značajno doprinosi ISPP-u. Postupak je proveden u skladu s PRISMA (od engl. *Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analysis*) smjernicama [86, 87].

3.2.1.1. Odabir istraživanja i prikupljanje podataka

Pretraživanje literature provedeno je korištenjem elektroničkih baza podataka *PubMed* i *Scopus*, na temu povezanosti između genetičkih varijanti majke i ISPP-a. Svi znanstveni članci objavljeni do listopada 2023. godine identificirani su korištenjem kombinacija ključnih riječi: (*spontaneous OR (preterm birth OR preterm delivery OR preterm labor OR premature birth OR premature delivery OR premature labor)*) AND (*rare variants OR common variants OR polymorphism OR GWAS OR genome wide association OR WES OR whole exome sequencing OR linkage study*)). Također, pregledane su reference identificiranih studija kako bi se pronašla dodatna relevantna istraživanja.

U ovom dijelu istraživanja cilj je bio identificirati istraživanja parova, presječna i kohortna istraživanja koja su ispitivala povezanost između genetičkih varijanti majke na uzorcima krvi i/ili sline i ISPP-a. Identificirane studije podijeljene su u dvije kategorije:

- I. istraživanja gena kandidata (engl. *hypothesis-based studies*), koje koriste prethodno odabrane gene/polimorfizme na temelju njihove funkcionalne relevantnosti, te
- II. sveobuhvatna genomska istraživanja (engl. *hypothesis-free studies*), koja primjenjuju visoko-protočne metode bez prethodnog odabira gena.

Isključena su istraživanja koja:

- I. su pregledi, prikazi slučajeva, metaanalize, poglavlja u knjigama, nepotpune publikacije (npr. sažeci s konferencija),
- II. nisu imala jasnu i standardiziranu definiciju ISPP-a i/ili su analizirali rezultate koji nisu povezani sa ISPP-om (npr. nepovoljni ishodi trudnoće, težina djeteta, vrijeme poroda),
- III. su istraživala rizik od ISPP-a na ispitanicama s poznatim čimbenicima rizika i/ili komplikacijama u trudnoći.

Iz istraživanja koja su analizirala uzorke majke i ploda ili majke, ploda i oca; uključivali smo samo rezultate dobiveni iz majčinih uzoraka. Također, primijenjena je jezična restrikcija, te su uzeti u obzir samo znanstveni članci na engleskom jeziku. Duplicirani članci su uklonjeni, a preostali su početno pregledani prema naslovu i sažetku, isključujući one koji nisu bili relevantni za istraživanje. Kada je veći broj članaka objavila ista skupinu autora, istraživanja su procijenjena kako bi se utvrdilo jesu li korišteni isti (preklapajući) uzorci. Ako je pronađeno

više publikacija istog autora, u sustavni pregled je uključena studija s najvećim brojem sudionika.

Iz prihvatljivih odabranih studija prikupljeni su sljedeći podaci: prezime prvog autora, godina objave, etničko podrijetlo ispitanice, simbol gena, genska varijanta navedena u članku, pripadajuće P vrijednosti, vrsta istraživanja/dizajn studije, broj ispitanica, kriteriji za uključivanje i isključivanje te metoda korištena u istraživačkom pristupu. Nedostajući ili nejasni podaci klasificirani su kao "nema informacija (NI)".

3.2.1.2. Metode sinteze i metaanaliza

Prikupljeni podaci kategorizirani su na sveobuhvatna genomska istraživanja i istraživanja gena kandidata. Za sveobuhvatna genomska istraživanja metodama sinteze prikupljeni su podaci o genskim varijantama/genima koje su prelazile prag globalne značajnosti za povezanost s ISPP-om ($P \leq 5 \times 10^{-8}$).

Za istraživanja gena kandidata prikupljeni su podaci o svim istraživanim genskim varijantama, a u metaanalizu su uključeni SNP-ovi za koje su bili dostupni podaci iz najmanje tri neovisna istraživanja [88, 89]. Dodatni kriteriji za uključivanje u metaanalizu obuhvaćali su jasnu definiciju ISPP-a, dostupnost i potpunost podataka o genotipovima u skupini ispitanica i odgovarajućoj kontrolnoj skupini te usklađenost frekvencija genotipova s Hardy-Weinbergovom ravnotežom (HWR).

Metaanaliza je provedena korištenjem softvera Comprehensive MetaAnalysis, inačica 3.0 (Biostat, Inc., Englewood, NJ, SAD). Snaga povezanosti između SNP-a i rizika za ISPP procijenjena je pomoću omjera izgleda (engl. *odds ratio*, OR) s 95% intervalima pouzdanosti (engl. *confidence interval*, CI). Za analizu genetičke povezanosti korišteno je pet modela: alelni, dominantni, recesivni, kodominantni i aditivni. Statistička heterogenost procijenjena je pomoću Cochranovog Q i I^2 testa. Prema smjernicama Cochrane-a, model slučajnih učinaka korišten je kada je heterogenost između studija bila prisutna ($I^2 > 40\%$) [90]. Kada je I^2 bio manji od 40%, korišten je model fiksnih učinaka. Dodatno, za procjenu pristranosti publikacije korišten je dijagram lijevka (engl. *funnel plot*). Razina statističke značajnosti postavljena je na $P \leq 0.05$.

3.2.1.3. Izrada panela gena kandidata

Za izradu panela gena povezanih s ISPP korištena su dva kriterija:

- I. statistički značajna povezanost za istraživanja gena kandidata, nakon metaanalize ($P \leq 0.05$) te
- II. statistički značajna povezanost na globalnoj razini ($P \leq 5 \times 10^{-8}$) za gene identificirane iz sveobuhvatnih genomskih istraživanja.

Temeljem navedenih kriterija identificirani su geni uvršteni u panel potreban za drugi i treći korak istraživanja.

3.2.2. Izolacija genomske DNA

Genomska DNA izolirana je iz leukocita periferne krvi majke (3-5 ml) pomoću Qiagen FlexiGene DNA kita (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka), prema uputama proizvođača. Kvaliteta i koncentracija izolirane DNA izmjerene su pomoću UV/Vis i NanoDrop spektrofotometra (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), a vrijednosti su iznosile od 300 do 1000 ng/μL, odnosno A260/280=1.8-2.2 i A260/230>1. Uzorci izolirane DNA su bili pohranjeni na -20 °C.

3.2.3. Analiza čestih varijanti iz panela gena kandidata

Za analizu genetičke povezanosti odabrane su česte varijante, SNP-ovi iz panela gena identificiranog u prvom koraku istraživanja. Osim prethodno opisanih kriterija uključenja za panel gena kandidata, uključeni SNP-ovi odabrani su isključivo iz primarnih istraživanja. Genotipizacija odabranih SNP-ova *ASTN1* (rs146756455), *EBF1* (rs2963463, rs2946169), *EEFSEC* (rs201450565), *MAST1* (rs188343966) i *TNF-α* (rs1800629) provedena je pomoću uređaja StepOnePlus™ za lančanu reakciju polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time Polymerase Chain Reaction, Real-Time PCR*) (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, SAD). Uzorci DNA razrijeđeni su na koncentraciju od 10 ng/μL korištenjem formule za razrjeđivanje uzoraka ($c_1V_1=c_2V_2$).

Sljedovi nukleotida specifičnih TaqMan početnica prikazani su u Tablici 1, a sadržaj reakcijske smjese u Tablici 2. Reakcijska smjesa zatim je raspoređena na 96-jažičnu ploču, pri čemu je svaki uzorak postavljen u duplikatu (uključujući negativnu kontrolu). Uvjeti odvijanja Real-Time PCR reakcija prikazani su u Tablici 3 čiji je protokol preuzet od proizvođača.

Tablica 1. Prikaz analiziranih polimorfizama sa sljedovima nukleotida specifičnih TaqMan početnica

Gen (SNP)	Pozicija	Aleli	TaqMan početnice
<i>ASTN1</i> (rs146756455)	chr1:177039278	G>C	5'-GATGCTCATT ATAATTATAT TTAAA-3' 3'-GAGGAAAAAA GATAAAATT GGAAC-5'
<i>EBF1</i> (rs2963463)	chr5:158468041	T>C	5'-TGTCCCCCAA GCTGGAGTGC AGTGG-3' 3'-GTGATCACAG ATCACTGCAA CTGCT-5'
<i>EBF1</i> (rs2946169)	chr5:158491951	C>T	5'-GATAAACATA GTTGCAACAT GTAGT-3' 3'-ATAGGACTCT CTCAGTAATC ACTTT-5'
<i>EEFSEC</i> (rs201450565)	chr3:128339768-128339773	dupT	5'-GACATACCCA AGACTGGGTA ATTTA-3' 3'-AAAAAAAAGA GGTTTAATGG ACTCA-5'
<i>MAST1</i> (rs188343966)	chr19:12862887	G>A	5'-TCTCCATGTC AGCCAGGCTG GTCTC-3' 3'-AACTCCCAAC CTCAGGTGAT GTGCC-5'
<i>TNF-α</i> (rs1800629)	chr6:31575254	G>A	5'-GAGGCAATAG GTTTTGAGGG GCATG-3' 3'-GGACGGGGTT CAGCCTCCAG GGTCC-5'

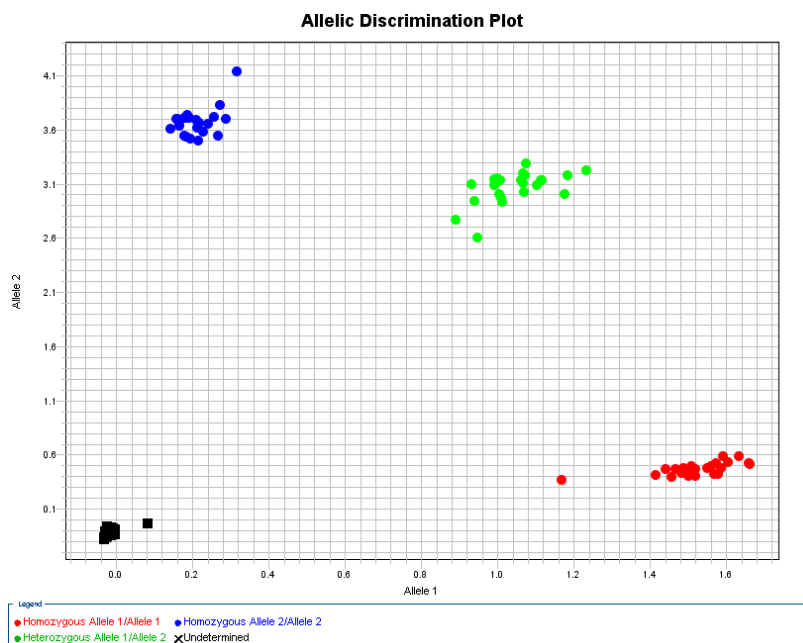
Tablica 2. Sadržaj Real-Time PCR reakcijske smjese

Komponente reakcijske smjese	Volumen (μL)
2xTaqMan Master Mix	5.00
20xTaqMan početnice	0.50
Voda bez nukleaza	4.50
Ukupan volumen reakcijske smjese po jažici	10.00

Tablica 3. Uvjeti Real-Time PCR reakcija

Parametar	Amplifikacija i aktivacija DNA polimeraze	PCR reakcija (40 ciklusa)	
		Denaturacija	Hibridizacija/elongacija
Temperatura (°C)	95°	95°	60°
Vrijeme (mm:ss)	10:00	00:15	01:00

Nakon provedene Real-Time PCR reakcije StepOnePlus™ softver, inačica 2.3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, SAD) prikazao je Rn vrijednosti dobivene na temelju fluorescentnih signala iz svake jažice te odredio alele prisutne u pojedinom uzorku. Primjer rezultata alelne diskriminacije, gdje su vrijednosti za Alel 1 (VIC® boja) uspoređene s vrijednostima za Alel 2 (FAM™ boja), prikazan je na Slici 3. Svaka jažica na 96-jažičnoj ploči prikazana je kao pojedinačna točka na grafikonu.



Slika 3. Primjer prikaza alelne diskriminacije s usporedbom vrijednosti Alela 1 (VIC® boja) i Alela 2 (FAM™ boja)

3.2.3.1. Statistička obrada rezultata genotipizacije

Statistička obrada podataka provedena je korištenjem programa Statistica za Windows, inačica 14.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD). Za sve izvedene testove razina statističke značajnosti bila je postavljena na $P \leq 0.05$. Statistička snaga istraživanja izračunata je pomoću kalkulatora ClinCalc LLC (<https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>).

Epidemiološki podaci analizirani su deskriptivnom statistikom. Kvantitativni podaci (numeričke varijable) prikazani su medijanom i interkvartilnim raspršenjem (minimum-maksimum), dok su kvalitativni podaci (kategorijske varijable) prikazani apsolutnim i relativnim frekvencijama. Za ispitivanje povezanosti između kvantitativnih podataka korišten je Kruskal-Wallisov test, nakon čega je primijenjen Scheffeov post hoc test ili ANOVA test s Tukeyevim post hoc testom, ovisno o normalnosti distribucije. Normalnost distribucije ispitivana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Za ispitivanje povezanosti između kvalitativnih podataka korišten je Pearsonov hi-kvadrat (χ^2) test.

Za ispitivanje razlika u učestalosti genotipova i alela između skupina ispitanika korišten je χ^2 test. Za analizu genetičke povezanosti genotipova i alela, prema dominantnom, recesivnom i kodominantnom modelu, korišteni su OR i CI. Kako bi se smanjio rizik od lažno pozitivnih rezultata pri višestrukim usporedbama, primijenjena je Bonferronijeva korekcija. Razina statističke značajnosti postavljena je na $P \leq 0.05$.

3.2.4. Analiza rijetkih predviđeno patogenih varijanti sekvenciranjem cjelokupnog egzoma

Sekvenciranje cjelokupnog egzoma provedeno je na uređaju Illumina HiSeq-2000 (Illumina, Inc. San Diego, CA, SAD). Od 573 ispitanica uključenih u istraživanje, sekvenciranje cjelokupnog egzoma je provedeno na 187 ispitanica (31 s obiteljskim i 59 sa sporadičnim ISPP-om te 97 kontrola). Dijagram toka ovog koraka istraživanja prikazan je na slici 4.



Slika 4. Dijagram toka trećeg koraka istraživanja: sekvenciranje cjelokupnog egzoma

3.2.4.1. Sekvenciranje cjelokupnog egzoma i anotacija varijanti

Sekvenciranje je provedeno s pokrivenošću od 30x, što omogućuje visoku točnost detekcije varijanti. Očitavanja su mapirana prema UCSC hg38 referentnom genomu pomoću alata za poravnanje kratkih očitavanja, BWA (od engl. *Burrows-Wheeler Aligner*) koji je u skladu sa smjernicama dobre prakse, GATK (od engl. *Genome Analysis Toolkit*) [91]. NGS biblioteke pripremljene su pomoću Agilent-All-Exon 2/5/6 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) i Illumina Nextera-Exome exome capture kita (Illumina, Inc. San Diego, CA, SAD) za analiziranje cjelokupnog humanog egzoma.

Za određivanje kontrole kvalitete, varijante su filtrirane prema dubini čitanja ($DP \geq 10$), kvaliteti i pouzdanost pročitanih podataka (engl. *call quality*) ($GQ \geq 20$), te vjerojatnosti da mjesto sadrži varijantu ($QUAL \geq 100$). Dodatno su sve varijante koje su udovoljile prije spomenute kriterije filtrirane i prema prediktoru GATK [92].

Varijante su potom anotirane uz pomoć alata za predviđanje učinka varijanti, točnije VEP (od engl. *Ensembl Variant Effect Predictor*) koji se koristi za predviđanje patogenosti [93]. Korišten je LOFTEE (od engl. *Loss-Of-Function Transcript Effect Estimator*) dodatak za VEP za procjenu varijanti koje uzrokuju prerano zaustavljanje translacije (engl. *stop-gain*), pomak okvira čitanja (engl. *frameshift*) i narušavanje procesa prekrajanja (engl. *splice-disrupting*), te za njihovu klasifikaciju u varijante koje uzrokuju gubitak funkcije gena (LOF, od engl. *loss-of-function*) s visokom ili niskom razinom pouzdanosti [94]. Varijante krivog smisla (engl. *missense*) su također anotirane prediktivnim algoritmima uz pomoć alata CADD (od engl. *Combined Annotation Dependent Depletion*) [95]. Baza podataka gnomAD korištena je kao izvor podataka o frekvenciji alela (AF, od eng. *allele frequency*) [96]. U ovom su istraživanju iz podataka dobivenih sekvenciranjem analizirane isključivo rijetke predviđeno patogene varijante, definirane kao one s AF manjom od 1 % u općoj populaciji i/ili bez dostupne AF u bazi gnomAD.

3.2.4.2. Analiza rijetkih predviđeno patogenih varijanti u cjelokupnom egzomu i panelu gena kandidata

Analiza RPP varijanti u cjelokupnom egzomu te unutar panela gena kandidata provedena je prema unaprijed definiranim kriterijima kvalitete varijanti: prema dubini čitanja ($DP \geq 10$), kvaliteti i pouzdanost pročitanih podataka ($GQ \geq 20$), te vjerojatnosti da mjesto sadrži varijantu ($QUAL \geq 100$). Za predikciju patogenosti RPP varijanti korišteni su specijalizirani bioinformatički alati, ovisno o funkcijskoj klasifikaciji varijante. Za varijante gubitka funkcije (LOF) primijenjen je dodatak LOFTEE, koji omogućuje njihovu kategorizaciju kao LOF varijante visokog utjecaja (engl. *high impact*). Za varijante krivog smisla (*missense*) korišten je prag CADD score ≥ 20 , čime se označavaju varijante s potencijalno patogenim utjecajem. U daljnjoj analizi isključene

su sve RPP varijante koje su bile prisutne u kontrolnoj skupini. Potom su primijenjeni dodatni kriteriji filtracije na temelju prisutnosti varijanti unutar skupine ispitanica s ISPP-om za analizu:

- I. cjelokupnog egzoma, uključene su heterozigotne varijante prisutne u najmanje dvije ispitanice (≥ 2) te homozigotne varijante prisutne u najmanje jednoj ispitanici (≥ 1);
- II. panela gena kandidata, uključene su sve heterozigotne i homozigotne varijante koje su bile prisutne u barem jednoj ispitanici (≥ 1).

Konačno, utvrđivanje RPP varijanti u genima koji dosad nisu povezivani s ISPP-om (izvan panela gena kandidata) omogućit će identifikaciju novih gena kandidata.

Za utvrđivanje razlike u broju identificiranih RPP varijanti između skupina korišten je Mann-Whitney U test. Normalnost distribucije podataka o broju RPP varijanti ispitivana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom.

3.2.4.3. Analiza opterećenja panela gena kandidata rijetkim predviđeno patogenim varijantama

Analiza opterećenja je bioinformatička metoda koja koristi zajednički genotipizirane podatke svih uzoraka kako bi procijenila kumulativni učinak RPP varijanti unutar specifičnog panela gena, s ciljem utvrđivanja njihove ukupne povezanosti s analiziranim fenotipom. Ova metoda objedinjuje informacije o panelu gena u jedan genetički *score* opterećenja, koji se zatim koristi za analizu povezanosti s određenim fenotipom, poput ISPP-a [97].

U ovom istraživanju, analiza opterećenja RPP varijantama provedena je na panelu gena kandidata u kombiniranoj kohorti ISPP-a te na pojedinačnim kohortama (obiteljskog i sporadičnog ISPP-a) u usporedbi s kontrolnom skupinom, koristeći generalizirani linearni model (GLM) uz pomoć paketa CMGgenomics [98] u programskom jeziku R, inačica 4.3.3 [99]. Za procjenu učinka, RPP varijante su dodatno anotirane s 6 prediktivnih algoritama: SIFT (od engl. *Sorting Intolerant From Tolerant*) [100], PolyPhen2 HVAR (od engl. *Polymorphism Phenotyping v2 - HumDiv Dataset (HDIV)/HumVar Dataset*) [101], LRT (od engl. *Likelihood Ratio Test*) [102] i MutationTaster [103]; CADD (≥ 20) [95] i AlphaMissense [104]. Prag značajnosti postavljen je na $P \leq 0.05$, uz korekciju za višestruko testiranje hipoteza korištenjem Benjamini-Hochberg metode, poznate i kao stopa lažnog otkrića (FDR, od engl. *false discovery rate*).

3.2.4.4. Analiza puteva novih gena kandidata s rijetkim predviđeno patogenim varijantama

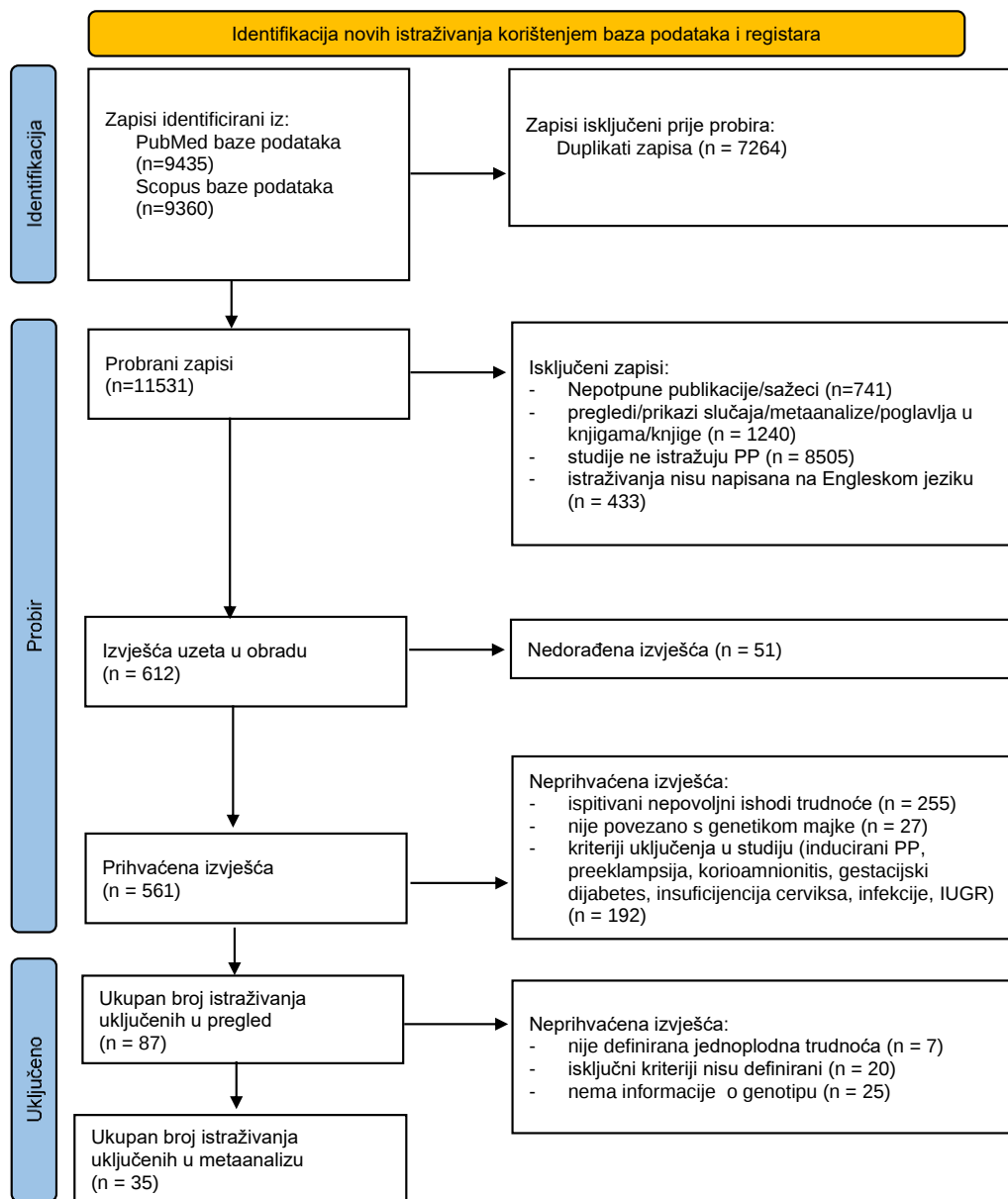
Za analizu bioloških puteva u koje su uključeni identificirani geni, nositelji RPP varijanti, provedena je analiza obogaćenja puteva pomoću mrežnog alata *Enrichr* (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>), koji omogućuje integriranu anotaciju i identifikaciju biološki relevantnih puteva na temelju unesenih gena [105–107]. Značajni putevi RPP varijanti

određeni su na temelju značajnosti postavljene na $P \leq 0.05$ nakon Benjamini-Hochberg korekcije, uz uvjet da su obuhvaćali najmanje dva gena.

4. REZULTATI

4.1. Panel gena kandidata utvrđen sustavnim pregledom i metaanalizom

Sustavnim pregledom literature identificirano je ukupno 18795 članaka. PRISMA dijagram toka prikazan je na slici 5 te pruža detaljan pregled procesa pretraživanja literature.



Slika 5. PRISMA dijagram toka odabira istraživanja uključenih u sustavni pregled i metaanalizu

U početnoj fazi uklonjeni su duplicirani članci, čime je preostalo 11531 članaka za evaluaciju na temelju naslova i sažetaka. Od toga je isključeno 10919 članaka iz različitih razloga (Slika 5). Nakon toga provedena je analiza cjelovitog teksta, što je dovelo do isključenja dodatnih 525 studija zbog nedostatka jasno definiranih kriterija uključenja ili razlika u mjerama ishoda. Sve uključne kriterije ukupno je zadovoljilo 87 članka (Slika 5). Popis svih članaka uključenih u pregled nalazi se u Tablici 4. Većina uključenih istraživanja (n=73) koristilo je pristup temeljen na hipotezi, dok je manji broj (n=14) primijenio pristup bez hipoteze.

4.1.1. Karakteristike uključenih istraživanja

4.1.1.1. Pristup temeljen na hipotezi (engl. *hypothesis-based*)

Od ukupnog broja istraživanja (n=73), samo 2 istraživanja koristila su pristup genetičke povezanosti (engl. *genetic linkage studies*), no u nijednom nije utvrđena statistička značajnost (Tablica 4) [75,108]. U preostalih 71 članka primijenjen je pristup temeljen na genima kandidatima, pri čemu je u 42 studije identificirano više od 20 gena koji su statistički značajno povezani s ISPP-om ($P \leq 0.05$) (Tablica 4).

Tablica 4. Pregled istraživanja temeljenih na hipotezi uključenih u sustavni pregled

Prvi autor i godina	Broj ispitanica (ISPP/kontrole)	Analizirani gen/i (SNP)
Andraweera i sur. 2012 [78]	107/1083	<i>VEGFA</i> (rs699947, rs3025039), <i>KDR</i> (rs2071559), <i>ANGPT1</i> (rs2507800)
Annellis i sur. 2004 [109]	202/185	<i>IL10</i> (rs1800896/rs1800872/rs3021097 haplotip), <i>TNF</i> (+488/rs3615257/rs1800629 haplotip), <i>IL4</i> (rs2243250), <i>MBL2</i> 54Asp (rs1800450, kodon 52, kodon 57, rs11003125, rs7096206), <i>IL1A</i> (rs1800587), <i>IL1B</i> (rs1143634, rs16944), <i>TGFB1</i> (rs1800468, rs1800469), <i>IL6</i> (rs1800795), <i>IL1RN</i> (C11100), <i>IL1R1</i> (rs2234650), <i>TNFRSF6/FAS</i> (rs2234767, rs1800682)
Awasthi i sur. 2019 [53]	559/559	<i>TLR4</i> (rs4986790, rs4986791), <i>TNFA</i> (rs1800629)
Barišić i sur. 2020 [110]	162/162	<i>DNMT1</i> (rs2228611), <i>DNMT3A</i> (rs1550117), <i>DNMT3B</i> (rs1569686), <i>DNMT3B</i> (rs2424913), <i>DNMT3L</i> (rs2070565)
Barlik i sur. 2019 [59]	150/150	<i>IL1B</i> (rs1143634), <i>IL1RN</i> (VNTR)
Belousova i sur. 2019 [56]	66/42	<i>IL1B</i> (rs1143634), <i>IL1RN</i> (VNTR), <i>TNFA</i> (rs1800629), <i>IL4</i> (VNTR)
Bitner i sur. 2010 [55]	32/63	<i>IL1B</i> (rs114634), <i>IL6</i> (rs1800796), <i>TNFA</i> (rs1800629), <i>IL1RN</i> (VNTR)
Boron i sur. 2022 [67]	115/115	<i>PGR</i> (rs10895068)
Chang i sur. 2023 [111]	112/1120	<i>ISG15</i> (rs4615788, rs1921, rs8997)
Chaves i sur. 2004 [112]	57/59	<i>IL1RN</i> (VNTR)
Chen i sur. 2004 [113]	80/105	<i>PON1</i> (Q192R), <i>PON2</i> (A148G, S311C)
Christensen i sur. 2014 [114]	207/444	<i>MTHFD1</i> (rs2236225)
Christiaens i sur. 2015 [115]	210/412	<i>NR3C2</i> (rs17484063, rs2883929)
Doh i sur. 2004 [116]	32/27	<i>ADRB2</i> (rs1042713, rs1042713/rs1042714 haplotip)

Gašparović Krpina i sur. 2020 [70]	118/119	VDR (rs2228570, rs7975232, rs1544410, rs731236, rs11568820)
Gebhardt i sur. 2009 [117]	27/237	IL1RN (VNTR), IL1B (rs1143634), IL4 (rs2243250), IL10 (rs1800896, rs1800871, rs1800872), LGALS13, TNFA (rs1800629, rs361525, +488)
Grisaru-Granovsky i sur. 2007 [118]	33+20+28/98	PAR1 (F2R)
Hao i sur. 2004 [77]	300/458	FV (rs6019/rs2213869/rs6022 haplotip), IL1R2 (rs2072476/rs2072481/rs2282743 haplotip), NOS2A (rs944724/rs944725 haplotip), OPRM1 (rs524731/rs553202/rs557748/rs477292 haplotip) + 426 SNP
Hirano i sur. 2010 [119]	58/72	PPARGgamma (rs3856806)
Hollegaard i sur. 2008 [120]	62/55	TNFA (rs1799724/1032/863/rs1799724/307/237 haplotip, rs1799724), IL1B (rs16944, rs1143634), IL1B (rs1143634, rs1143627), IL6 (rs1800796, rs1800795, rs1474347)
Hwang i sur. 2017 [121]	98/128	MTHFR (rs1801133, rs1801131)
Ijabi i sur. 2019 [122]	293/300	SKA2 (rs7208505)
Iwanaga i sur. 2011 [123]	51/71	FcyRIIb (rs2125685)
Javorski i sur. 2018 [69]	104/85	VDR (rs2228570, rs11568820)
Jones i sur. 2012 [124]	180/595	IL1RN (VNTR) MMP9 (rs73622645) TNFR1I (rs72863489), CD14 (rs73271540), TLR4 (rs4986790) IL1B (rs1143634), TNFA (rs1800629), TNFR1I (rs72863489), TNFSF6/FAS (rs978522), MBL (rs1800450, rs1800451)
Kadivnik i sur. 2022 [68]	109/109	PGR (rs1042838, rs1042839, rs10895068, rs1942836)
Karjalainen i sur. 2012 [108]	94+214/201	SFTPA1 (rs1136450), SFTPA2 (rs1965708), SFTPD (rs721917)
Karjalainen i sur. 2015 [125]	251/192	CXCR3 (rs2280964)
Kwon i sur. 2009 [126]	55/153	ICAM-1 (rs5498)
Kwon i sur. 2021 [127]	111/143	MTHFR (rs4846049, rs1537514), MTR (rs1805087), MTRR (rs1801394), TCN2 (rs1801198)
Langmia i sur. 2015 [128]	96/399	VEGFA (rs2010963, rs3025039, rs699947, rs10434)
Langmia i sur. 2016. [129]	96/399	IL1B (rs1143634, rs1143627, rs16944)
Lathouras i sur. 2018 [130]	66/66	MMP1 (rs1144393), MMP2 (rs243866), MMP3 (rs3025058), TIMP 2 (rs55743137)
Lee i sur. 2019 [131]	111/143	ACE (rs4646994)
Liang i sur. 2010 [57]	250/247	TNFA (rs1800629)
Lyubomirskaya i sur. 2020 [132]	50/50	IL4 (rs2243250), IL10 (rs1800896, rs1800872), RLN2 (rs4742076, rs3758239)
Manuck i sur. 2010 [133]	92/62	PGR (rs471767, rs578029, rs503362, rs582691, rs10985068, rs10501973)
Manzon i sur. 2014 [71]	33/98	VDR (rs2228570, rs7975232, rs1544410, rs731236)
Menon i sur. 2006 [134]	101/321	IL6 (rs1880243, rs1800797, rs1800796, rs1800795, rs1554606), IL6R (rs6687726, rs4845622, rs4845623), TNFA (rs1800683, rs2857713, rs1799964, rs1800629, rs769178, rs3179004), TNFR1

		(rs740841, rs2302350, rs1860545, rs4149577, rs4149576, rs3764874) <i>TNFR1</i> (rs590368, rs976881, rs616645, rs474247, rs653667, rs5746053, rs1061631)
Menon i sur. 2006 [54]	49+78/225+184	<i>TNFA</i> (rs1800683, rs2857713, rs1799964, rs1800629, rs769178, rs3179004), <i>TNFR1</i> (rs740841, rs2302350, rs1860545, rs4149577, rs4149576) <i>TNFR1</i> (rs590368, rs976881, rs616645, rs474247, rs653667, rs5746053, rs1061631)
Moore i sur. 2004 [135]	40/82	<i>IL1B</i> (rs1143634), <i>TNFA</i> (rs1800629)
Moura i sur. 2009 [136]	122+82/101+105	<i>TNFA</i> (rs1800629), <i>IL6</i> (rs1800796), <i>IL10</i> (rs1800896, rs1800871, rs1800872), <i>IFNG</i> (rs2430561)
Murtha i sur. 2006 [60]	95/105	<i>IL1RN</i> (VNTR)
Mustafa i sur. 2010 [137]	60/60	<i>GSTM1</i> (rs366631), <i>GSTT1</i> (rs17856199)
Mustafa i sur. 2013 [138]	300/300	<i>CYP1B1</i> (rs10012, rs1056836, rs4986888, rs1056827, rs1800440)
Myking i sur. 2011 [139]	196/211	1536 SNP
Nan i sur. 2015 [73]	108/108	<i>MTHFR</i> (rs1801133, rs1801131)
Pandey i sur. 2017 [52]	559/559	<i>IL10</i> (rs1800896, rs1800871, rs1800872)
Pandey i sur. 2020 [58]	255/255	<i>MMP1</i> (rs1799750), <i>MMP8</i> (rs11225395), <i>IL6</i> (rs1800795), <i>MMP8</i> (rs2155052), <i>MMP9</i> (rs3918242)
Pereza i sur. 2014 [140]	113/119	<i>MMP1</i> (rs1799750), <i>MMP9</i> (rs3918242)
Peterlin i sur. 2017 [141]	98/135	<i>ADRB2</i> (rs1042713)
Preda i sur. 2020 [142]	79/81	<i>IL6R</i> (rs8192282), <i>TIMP2</i> (rs2277698), <i>FGF1</i> (rs34003)
Ramos i sur. 2016 [143]	201/402	<i>IL1B</i> (rs1143627, rs16944), <i>TNFA</i> (rs361525, rs1800629), <i>IL10</i> (rs1800896, rs1800871, rs1800872), <i>IL6</i> (rs1800795), <i>IFNG</i> (rs2430561), <i>IL6R</i> (rs2228144, rs2228145), <i>TNFR1</i> (rs653667), <i>TLR2</i> (rs4696480), <i>TLR4</i> (rs4986790, rs4986791), <i>TIMP1</i> (rs2070584), <i>TIMP2</i> (rs2277698), <i>MMP9</i> (rs3918242)
Roberts i sur. 1999 [144]	55/110	<i>TNFA</i> (rs1800629)
Rocha i sur. 2013 [66]	40/20	<i>RLN2</i> (rs10115467, rs113390429, rs13293410, rs183312557, rs3758239, rs4742076, rs62557688, rs7029400, rs7856237, rs7875735, rs79324864, rs150032453)
Romero i sur. 2010 [145]	223/599	<i>TIMP2</i> (rs2277698), <i>COL4A3</i> (rs1882435/rs10178458/rs55997063 <i>haplotip</i>)+ 775 SNP
Rosenfeld i sur. 2017 [72]	146/229	<i>VDR</i> (rs2228570, rs7975232, rs1544410, rs731236)
Ryckman i sur. 2010 [146]	214/220	<i>PTGER3</i> (rs977214) + 1536 SNP
Salem i sur. 2018 [147]	315/161	<i>FNCD5</i> (rs726344, rs1746661)
Salem i sur. 2016 [148]	102/158	<i>LEP</i> (rs7799039), <i>LEPR</i> (rs1137101)
Salminen i sur. 2009 [149]	301/202	<i>SFTPC</i> (rs4715)
Simhan i sur. 2003 [150]	51/156	<i>IL6</i> (rs1800795)

Sugita i sur. 2012 [151]	51/71	<i>IL1A</i> (rs17561), <i>IL1B</i> (rs1143627, rs1143634), <i>IL1RN</i> (VNTR), <i>IL2</i> (rs2069762), <i>IL4</i> (rs2243250, rs2243240), <i>IL6</i> (rs1800796), <i>IL10</i> (rs1800896, rs1800871), <i>TNFA</i> (rs1800630, rs1799724), <i>TNFR1</i> (rs2234649), <i>TNFR2</i> (rs1061622, rs59404886), <i>FcRIIA</i> (rs1801274), <i>FcRIIB</i> (rs1050501, (646-184) A/Gc), <i>FcRIIIA</i> (rs396991), <i>FcRIIIB</i> (NA1NA2), <i>FcR</i> (rs3816051, rs1865096)
Thota i sur. 2012 [152]	76+145/191+194	<i>COMT</i> (rs4633, rs4680, rs4818, rs6269)
Uvuz i sur. 2009 [74]	50/50	<i>FVL</i> , <i>FVC</i> , <i>FII</i> (rs1799963), <i>MTHFR</i> (rs1801131, rs1801133), <i>ACE</i> (rs4646994)
Velez i sur. 2007 [153]	149+76/347+321	<i>IL6</i> (rs1880243, rs1800797, rs1800796, rs1800795, rs1554606), <i>IL6R</i> (rs6687726, rs4845622, rs4845623)
Velez i sur. 2008 [154]	145+76/194+191	<i>IL6</i> (rs1880243, rs12700386, rs1800797, rs1800796, rs1800795, rs2069840, rs1554606, rs11766273), <i>IL6R</i> (rs952146, rs1552481, rs6427641, rs11265610, rs1386821, rs4075015, rs4601580, rs4845618, rs6687726, rs7549338, rs4553185, rs4845622, rs4845623, rs4537545, rs4845625, rs4845374, rs11265618, rs10752641, rs4329505, rs2229238, rs4072391, rs7526293)
Velez i sur. 2008 [76]	145/194	<i>CRHBP</i> (rs1875999, rs32897, rs10055255, rs9332624), <i>IL5</i> (rs739718), <i>tPA</i> (rs879293), <i>PTGER3</i> (rs977214, rs594454), <i>SCNN1A/sTNF-R1</i> (rs3764874) + 1536 SNP
Velez i sur. 2009 [155]	82/197	<i>HSPA1L</i> (rs2075800), <i>IL15</i> (rs10833), <i>IL1RAP</i> (rs9290936), <i>IL2RA</i> (rs6602392), <i>IL6R</i> (rs4553185, rs4075015/rs4601580/rs4845618 haplotip), <i>TNFR2</i> (rs5746053), <i>CD14</i> (rs4914/rs2569190 haplotip), <i>CTLA4</i> (rs16840252/rs11571317/rs574290 haplotip), <i>IL2</i> (rs2069771/rs2069779/rs2069778 haplotip), <i>IL2RB</i> (rs84460/rs228945/rs228947 haplotip), <i>MMP9</i> (rs6104420/rs3918260 haplotip) + 1432 SNP
Vogel i sur. 2009 [65]	80/40	<i>RLN1</i> (rs3758240, rs1322220, rs10481591, rs7048887, rs1575279), <i>RLN2</i> (rs3758239, rs4742076, rs10115467), <i>RLN3</i> (rs7248735)
Wang et al. 2017 [156]	51/255	<i>MBL</i> (rs11003125, -221 Y/X)
Karjalainen i sur. 2012 [157]	272/201	<i>IL2RG</i> , <i>AR</i>
Haataja i sur. 2011 [75]	89+348/143	<i>IGF1R</i> (rs1521480, rs4966936, rs2684811)

Detaljna analiza istraživanja uključenih u sustavni pregled pokazala je nedostatak standardizacije u kriterijima za odabir ispitanica. Od 73 uključene studije, 77% (56/73) koristilo je termin „spontani prijevremeni porod“, dok su u preostalim studijama korišteni izrazi „prijevremeni porod“ (17/73) koji su opisivali isti ishod. U 10% (7/73) studija autori nisu naveli termin „jednoplodna trudnoća“ (ili sinonim) u metodološkom opisu trudnoća. Također, 27% (20/73) istraživanja nije jasno definiralo jesu li ispitanice s komplikacijama trudnoće (npr. preeklampsija, gestacijski dijabetes) i poznatim čimbenicima rizika (npr. upala) bile isključene, niti je bilo specificirano medicinsko stanje novorođenčeta pri rođenju. Zbog ovih značajnih razlika u definiranju i kriterijima odabira ispitanica, metaanaliza je provedena uz dodatne uključne kriterije.

Nakon primjene strogih uključnih kriterija, 35 studija u kojima je ukupno istraženo 136 SNP-a u 50 gena uzeto je u obzir za daljnju metaanalizu (Tablica 5).

Tablica 5. Istraživanja iz sustavnog pregleda uključena u metaanalizu

Prvi autor i godina	Broj ispitanica (ISPP/kontrole)	Analizirani gen/i (n=50) (SNP) (n=136)
Andraweera i sur. 2012 [78]	107/1083	<i>ANGPT1</i> (rs2507800), <i>VEGFA</i> (rs699947, rs3025039), <i>KDR</i> (rs2071559)
Awasthi i sur. 2019 [53]	559/559	<i>TLR4</i> (rs4986790, rs4986791), <i>TNFA</i> (rs1800629)
Barišić i sur. 2020 [110]	162/162	<i>DNMT1</i> (rs2228611), <i>DNMT3A</i> (rs1550117), <i>DNMT3B</i> (rs1569686), <i>DNMT3B</i> (rs2424913), <i>DNMT3L</i> (rs2070565)
Barlik i sur. 2019 [59]	150/150	<i>IL1B</i> (rs1143634), <i>IL1RN</i> (VNTR)
Belousova i sur. 2019 [56]	66/42	<i>IL1B</i> (rs1143634), <i>IL1RA</i> (VNTR), <i>TNFA</i> (rs1800629), <i>IL4</i> (VNTR)
Boron i sur. 2022 [67]	115/115	<i>PGR</i> (rs10895068)
Chang i sur. 2023[111]	112/1120	<i>ISG15</i> (rs4615788, rs1921, rs8997)
Gašparović i sur. 2020 [70]	118/119	<i>VDR</i> (rs2228570, rs7975232, rs1544410, rs731236, rs11568820)
Gebhardt i sur. 2009 [117]	27/237	<i>IL1RN</i> (VNTR), <i>IL1B</i> (rs1143634), <i>IL4</i> (rs2243250), <i>IL10</i> (rs1800896, rs1800871, rs1800872), <i>LGALS13</i> , <i>TNFA</i> (rs1800629, rs361525, +488)
Grisaru-Granovsky i sur. 2007 [118]	33+20+28/98	<i>PAR1</i> (F2R)
Hwang i sur. 2017 [121]	98/128	<i>MTHFR</i> (rs1801133, rs1801131)
Iwanaga i sur. 2011 [123]	51/71	<i>FcyRIIb</i> (rs2125685)
Kadivnik i sur. 2022 [68]	109/109	<i>PGR</i> (rs1042838, rs1042839, rs10895068, rs1942836)
Karjalainen i sur. 2012 [108]	94+214/201	<i>SFTPA1</i> (rs1136450), <i>SFTPA2</i> (rs1965708), <i>SFTPD</i> (rs721917)
Kwon i sur. 2021 [127]	111/143	<i>MTHFR</i> (rs4846049, rs1537514), <i>MTR</i> (rs1805087), <i>MTRR</i> (rs1801394), <i>TCN2</i> (rs1801198)
Lathouras i sur. 2018 [130]	66/66	<i>MMP1</i> (rs1144393), <i>MMP2</i> (rs243866), <i>MMP3</i> (rs3025058), <i>TIMP 2</i> (rs55743137)
Lee i sur. 2019 [131]	111/143	<i>ACE</i> (rs4646994)
Manzon i sur. 2014 [71]	33/98	<i>VDR</i> (rs2228570, rs7975232, rs1544410, rs731236)
Menon i sur. 2006 [134]	101/321	<i>IL6</i> (rs1880243, rs1800797, rs1800796, rs1800795, rs1554606), <i>IL6R</i> (rs6687726, rs4845622, rs4845623), <i>TNFA</i> (rs1800683, rs2857713, rs1799964, rs1800629, rs769178, rs3179004), <i>TNFR1</i> (rs740841, rs2302350, rs1860545, rs4149577, rs4149576, rs3764874), <i>TNFR2</i> (rs590368, rs976881, rs616645, rs474247, rs653667, rs5746053, rs1061631)
Menon i sur. 2006 [54]	49+78/225+184	<i>TNFA</i> (rs1800683, rs2857713, rs1799964, rs1800629, rs769178, rs3179004), <i>TNFR1</i> (rs740841, rs2302350, rs1860545, rs4149577, rs4149576, rs3764874), <i>TNFR2</i> (rs590368, rs976881, rs616645, rs474247, rs653667, rs5746053, rs1061631)

Moura i sur. 2009 [136]	122+82/101+105	<i>IL6</i> (rs1800795), <i>IL10</i> (rs1800896, rs1800871, rs1800872), <i>IFNG</i> (rs2430561), <i>TNFA</i> (rs1800629)
Pandey i sur. 2017 [61]	559/559	<i>IL10</i> (rs1800896, rs1800871, rs1800872)
Pandey i sur. 2020 (48)	255/255	<i>IL6</i> (rs1800795), <i>MMP1</i> (rs1799750), <i>MMP8</i> (rs11225395, rs2155052), <i>MMP9</i> (rs3918242)
Pereza i sur. 2014 [140]	113/119	<i>MMP1</i> (rs1799750), <i>MMP9</i> (rs3918242)
Preda i sur. 2020 [142]	79/81	<i>IL6R</i> (rs8192282), <i>TIMP2</i> (rs2277698), <i>FGF1</i> (rs34003)
Ramos i sur. 2016 [143]	201/402	<i>IL1B</i> (rs1143627, rs16944), <i>TNFA</i> (rs361525, rs1800629), <i>IL10</i> (rs1800896, rs1800871, rs1800872), <i>IL6</i> (rs1800795), <i>IFNG</i> (rs2430561), <i>IL6R</i> (rs2228144, rs2228145), <i>TNFR2</i> (rs653667), <i>TLR2</i> (rs4696480), <i>TLR4</i> (rs4986790, rs4986791), <i>TIMP1</i> (rs2070584), <i>TIMP2</i> (rs2277698), <i>MMP9</i> (rs3918242)
Roberts i sur. 1999 [144]	55/110	<i>TNFA</i> (rs1800629)
Rocha i sur. 2013 [66]	40/20	<i>RLN2</i> (rs10115467, rs113390429, rs13293410, rs183312557, rs3758239, rs4742076, rs62557688, rs7029400, rs7856237, rs7875735, rs79324864, rs150032453)
Rosenfeld i sur. 2017 [72]	146/229	<i>VDR</i> (rs2228570, rs7975232, rs1544410, rs731236)
Salminen i sur. 2009 [149]	301/202	<i>SFTPC</i> (rs4715)
Thota i sur. 2012 [152]	76+145/191+194	<i>COMT</i> (rs4633, rs4680, rs4818, rs6269)
Uvuz i sur. 2009 [74]	50/50	<i>FVL</i> , <i>FVC</i> , <i>FII</i> (rs1799963), <i>MTHFR</i> (rs1801131, rs1801133), <i>ACE</i> (rs4646994)
Velez i sur. 2007 [154]	149+76/347+321	<i>IL6</i> (rs1880243, rs1800797, rs1800796, rs1800795, rs1554606), <i>IL6R</i> (rs6687726, rs4845622, rs4845623)
Velez i sur. 2008[153]	145+76/194+191	<i>IL6</i> (rs1880243, rs12700386, rs1800797, rs1800796, rs1800795, rs2069840, rs1554606, rs11766273), <i>IL6R</i> (rs952146, rs1552481, rs6427641, rs11265610, rs1386821, rs4075015, rs4601580, rs4845618, rs6687726, rs7549338, rs4553185, rs4845622, rs4845623, rs4537545, rs4845625, rs4845374, rs11265618, rs10752641, rs4329505, rs2229238, rs4072391, rs7526293)
Wang i sur. 2017 [156]	51/255	<i>MBL</i> (rs11003125, -221 Y/X)

Iz metaanalize isključeno je 42 gena i 119 SNP-a jer su istraživani u manje od 3 studije [59, 61, 66-68, 70-72, 74, 78, 108, 110, 111, 118, 121, 123, 130, 131, 140, 142, 143, 149, 152, 153, 156, 158]. Od preostalih 8 gena (*IL-6*, *IL-10*, *IL-1B*, *IL-1RN*, *MMP9*, *TNF-α*, *TNFR2* i *VDR*) i 17 SNP-a, 6 gena i 15 SNP-a isključeni su zbog male veličine uzorka ili nedostatnih informacija o genotipu ispitanica. Za varijante objavljene u više studija istih autora, odabrana je studija s najvećim uzorkom za analizu [54, 134, 153, 154]. Na temelju dostupnih podataka, metaanaliza je provedena samo za SNP-ove gena *TNF-α* (rs1800629) (Tablica 6) i *IL-6* (rs1800795) (Tablica 5).

Povezanost između SNP-a gena *TNF- α* (rs1800629) i ISPP-a ispitivana je u ukupno 8 uključenih istraživanja (Tablica 6). Međutim, dodatna dva istraživanja naknadno su isključena iz metaanalize: istraživanje Menon i sur. jer se radilo o istraživanju istog autora na istoj populaciji [134], te istraživanje Ramos i sur. zbog nedostatka podataka [143]. Konačno, metaanalizom je detektirana značajna povezanost između SNP-a *TNF- α* (rs1800629) i rizika za ISPP, kako na razini alela (A vs. G; OR (95%CI)=1.328 (1.02–1.74), P=0.038), tako i za aditivni (AA vs. GG; OR (95%CI)=1.53 (1.05–2.22), P=0.025 i AA vs. GA; OR (95%CI)=1.519 (1.03–2.24), P=0.036) i recesivni genetički model (AA vs. GA + GG; OR (95%CI)=1.54 (1.06–2.19), P=0.022) (Tablica 6).

Povezanost između SNP-a *IL-6* (rs1800795) i ISPP-a istraživana je u ukupno 4 istraživanja uključenih u analizu (Tablica 7). Dva su istraživanja naknadno isključena zbog nedostatka podataka (Velez i sur.) i uključivanja istih ispitanika kao ranije opisano istraživanje (Ramos i sur.) [143, 153]. Metaanalizom nije identificirana značajna povezanost između SNP-a *IL-6* (rs1800795), na razini alelne distribucije i recesivnog genetičkog modela. Nadalje, izračun povezanosti korištenjem aditivnog, dominantnog i kodominantnog genetičkog modela nije bilo moguće izračunati zbog nedostatka podataka.

Tablica 6. Metaanaliza polimorfizma gena *TNF- α* (rs1800629)

	A vs. G		AA vs. GG		AA vs GA		GG vs GA		AA vs. GG + GA		GG + AA vs. GA		GA + AA vs. GG	
Prvi autor i godina	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P
Awasthi i sur. 2019. [53]	1.15 [0.96-1.39]	0.130	1.46 [0.99-2.16]	1.903	1.49 [0.99-2.25]	0.058	0.98 [0.76-1.27]	0.886	1.47 [1.01-2.15]	0.046	0.92 [0.79-1.18]	0.525	0.92 [0.73-1.17]	0.508
Belousova i sur. 2019. [56]	4.44 [0.94-20.98]	0.060	/	/	/	/	4.44 [0.94-20.98]	0.060	/	/	4.44 [0.94-20.98]	0.060	0.23 [0.05-1.06]	0.060
Gebhardt i sur. 2009. [117]	2.27 [1.10-4.69]	0.027	32.49 [1.28-827.70]	0.035	15.32 [0.58-405.11]	0.102	2.09 [0.88-4.97]	0.097	26.89 [1.07-676.76]	0.045	1.97 [0.83-4.66]	0.123	0.43 [0.19-1.00]	0.051
Menon i sur. 2006. (1) [54]	1.41 [0.95-2.10]	0.092	4.85 [0.66-35.66]	0.121	4.43 [0.57-34.19]	0.154	1.10 [0.55-2.18]	0.797	4.72 [0.65-34.68]	0.125	1.06 [0.53-2.07]	0.899	0.83 [0.43, 1.60]	0.570
Menon i sur. 2006. (2) [54]	0.83 [0.49, 1.40]	0.479	0.45 [0.05-3.93]	0.470	0.51 [0.06-4.64]	0.550	0.88 [0.48-1.61]	0.680	0.47 [0.05-4.05]	0.488	0.90 [0.49-1.64]	0.730	1.19 [0.66-2.14]	0.569
Moura i sur. 2009. (1) [136]	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	1.51 [0.80-2.86]	0.206
Moura i sur. 2009. (2) [136]	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	1.730 [0.86-3.50]	0.127
Roberts i sur. 1999. [144]	1.56 [0.88-2.76]	0.132	1.24 [0.11-14.20]	0.862	0.67 [0.06-7.89]	0.753	1.84 [0.93-3.64]	0.079	1.00 [0.09-11.28]	1.000	1.83 [0.93-3.61]	0.080	0.55 [0.28-1.08]	0.084
Ukupno	1.33 [1.02-1.74] ^a	0.038_a	1.53 [1.05-2.22]	0.025	1.52 [1.03-2.24]	0.036	1.26 [0.89-1.77] ^a	0.188 _a	1.54 [1.06-2.19]	0.022	1.23 [0.86-1.75] ^a	0.252 ^a	0.90 [0.65-1.24] ^a	0.510 ^a

Statistička značajnost je postavljena na $P \leq 0.05$, NI (nema informacija), / (niti jedan ispitanik nije imao AA genotip), ^a Nasumični učinak (engl. *random effect*)

Tablica 7. Metaanaliza polimorfizma gena IL-6 (rs1800795)

Prvi autor i godina	C vs. G		CC vs. GG		CC vs CG		GG vs CG		CC vs. GG + GC		GG + CC vs. GC		GC + CC vs. GG	
	OR [95% CI]	P	OR [95% CI]	P	OR [95% CI]	P	OR [95% CI]	P	OR [95% CI]	P	OR [95% CI]	P	OR [95% CI]	P
Menon i sur. 2006. [134]	1.03 [0.73-1.44]	0.870	NI	NI	0.19 [0.09-0.38]	0.000	1.19 [0.74-1.91]	0.467	0.83 [0.40-1.74]	0.626	NI	NI	NI	NI
Moura i sur. 2009. (1) [134]	N	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	1.06 [0.28-4.07]	0.931	NI	NI	NI	NI
Moura i sur. 2009. (2) [134]	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	0.83 [0.23-3.06]	0.784	NI	NI	NI	NI
Pandey i sur. 2020. [58]	4.11 [3.16-5.34]	0.000	NI	NI	2.97 [1.88-4.71]	0.000	2.36 [1.46-3.83]	0.001	4.75 [3.24-6.96]	0	NI	NI	NI	NI
Velez i sur. 2007. (1) [154]	1.50 [1.13-1.98]	0.005	/	/	/	/	NI	NI	/	/	NI	NI	NI	NI
Velez i sur. 2007. (2) [154]	0.58 [0.31-1.09]	0.089	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Ukupno	1.43 [0.66-3.08] ^a	0.368 ^a	NI	NI	0.76 [0.05-11.39] ^a	0.840 ^a	1.67 [0.86, 3.27] ^a	0.132 ^a	1.47 [0.47-4.61] ^a	0.513 ^a	NI	NI	NI	NI

Statistička značajnost je postavljena na $P \leq 0.05$, NI (nema informacija), / (niti jedan ispitanik nije imao CC genotip), ^a Nasumični učinak (engl. *random effect*)

4.1.1.2. Pristup bez unaprijed definirane hipoteze (engl. *hypotesis-free*)

U pregled je uključeno 14 istraživanja od kojih je u 12 korišten GWAS pristup [80, 81, 158–163], a u preostale 2 WES pristup [84, 85] (Tablica 8).

U GWAS pristupu, 5 istraživanja pokazalo je globalno značajne povezanosti ($P < 5 \times 10^{-8}$) [79, 82, 85, 164]. Dodatno su u GWAS istraživanjima pronađene globalno značajne povezanosti s gestacijskom dobi ispitanica [79, 164].

Kod WES pristupa, jedno istraživanje koju su proveli Huusko i sur. identificiralo je značajno opterećenje genu *HSPA1L* rijetkim varijantama (Tablica 8) [85].

Tablica 8. Pregled istraživanja bez unaprijed definirane hipoteze uključenih u sustavni pregled

Prvi autor i godina	Pristup (GWAS ili WES)	Broj ispitanica (ISPP/kontrole)	Fenotip	Identificirani gen/i (SNP)
Bacelis i sur. 2016 [80]	GWAS	1921	PPPO (154–258 dana gestacije)	/
Bhattacharjee i sur. 2023 [158]	GWAS	521/1042	ISPP (<37 tjedana gestacije)	/
Gupta i sur. 2022 [82]	GWAS	179/188	ISPP (≤34 tjedana gestacije)	MAST1 (rs188343966) ASTN1 (rs146756455)
Hasegawa i sur. 2023[160]	GWAS	385/644	ISPP i gestacijska dob	/
Huusko i sur. 2018 [85]	WES	17+192	ISPP (≤36 tjedana gestacije)	HSPA1L (rs34620296)
Huusko i sur. 2021 [163]	GWAS/ WES	48/808, 205	ISPP (≤36 tjedana gestacije)	/
Hur et al. 2023 [161]	GWAS	43/38	ISPP (<37 tjedana gestacije)	/
Juvinao-Quintero i sur. 2024 [159]	GWAS	933/1279	ISPP (<37 tjedana gestacije)	/
			gestacijska dob	/
McElroy i sur. 2013 [84]	WES	247/328	ISPP (<37 tjedana gestacije)	/
Myking i sur. 2013 [81]	GWAS	1535/1487	ISPP (<37 tjedana gestacije)	/
Pasanen i sur. 2023 [165]	GWAS	8542/89828	ISPP (≤37 tjedana gestacije)	EBF1 (rs12520982)
				EEFSEC (rs1553758423)
				GC (rs2276461)
				LINC02824 (rs192808132)
		68732	gestacijska dob	EBF1 (rs6881817)
				WNT4 (rs3820282)
				AGTR2 (rs5950512)
				EEFSEC (rs2999049)
				ADCY5 (rs10934646)
				WNT3A (rs708119)
				ZBTB38 (rs1991431)
				RHAG (rs10948514)
				TET3 (rs71848031)
				KCNAB1 (rs4679760)
				HAND2 (rs76907038)

				KCNN2 (rs13175113)
				COBL (rs151146987)
				GNAQ (rs11155617)
				COL27A1 (rs2808791)
Sole-Navais i sur. 2023 [80]	GWAS	18797/260246	ISPP (≤ 37 tjedana gestacije)	WNT4 (rs3820282)
				EEFSEC (rs4241495)
				KCNAB1 (rs1488425)
				HAND2 (rs11732983)
				EBF1 (rs2963463)
				HLA-DQA1 (rs9271673)
				LRP5 (rs312777)
			gestacijska dob	WNT4 (rs12037376)
				HIVEP3 (rs625036)
				FAF1 (rs72898946)
				TET3 (rs34555419)
				LSM3 (rs9823520)
				ADCY5 (rs28654158)
				EEFSEC (rs2659685)
				MRPS22 (rs62270785)
				ZBTB38 (rs7650602)
				KCNAB1 (rs4359773)
				LEKR1 (rs6780427)
				KDR (rs113828443)
				HAND2 (rs6831441)
				EBF1 (rs2963463, rs6879092)
				HLA-DQA1 (rs3129768)
				GDAP1 (rs6472846)
				FBXO32 (rs143530128)
				COL27A1 (rs7023208)
				TFAP4 (rs2387280)
				MYOCD (rs17713682)
				TCEA2 (rs6090040)
				AGTR2 (rs5991030)
				RAP2C (rs5930554)
Zhang i sur. 2015 [81]	GWAS	1228/1146	ISPP (< 34 tjedana gestacije)	/
Zhang i sur. 2018 [81]	GWAS	5896/43837	ISPP (≤ 37 tjedana gestacije)	EBF1 (rs2963463, rs2946169)
				EEFSEC (rs201450565, rs200745338)
			gestacijska dob	EBF1 (rs2963463, rs2946169)
				EEFSEC (rs2955117, rs200745338)
				AGTR2 (rs201226733, rs5950491)
				WNT4 (rs56318008, rs12037376)
				ADCY5 (rs4383453)

Statistička značajnost je postavljena na $P \leq 5 \times 10^{-8}$

4.1.2. Panel gena kandidata

U panel gena kandidata iz pristupa temeljenog na hipotezi uključen je jedini statistički značajan gen nakon metaanalize ($P \leq 0.05$) - gen *TNF- α* , a iz sveobuhvatnih genomskih istraživanja, 35 gena (*ADCY5, AGTR2, ASTN1, COBL, COL27A1, DNAJB8, EBF1, EEFSEC, FAF1, FBXO32, GC, GDAP1, GNAQ, HAND2, HIVEP3, HLA-DQA1, HSPA1L, KCNAB1, KCNN2, KDR, LEKR1, LINC02824, LRP5, LRP5, LSM3, MAST1, MRPS22, MYOCD, RAP2C, RHAG, TCEA2, TB38, TET3ZB, TFAP4, WNT3A, WNT4*) značajno povezanih s ISPP-om na globalnoj razini ($P \leq 5 \times 10^{-8}$). Ukupno je panel sadržavao 36 gena.

4.2. Česte varijante iz panela gena kandidata

4.2.1. Karakteristike uključenih ispitanica

Prije analize čestih varijanti provedena je analiza razlika u kliničkim značajkama ispitanica po skupina. Kliničke značajke ispitanica s obiteljskim i spontanom ISPP-om te kontrolnih ispitanica, kao i njihovih novorođenčadi prikazane su u Tablici 9. Epidemiološki podaci o paritetu bili su dostupni za 42/44 (95.5%) žena s obiteljskim ISPP-om, 229/248 (92.3%), žena sa sporadičnim ISPP-om i 217/281 (77.2%) žena u kontrolnoj skupini. Podaci o prethodnim PP-ovima bili su dostupni za 44/44 (100.0%) žena s obiteljskim ISPP-om i 242/248 (97.6%) žena sa sporadičnim ISPP-om. Sve ostale informacije dostupne su za 100% ispitanica.

Tablica 9. Kliničke značajke ispitanica te njihovih novorođenčadi

	Ispitanice (N=292)		Kontrole (N=281)	P
	Obiteljski ISPP (N=44)	Sporadični ISPP (N=248)		
Kliničke značajke ispitanica				
Dob trudnice/medijan (raspon)	31 (22–40)	31 (16–44)	30 (19–43)	0.128 ¹
Indeks tjelesne mase/medijan (raspon)	23 (17–32)	25 (19–39)	24 (16–39)	0.202 ²
Gestacijska dob (tjedni)/medijan (raspon)	34 (24–36)	35 (21–36)	40 (37–41)	0.000²
Paritet				
Primiparitet/N(%)	15 (35.7)	46 (20.1)	33 (15.2)	0.008³
Multiparitet/N(%)	27 (64.3)	183 (79.9)	184 (84.8)	
Prethodni PP				
Da/N(%)	11 (25.0)	24 (9.9)		0.005³
Ne/N(%)	33 (75.0)	218 (90.1)		
Kliničke značajke novorođenčadi				
Porođajna masa (grami)/medijan (raspon)	2170 (650–3400)	2269 (576–3550)	3460 (2380–4740)	0.000²

Statistička značajnost je postavljena na $P \leq 0.05$, ¹Jednosmjerna ANOVA, ²Kruskal–Wallisov test, ³ χ^2 test

Statistički značajna razlika zabilježena je očekivano u gestacijskoj dobi i porođajnoj masi između skupina s ISPP-om i kontrola ($P \leq 0.05$). Dodatno, zabilježena je statistički značajna razlika u paritetu; žene s obiteljskim ISPP-om imale su više jednoplodnih trudnoća u usporedbi

sa ženama sa sporadičnim ISPP-om i kontrolnom skupinom ($P \leq 0.05$). Osim toga, među višerotkinjama, žene s obiteljskim ISPP-om imale su veći broj prethodnih PP-a u odnosu na skupinu sa sporadičnim ISPP-om ($P \leq 0.05$).

4.2.2. Povezanost polimorfizama ispitivanih gena s idiopatskom spontanom prijevremenim porodom

Iz panela od 36 identificiranih gena/SNP-ova, 23 gena je isključeno jer su bili statistički značajno povezani s fenotipom gestacijske dobi, a ne s ISPP-om. Dodatno je još 5 gena isključeno jer su proizašla iz metaanaliza čiji su rezultati prethodno prikazani primarnim istraživanjima. U konačnici analiza genetičke povezanosti provedena je na ukupno 5 gena/6 SNP-ova: *ASTN1* (rs146756455), *EBF1* (rs2963463, rs2946169), *EEFSEC* (rs201450565), *MAST1* (rs188343966) te *TNF- α* (rs1800629).

Frekvencije genotipova *ASTN1* (rs146756455), *EBF1* (rs2963463, rs2946169) te *TNF- α* (rs1800629) bile su u HWR ($P > 0.05$) u svim skupinama. Međutim, *MAST1* (rs188343966) i *EEFSEC* (rs201450565) nisu bili u HWR zbog nedostatka varijacija, s MAF od 0.03 odnosno 0.02, što je onemogućilo analizu razlika u frekvencijama genotipova i alela među ispitivanim skupinama. Frekvencije genotipova i alela SNP-ova *ASTN1*, *EBF1*, i *TNF- α* gena u ispitanica i kontrola prikazane su u Tablici 10.

Tablica 10. Usporedba učestalosti genotipova i alela polimorfizama gena *ASTN1*, *EBF1* i *TNF- α* između ispitanica i kontrola

		Ispitanice	Kontrole	χ^2 *	P	Padj**
<i>ASTN1</i> (rs146756455)		N (%)	N (%)			
genotip	GG	277 (95.85)	264 (95.31)	1.23	0.542	3.276
	GC	11 (3.81)	13 (4.69)			
	AC	1 (0.34)	0			
alel	G	564 (97.58)	538 (97.11)	0.24	0.626	2.136
	A	14 (2.42)	16 (2.89)			
<i>EBF1</i> (rs2963463)		N (%)	N (%)			
genotip	TT	25 (8.68)	17 (6.09)	10.47	0.005	0.030
	TC	156 (54.1)	121 (43.37)			
	CC	107 (37.22)	141 (50.54)			
alel	T	182 (31.60)	155 (27.78)	1.98	0.160	0.960
	C	394 (68.40)	403 (72.22)			
<i>EBF1</i> (rs2946169)		N (%)	N (%)			
genotip	CC	165 (57.10)	180 (64.52)	4.78	0.092	0.552
	CT	103 (35.64)	88 (31.54)			
	TT	21 (7.26)	11 (3.94)			
alel	C	433 (74.91)	450 (80.65)	5.38	0.020	0.120
	T	145 (25.09)	108 (19.35)			
<i>TNF-α</i> (rs1800629)		N (%)	N (%)			
genotip	GG	208 (71.23)	213 (75.80)	7.68	0.104	0.624
	GA	70 (23.97)	59 (21.00)			
	AA	14 (4.80)	9 (3.20)			
alel	G	486 (83.22)	485 (86.47)	2.10	0.148	0.888
	A	98 (16.78)	77 (13.70)			

Statistička značajnost je postavljena na $P \leq 0.05$, * χ^2 test, ** Bonferronijeva korekcija

Među ispitivanim SNP-ovima, zabilježena je statistički značajna razlika između ispitanica i kontrola u distribuciji genotipova za SNP *EBF1* (rs2963463) te u frekvencijama alela za SNP *EBF1* (rs2963463) (Tablica 10). Međutim, nakon primjene Bonferronijeve korekcije, samo je SNP *EBF1* (rs2963463) ostao značajan (Padj=0.03). Genotip TT SNP-a *EBF1* (rs2963463) gena bio je češći u skupini s ispitanica (8.68%) nego u kontrolnoj skupini (6.09%). Dodatno su analizirane podskupine ISPP-a, obiteljski i sporadični u usporedbi s kontrolama te je statistički značajna razlika potvrđena za SNP *EBF1* (rs2963463) (Tablica 11). Značajna razlika je pronađena između genotipa skupine sporadičnog ISPP-a i kontrola (P=0.010) te alela skupine obiteljskog ISPP-a i kontrola (P=0.022). Međutim, nakon korekcije nije bilo značajne razlike. Za preostale SNP-ove, uključujući *ASTN1* (rs146756455) i *TNF-α* (rs1800629), nisu pronađene značajne razlike.

Tablica 11. Analiza polimorfizma gena *EBF1* (rs2963463) u obiteljskom i sporadičnom ISPP-u te kontrolama

	Ispitanice		Kontrola	Obiteljski ISPP vs. Sporadični ISPP			Obiteljski ISPP vs. kontrole			Sporadični ISPP vs. kontrole		
	Obiteljski ISPP	Sporadični ISPP										
	N (%)	N (%)	N (%)	χ^2 *	P	Padj**	χ^2 *	P	Padj**	χ^2 *	P	Padj**
genotip												
TT	6 (13.64)	19 (7.79)	17 (6.09)	1.63	0.442	2.652	5.84	0.054	0.324	8.68	0.010	0.060
TC	23 (52.27)	133 (54.51)	121 (43.37)									
CC	15 (34.09)	92 (37.70)	141 (50.54)									
alel												
T	35 (39.77)	147 (30.12)	155 (27.78)	3.21	0.073	0.438	5.26	0.022	0.132	0.70	0.404	2.424
C	53 (60.23)	341 (69.88)	403 (72.22)									

Statistička značajnost je postavljena na $P \leq 0.05$, * χ^2 test, ** Bonferronijeve korekcije

4.2.3. Usporedba učestalosti polimorfizama gena između skupina ispitanica, prema genetičkim modelima

Tablica 12 prikazuje genetičku povezanost SNP-ova gena *ASTN1*, *EBF1* i *TNF-α* s obiteljskim i sporadičnim ISPP-om u usporedbi s kontrolama, koristeći različite genetičke modele. Kao i u prethodnom poglavlju statistička značajnost je pronađena samo za SNP *EBF1* (rs2963463). Za SNP *EBF1* (rs2963463) major T alel učestaliji je u obiteljskim slučajevima (OR=2.21, 95% CI=1.42–3.42, Padj≤0.0001) u usporedbi s kontrolama.

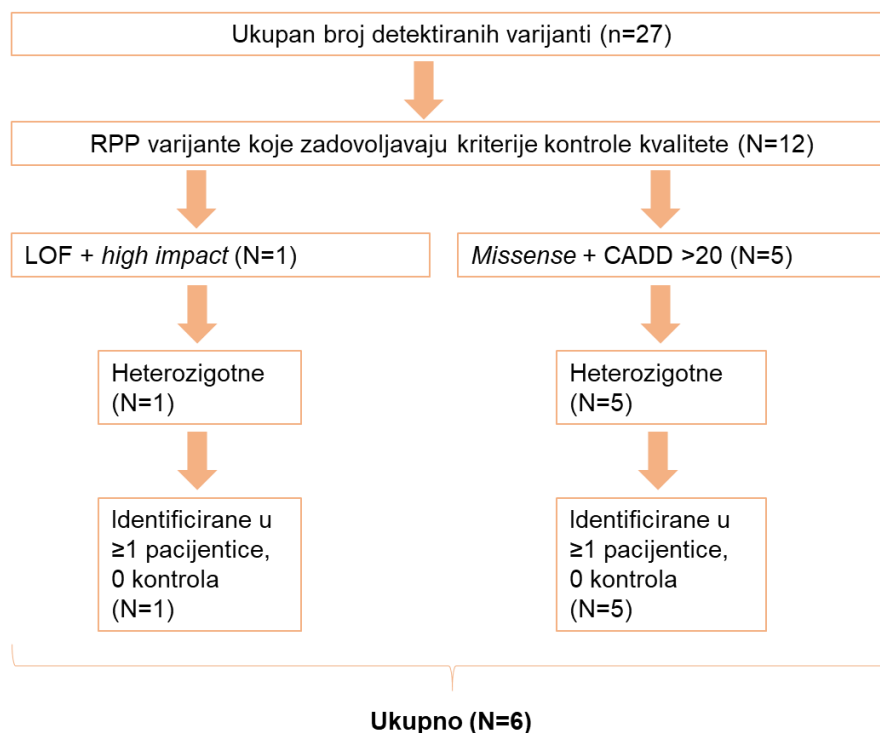
Tablica 12. Analiza genetičke povezanosti polimorfizama gena *ASTN1*, *EBF1* i *TNF- α* primjenom različitih genetičkih modela

Genetički modeli	Obiteljski ISPP vs. Sporadični ISPP			Obiteljski ISPP vs. kontrole			Sporadični ISPP vs. kontrole		
	OR (95% CI)	P	Padj*	OR (95% CI)	P	Padj*	OR (95% CI)	P	Padj*
ASTN1 (rs146756455)									
GG vs. GC+CC	4.76 (0.28–81.95)	0.282	1.692	4.54 (0.27–77.79)	0.296	1.776	0.96 (0.43–2.14)	0.913	5.478
GG+GC vs. CC	0.55 (0.02–13.62)	0.712	4.272	0.16 (0.00–8.19)	0.362	2.172	0.03 (0.00–0.57)	0.019	0.114
GG vs. GC	4.38 (0.25–75.74)	0.309	1.854	4.54 (0.27–77.79)	0.296	1.776	1.04 (0.46–2.37)	0.920	5.520
GG vs. CC	0.57 (0.00–14.26)	0.733	4.398	0.17 (0.00–8.89)	0.374	2.244	0.29 (0.01–7.26)	0.455	2.730
CC vs. GC	7.67 (0.11–550.17)	0.350	2.100	27.00 (0.22–33.54)	0.181	1.086	3.52 (0.13–95.09)	0.454	2.724
G vs. C	5.39 (0.32–91.12)	0.243	1.458	5.42 (0.32–91.22)	0.240	1.440	1.01 (0.49–2.09)	0.976	5.856
EBF1 (rs2963463)									
TT vs. TC+CC	1.87 (0.70–4.98)	0.211	1.266	2.43 (0.90–6.56)	0.079	0.474	1.30 (0.66–2.56)	0.446	2.676
TT+TC vs. CC	1.170 (0.60–2.30)	0.648	3.888	3.91 (2.03–7.53)	0.000	0.000	3.34 (2.40–4.64)	0.000	0.000
TT vs. TC	1.83 (0.66–5.06)	0.247	1.482	1.86 (0.66–5.21)	0.240	1.440	0.98 (0.49–1.98)	0.963	5.778
TT vs. CC	1.94 (0.67–5.63)	0.225	1.350	3.32 (1.14–9.70)	0.028	0.168	1.71 (0.85–3.47)	0.135	0.810
CC vs. TC	0.94 (0.47–1.90)	0.870	5.220	0.56 (0.28–1.12)	0.101	0.606	0.594 (0.41–0.85)	0.005	0.030
T vs. C	1.57 (1.02–2.44)	0.043	0.258	2.21 (1.42–3.42)	0.000	0.000	1.40 (1.08–1.82)	0.012	0.072
EBF1 (rs2946169)									
CC vs. CT+TT	0.71 (0.37–1.58)	0.303	1.818	0.55 (0.29–1.04)	0.067	0.402	0.77 (0.54–1.10)	0.149	0.894
CC+CT vs. TT	1.08 (0.31–3.85)	0.901	5.406	0.56 (0.15–2.10)	0.390	2.340	0.52 (0.24–1.12)	0.094	0.564
CC vs. CT	0.68 (0.35–1.33)	0.260	1.560	0.57 (0.29–1.10)	0.093	0.558	0.83 (0.57–1.21)	0.332	1.992
CC vs. TT	0.92 (0.25–3.39)	0.904	5.424	0.45 (0.12–1.73)	0.244	1.464	0.49 (0.22–1.06)	0.070	0.420
TT vs. CT	1.36 (0.36–5.08)	0.650	3.900	0.79 (0.20–3.11)	0.738	4.428	0.58 (0.26–1.31)	0.191	1.146
C vs. T	0.82 (0.49–1.36)	0.435	2.610	0.60 (0.36–1.01)	0.052	0.312	0.74 (0.55–0.99)	0.045	0.270
TNF-α (rs1800629)									
GG vs. GA+AA	0.75 (0.38–1.47)	0.398	2.388	0.62 (0.31–1.22)	0.165	0.990	0.83 (0.56–1.22)	0.343	2.058
GG+GA vs. AA	0.29 (0.09–0.92)	0.036	0.216	0.26 (0.08–0.81)	0.020	0.120	0.88 (0.34–2.25)	0.787	4.722
GG vs. GA	0.97 (0.45–2.11)	0.943	5.658	0.80 (0.37–1.74)	0.579	3.474	0.83 (0.55–1.25)	0.363	2.178
GG vs. AA	0.29 (0.09–0.93)	0.038	0.228	0.25 (0.08–0.78)	0.018	0.108	0.84 (0.33–2.16)	0.718	4.308
AA vs. GA	3.33 (0.93–12.01)	0.066	0.396	3.28 (0.91–11.82)	0.070	0.420	0.98 (0.36–2.65)	0.974	5.844
G vs. A	0.63 (0.36–1.10)	0.108	0.648	0.54 (0.31–0.94)	0.029	0.174	0.85 (0.61–1.20)	0.353	2.118

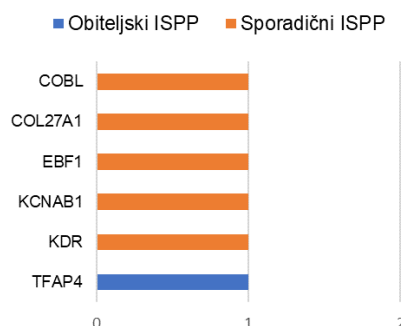
Statistička značajnost je postavljena na $P \leq 0.05$, *Bonferronijeva korekcija

4.3. Rijetke predviđeno patogene varijante iz panela gena kandidata

Koristeći podatke dobivene sekvenciranjem panela gena kandidata (n=36), detektirali smo ukupno 27 rijetkih varijanti u ukupno 15 gena iz panela. Nakon provedene kontrole kvalitete rijetkih varijanti identificirano je ukupno 12 RPP varijanti. RPP varijante podijeljene su prema tipu i zigoznosti (Slika 6). Dodatno isključene su sve varijante prisutne u kontrolama te je primijenjen kriterij da svaka RPP varijanta mora biti prisutna najmanje u jednoj ispitanici. Ukupno filtracijom je identificirano 6 RPP varijanti u 6 gena (Slika 6). Nadalje, broj RPP varijanti po pojedinom genu iz panela i pripadajućoj skupini prikazan je na slici 7.



Slika 6. Hodogram filtriranja rijetkih predviđeno patogenih varijanti iz panela gena kandidata



Slika 7. Broj RPP varijanti po genu iz panela i skupini ispitanica

RPP varijante koje nisu prisutne u kontrolnoj skupini detaljno su opisane u Tablicama 13 i 14. U tablici 13 prikazana je varijanta koja uzrokuje gubitak funkcije gena (LOF) detektirana u ispitanici s obiteljskim ISPP-om, a u tablici 14 prikazane su varijante krivoga smisla (*missense*) detektirane u skupini ispitanica s sporadičnim ISPP-om.

Tablica 13. Varijanta koja uzrokuje gubitak funkcije gena detektirana u ispitanici s obiteljskim ISPP-om u panelu gena kandidata

Gen	Varijanta (UCSC, hg19)	Promjena transkripta	Promjena sekvence aminokiselina	Zigotnost
<i>TFAP4</i>	chr16-4310225-T-TGAGGGCCTCTGTCTTGCAGCTTCTGCCCCCTCCGGCCCCCACCCCGGGGGGGGGGGGGGGGG	c.687_688insCCCCCCCCCCCCCGGGGTGGGGGCCGGAGGGGCGAGAAGCTGCAAGACAGAGGCCCTC	p.Thr230fs	HET

Tablica 14. Varijante krivog smisla detektirane u ispitanicima sa sporadičnim ISPP-om u panelu gena kandidata

Gen	Varijanta (UCSC, hg19)	Promjena transkripta	Promjena sekvence aminokiselina	Zigotnost
<i>COL27A1</i>	chr9-116945318-A-T	c.1979A>T	p.Tyr660Phe	HET
<i>COBL</i>	chr7-51258659-G-T	c.573C>A	p.Ser191Arg	HET
<i>KDR</i>	chr4-55956191-C-T	c.3124G>A	p.Val1042Ile	HET
<i>EBF1</i>	chr5-158135166-G-T	c.1568C>A	p.Pro523His	HET
<i>KCNAB1</i>	chr3-156234085-C-G	c.892C>G	p.Leu298Val	HET

4.3.1. Opterećenje panela gena kandidata rijetkim predviđeno patogenim varijantama

Analiza opterećenja panela gena kandidata RPP varijantama provedena je na skupinama s obiteljskim ISPP-om (N=31), sporadičnim ISPP-om (N=59) te kombiniranoj kohorti (N=90) u usporedbi s kontrolnim ispitanicima (N=97). Panel gena kandidata nije bio statistički značajno opterećen RPP varijantama, ni u kombiniranoj skupini ISPP-a, kao ni u obiteljskoj i sporadičnoj skupini pojedinačno, kao ni u kontrolnoj skupini (Tablica 15).

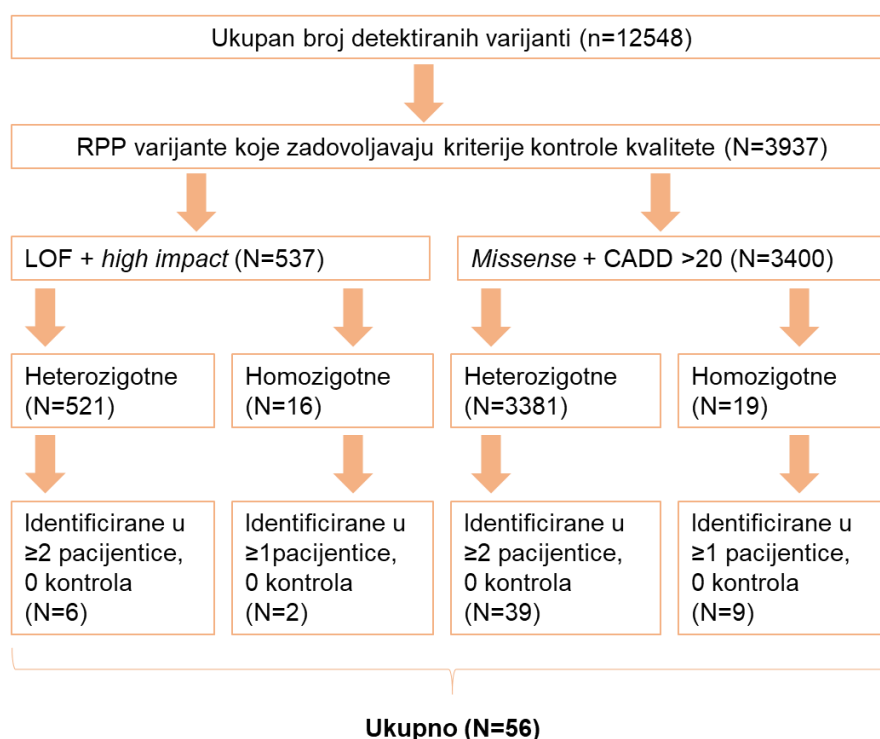
Tablica 15. Rezultati analize opterećenja panela gena kandidata rijetkim predviđeno patogenim varijantama

Skupina	P
Obiteljski ISPP vs kontrole	0.309
Sporadični ISPP vs kontrole	0.418
Kombinirana kohorta vs kontrole	0.417

Statistička značajnost je postavljena na $P \leq 0.05$

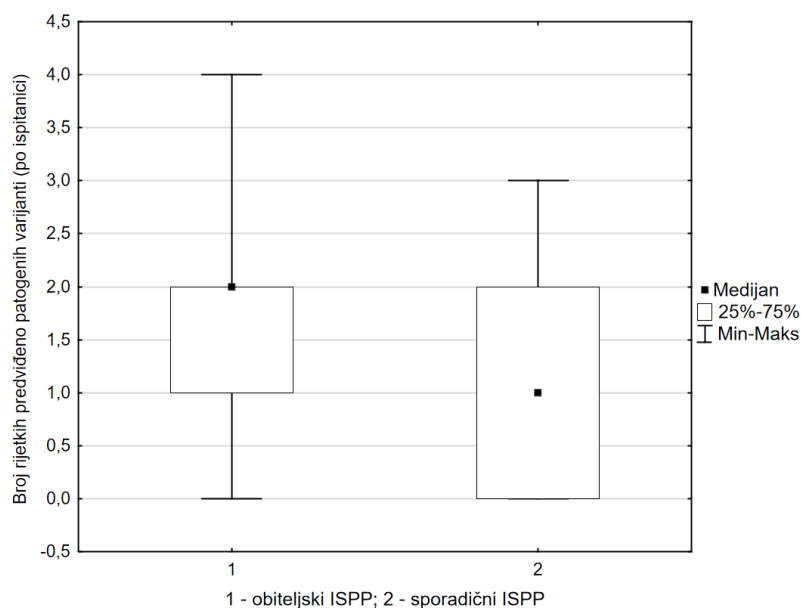
4.4. Rijetke predviđeno patogene varijante novootkrivenih gena kandidata iz cjelokupnog egzoma

Koristeći podatke dobivene sekvenciranjem cjelokupnog egzoma, detektirali smo ukupno 12548 rijetkih varijanti u ukupno 7364 gena. Nakon provedene kontrole kvalitete rijetkih varijanti identificirano je ukupno 3937 RPP varijanti. RPP varijante podijeljene su prema tipu i zgotnosti. Dodatno isključene su sve varijante prisutne u kontrolama te je primijenjen kriterij da svaka varijanta mora biti prisutna najmanje u jednoj ispitanici za homozigotne te najmanje dvije ispitanice za heterozigotne RPP varijante. Ukupno filtracijom je identificirano 56 RPP varijanti u 56 gena (Slika 8). Navedeni geni nisu prethodno povezani s ISPP-om te predstavljaju nove gene kandidate.



Slika 8. Hodogram filtriranja rijetkih predviđeno patogenih varijanti iz cjelokupnog egzoma

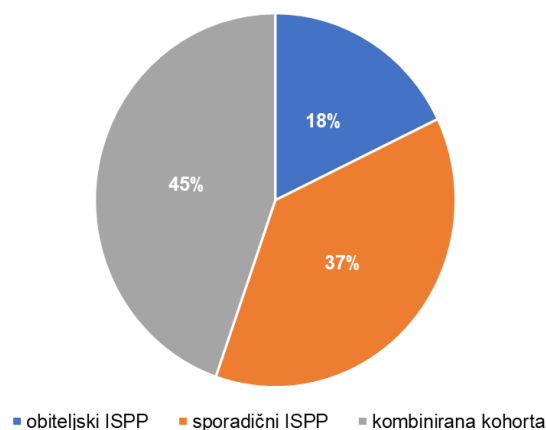
Mann-Whitney U testom dokazano je da je skupina s obiteljskim ISPP-om imala značajno više RPP varijanti u odnosu na skupinu s sporadičnim ISPP-om ($Z=2.08$, $P=0.037$) (Slika 9).



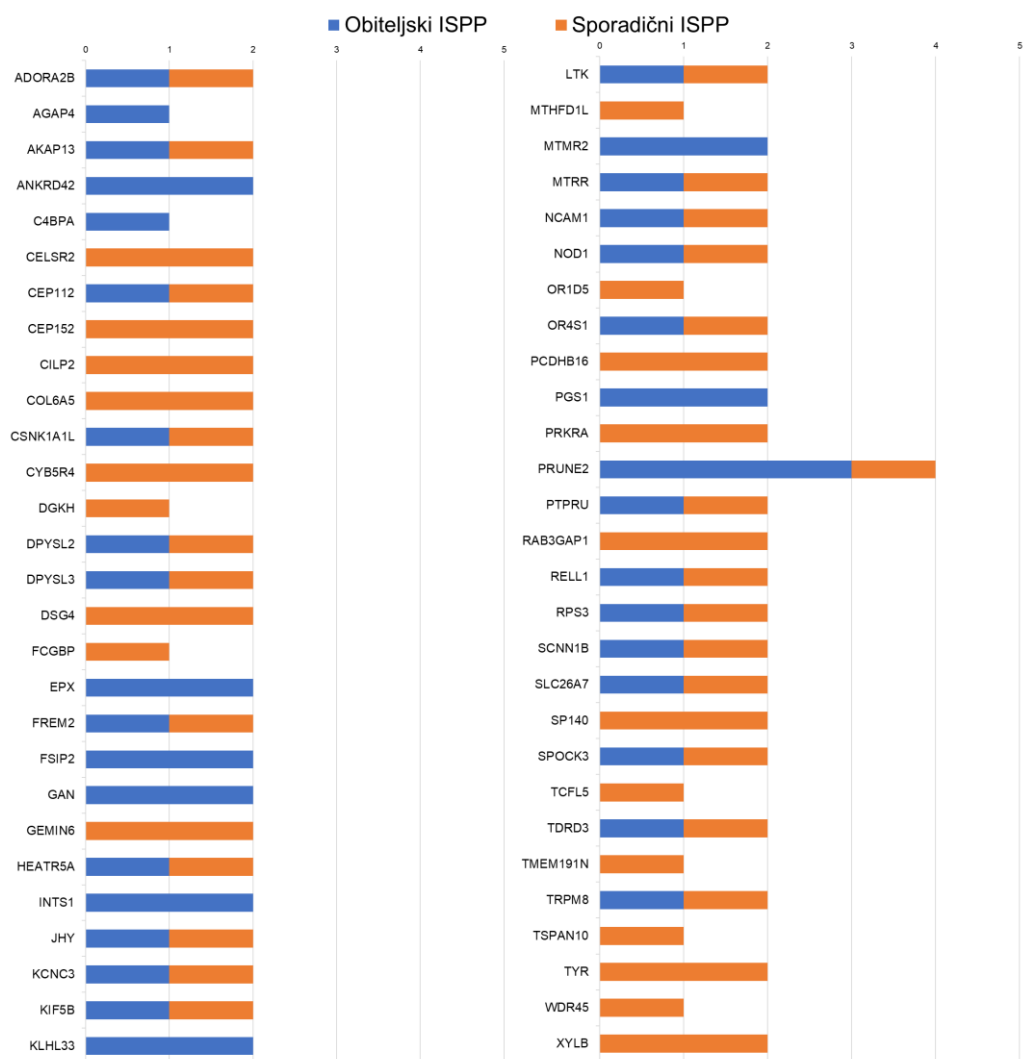
Mann-Whitney U test ($P=0.037$), Statistička značajnost je postavljena na $P \leq 0.05$

Slika 9. Usporedba razlika u broju rijetkih predviđeno patogenih varijanti po skupinama ispitanica

Nadalje, broj RPP varijanti po pojedinom genu i pripadajućoj skupini prikazan je na slikama 10 i 11. Potom u tablicama 16 i 17 slijede RPP varijante podijeljene po tipu te detektirane u skupini obiteljskog ISPP-a, odnosno u tablicama 18 i 19 u skupini sporadičnog ISPP-a. U tablicama su posebno označene varijante koje se preklapaju između skupina obiteljskom i sporadičnog ISPP-a.



Slika 10. Udio gena s rijetkim predviđeno patogenim varijantama detektiranih u skupinama ispitanica s ISPP-om



Slika 11. Broj rijetkih predviđeno patogenih varijanti po novo identificiranom genu i skupini ispitanica

Tablica 16. Varijante koje uzrokuju gubitak funkcije gena detektirane u skupini ispitanica s obiteljskim ISPP-om u cjelokupnom egzomu

Gen	Varijanta (UCSC, hg19)	Promjena transkripta	Promjena sekvence aminokiselina	Zigotnost
<i>CSNK1A1L</i>	chr13-37679357-CA-C	c.36delT	p.Val13fs	HET
<i>HEATR5A</i>	chr14-31776052-G-A	c.4852C>T	p.Arg1618*	HET
<i>NOD1</i>	chr7-30477274-T-C	c.2454-2A>G	NI	HET
<i>JHY</i>	chr11-122775930-G-A	c.915G>A	p.Trp305*	HET

NI-nema informacije, * predstavlja prisutnost varijante u obje skupine s ISPP-om (obiteljski i sporadični)

Tablica 17. Varijante krivog smisla detektirane u skupini ispitanica s obiteljskim ISPP-om u cjelokupnom egzomu

Gen	Varijanta (UCSC, hg19)	Promjena transkripta	Promjena sekvence aminokiselina	Zigotnost
ANKRD42	chr11-82922398-G-A	c.512G>A	p.Arg171Gln	HET
EPX	chr17-56274483-A-G	c.985A>G	p.Thr329Ala	HET
FSIP2	chr2-186671501-A-G	c.17468A>G	p.Lys5823Arg	HET
GAN	chr16-81396179-A-T	c.1049A>T	p.Asp350Val	HET
INTS1	chr7-1515595-T-G	c.5491A>C	p.Ser1831Arg	HET
KLHL33	chr14-20897824-C-T	c.1678G>A	p.Glu560Lys	HET
MTMR2	chr11-95595443-A-G	c.350T>C	p.Met117Thr	HET
PGS1	chr17-76399694-A-G	c.926A>G	p.Asp309Gly	HET
AGAP4	chr10-46329521-G-A	c.440C>T	p.Thr147Ile	HOM
CHD2	chr15-93563367-C-T	c.5032C>T	p.Arg1678Trp	HOM
C4BPA	chr1-207297337-C-G	c.499C>G	p.Leu167Val	HOM
ADORA2B	chr17-15848588-T-C	c.26T>C	p.Leu9Pro	HET
AKAP13	chr15-86076823-T-G	c.190T>G	p.Cys64Gly	HET
DPYSL2	chr8-26441394-A-G	c.523A>G	p.Ile175Val	HET
DPYSL3	chr5-146777372-G-A	c.1660C>T	p.Arg554Cys	HET
FREM2	chr13-39266304-G-A	c.4823G>A	p.Gly1608Asp	HET
KCNC3	chr19-50826537-T-C	c.1673A>G	p.Lys558Arg	HET
KIF5B	chr10-32344829-G-C	c.73C>G	p.Arg25Gly	HET
LTK	chr15-41804905-A-T	c.359T>A	p.Leu120Gln	HET
NCAM1	chr11-113141077-G-T	c.2377G>T	p.Ala793Ser	HET
OR4S1	chr11-48328327-T-A	c.553T>A	p.Leu185Met	HET
PTPRU	chr1-29585795-C-T	c.500C>T	p.Ser167Phe	HET
RELL1	chr4-37640079-C-A	c.433G>T	p.Asp145Tyr	HET
RPS3	chr11-75111777-T-A	c.70T>A	p.Phe24Ile	HET
SCNN1B	chr16-23388525-G-C	c.1310G>C	p.Arg437Thr	HET
SLC26A7	chr8-92301394-A-T	c.224A>T	p.His75Leu	HET
SPOCK3	chr4-168155159-C-T	c.166G>A	p.Gly56Arg	HET
TDRD3	chr13-61084767-G-A	c.1019G>A	p.Arg340Lys	HET
MTRR	chr5-7878358-C-T	c.703C>T	p.Leu235Phe	HET
MTRR	chr5-7878358-C-T	c.703C>T	p.Leu235Phe	HET
TRPM8	chr2-234863820-C-G	c.1288C>G	p.Leu430Val	HET
PRUNE2	chr9-79323556-C-G	c.3634G>C	p.Gly1212Arg	HET

* predstavlja prisutnost varijante u obje skupine s ISPP-om (obiteljski i sporadični)

Tablica 18. Varijante koje uzrokuju gubitak funkcije gena detektirane u skupini ispitanica sa sporadičnim ISPP-om u cjelokupnom egzomu

Gen	Varijanta (UCSC, hg19)	Promjena transkripta	Promjena sekvence aminokiseline	Zigotnost
COL6A5	chr3-130187764-G-T	c.6916G>T	p.Glu2306*	HET
PRKRA	chr2-179306432-C-CAGTTTCCATAAA	c.515-2_5151insTTTATGGA AACT	NI	HET
CSNK1A1L	chr13-37679357-CA-C	c.36delT	p.Val13fs	HET
HEATR5A	chr14-31776052-G-A	c.4852C>T	p.Arg1618*	HET
NOD1	chr7-30477274-T-C	c.2454-2A>G	NI	HET
JHY	chr11-122775930-G-A	c.915G>A	p.Trp305*	HET
FCGBP	chr19-40368497-G-GC	c.12850_12851insG	p.Ser4284fs	HOM
DGKH	chr13-42733380-C-CTTTTTTTTTTTTTT	c.623-15_6233dupTTTTTTTT TTTTTT	NI	HOM

* predstavlja prisutnost varijante u obje skupine s ISPP-om (obiteljski i sporadični); NI-nema informacije

Tablica 19. Varijante krivog smisla detektirane u skupini ispitanica sa sporadičnim ISPP-om u cjelokupnom egzomu

Gen	Varijanta (UCSC, hg19)	Promjena transkripta	Promjena sekvence aminokiseline	Zigotnost
CEP152	chr15-49073483-T-C	c.1487A>G	p.Asp496Gly	HET
CILP2	chr19-19654661-G-A	c.1307G>A	p.Arg436His	HET
CYB5R4	chr6-84650271-G-T	c.1297G>T	p.Asp433Tyr	HET
DSG4	chr18-28966732-G-T	c.166G>T	p.Ala56Ser	HET
GEMIN6	chr2-39008753-G-A	c.223G>A	p.Asp75Asn	HET
PCDHB16	chr5-140562318-C-T	c.184C>T	p.Arg62Cys	HET
RAB3GAP1	chr2-135815630-A-G	c.124A>G	p.Asn42Asp	HET
SP140	chr2-231115726-A-T	c.1007A>T	p.Asp336Val	HET
TYR	chr11-88911386-T-C	c.265T>C	p.Cys89Arg	HET
XYLB	chr3-38442441-A-G	c.1498A>G	p.Arg500Gly	HET
PRUNE2	chr9-79323556-C-G	c.3634G>C	p.Gly1212Arg	HET
ADORA2B	chr17-15848588-T-C	c.26T>C	p.Leu9Pro	HET
AKAP13	chr15-86076823-T-G	c.190T>G	p.Cys64Gly	HET
CEP112	chr17-64125941-C-T	c.565G>A	p.Glu189Lys	HET
DPYSL2	chr8-26441394-A-G	c.523A>G	p.Ile175Val	HET
DPYSL3	chr5-146777372-G-A	c.1660C>T	p.Arg554Cys	HET
FREM2	chr13-39266304-G-A	c.4823G>A	p.Gly1608Asp	HET
KIF5B	chr10-32344829-G-C	c.73C>G	p.Arg25Gly	HET
KCNC3	chr19-50826537-T-C	c.1673A>G	p.Lys558Arg	HET
LTK	chr15-41804905-A-T	c.359T>A	p.Leu120Gln	HET
MTRR	chr5-7878358-C-T	c.703C>T	p.Leu235Phe	HET
NCAM1	chr11-113141077-G-T	c.2377G>T	p.Ala793Ser	HET
OR4S1	chr11-48328327-T-A	c.553T>A	p.Leu185Met	HET
PTPRU	chr1-29585795-C-T	c.500C>T	p.Ser167Phe	HET

<i>RELL1</i>	chr4-37640079-C-A	c.433G>T	p.Asp145Tyr	HET
<i>RPS3</i>	chr11-75111777-T-A	c.70T>A	p.Phe24Ile	HET
<i>SCNN1B</i>	chr16-23388525-G-C	c.1310G>C	p.Arg437Thr	HET
<i>SLC26A7</i>	chr8-92301394-A-T	c.224A>T	p.His75Leu	HET
<i>SPOCK3</i>	chr4-168155159-C-T	c.166G>A	p.Gly56Arg	HET
<i>TDRD3</i>	chr13-61084767-G-A	c.1019G>A	p.Arg340Lys	HET
<i>TRPM8</i>	chr2-234863820-C-G	c.1288C>G	p.Leu430Val	HET
<i>OR1D5</i>	chr17-2966855-C-T	c.47G>A	p.Gly16Glu	HOM
<i>TCFL5</i>	chr20-61473379-G-T	c.1451C>A	p.Thr484Asn	HOM
<i>TMEM191B</i>	chr22-20377989-A-G	c.142A>G	p.Met48Val	HOM
<i>WDR45</i>	chrX-48934103-C-T	c.425G>A	p.Arg142Gln	HOM
<i>TSPAN10</i>	chr17-79612606-G-C	c.739G>C	p.Gly247Arg	HOM
<i>MTHFD1L</i>	chr6-151281537-A-G	c.1933A>G	p.Thr645Ala	HOM

* predstavlja prisutnost varijante u obje skupine s ISPP-om (obiteljski i sporadični)

4.4.1. Signalni putevi u koje su uključeni novi geni kandidati

Novoidentificirani geni analizirani su putem *Enrichr alata* za obogaćenje signalnih puteva. Analiza na kombiniranoj kohorti ispitanica s ISPP-om izdvojila je put metabolizma pirimidina u koji su uključena 2/56 gena kao statistički značajan (Tablica 20). Dodatno je analizirano 10 gena identificiranih samo u skupini obiteljskih ISPP-a te 25 u sporadičnih ISPP-a. Statistička značajnost detektirana je za put metabolizma fosfolipida u skupini obiteljskog ISPP-a, kojem pripada 2/10 gena, dok je u skupini sporadičnog ISPP-a značajna povezanost pronađena za signalni put kadherina, kojem pripada 2/25 novih gena (Tablica 20).

Tablica 20. Statistički značajni signalni putevi novoidentificiranih gena

Naziv puta	Skupina	Geni	OR	P	Padj*
Metabolizam pirimidina	Kombinirana kohorta	<i>DPYSL2, DPYSL3</i>	92.30	3.42×10^{-4}	0.002
Signali put kadherina	Sporadični ISPP	<i>PCDHB16, CELSR2</i>	14.10	0.010	0.032
Metabolizam fosfolipida	Obiteljski ISPP	<i>PGS1, MTMR2</i>	23.66	4.71×10^{-3}	0.034

Statistička značajnost je postavljena na $P \leq 0.05$, *Benjamini-Hochberg korekcija

5. RASPRAVA

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoje li u genomu žena varijante koje bi mogle predstavljati čimbenike rizika za ISPP, s posebnim naglaskom na doprinos RPP varijanti. Istraživanje je obuhvatilo varijante u prethodno istraživanim genima (unutar panela gena kandidata), kao i u cjelokupnom egzomu, što je omogućilo identifikaciju novih gena koji dosad nisu bili povezani s ISPP-om. Dodatno, uzimajući u obzir potvrđenu ulogu pozitivne obiteljske anamneze u multifaktorijskoj patofiziologiji ISPP-a, po prvi su put analizirane razlike između ispitanica s obiteljskim i onih sa sporadičnim ISPP-om. Konačno, istraživanjem su identificirane RPP varijante u 56 gena čija povezanost s ISPP-om dosad nije bila poznata, čime su istaknuti kao potencijalni novi geni kandidati. Učestalost RPP varijanti bila je statistički značajno viša u skupini ispitanica s pozitivnom obiteljskom anamnezom ISPP-a u usporedbi sa sporadičnim slučajevima, što dodatno upućuje na moguću nasljednu etiologiju ovog stanja. Među navedenim genima istaknuo se gen *PRUNE2*, u kojem je RPP varijanta detektirana u dvije različite obitelji s ISPP-om, dok u kontrolnoj skupini nije zabilježena, podupirući njegov mogući doprinos razvoju ISPP-a. Nadalje, novi geni kandidati pripadaju signalnom putu metabolizma pirimidina, koji također dosad nije bio povezan s patogenezi ISPP-a. S druge strane, iako panel od 36 gena kandidata, odabranih na temelju sustavnog pregleda i metaanalize prethodnih istraživanja, nije pokazao značajno opterećenje RPP varijantama, ukupno je identificirano šest takvih varijanti unutar pojedinačnih gena iz panela. Osim toga, jedna od čestih varijanti u genu *EBF1*, koja je u prethodnim istraživanjima povezana s istraživanom patologijom i u ovom je istraživanju pokazala statistički značajnu povezanost s ISPP-om u obje skupine ispitanica, što dodatno podupire njezinu moguću ulogu u patofiziologiji bolesti.

5.1. Novi geni kandidati

Kao što je prethodno navedeno, ovim je istraživanjem identificirano 56 različitih RPP varijanti u 56 gena koji dosad nisu bili opisani u kontekstu ISPP-a. Zbog svoje niske učestalosti u općoj populaciji, rijetke varijante često izmiču statističkoj snazi klasičnih asocijacijskih istraživanja, iako istovremeno mogu imati snažan funkcionalni učinak na gene [166]. RPP varijante, koje se odlikuju potencijalom za značajan utjecaj na funkciju gena, bile su u središtu ovog istraživanja upravo zbog njihove moguće uloge u patogenezi ISPP-a. Poznato je da su brojni rijetki obiteljski poremećaji posljedica rijetkih alela velikog učinka, a evolucijska teorija predviđa da bi aleli povezani s bolestima i/ili stanjima trebali biti rijetki [167]. Korištenjem naprednih bioinformatičkih alata, provedena je precizna filtracija podataka dobivenih sekvenciranjem cjelokupnog egzoma, što je omogućilo izdvajanje varijanti koje su rijetke u populaciji, ali koje mogu imati biološki značajan učinak u razvoju ISPP-a. Na taj način, istraživanje RPP varijanti

ne samo da doprinosi novim saznanjima o genetičkoj osnovi ISPP-a, već dodatno podupire hipotezu o njihovoj potencijalnoj ulozi u etiologiji ovog složenog stanja.

Usporedbom učestalosti RPP varijanti među ispitanicama s obiteljskim i sporadičnim oblikom ISPP-a, zabilježena je statistički značajna razlika ($P \leq 0.05$), pri čemu je skupina s obiteljskim ISPP-om imala značajno veći broj RPP varijanti u odnosu na skupinu sa sporadičnim slučajevima (Slika 9). Ova razlika može odražavati veću kumulaciju RPP varijanti u obiteljskim slučajevima, gdje nasljedni čimbenici mogu imati ključnu ulogu, što je prethodno pokazano i u brojnim drugim stanjima povezanim s rijetkim alelima [167]. Važno je naglasiti da je ovo prvo istraživanje koje je u svoj dizajn uključilo paralelnu analizu obiteljskih i sporadičnih slučajeva ISPP-a, s posebnim fokusom na RPP varijante. Premda rezultati upućuju na potencijalnu važnost ovih varijanti u obiteljskim slučajevima, njihovu stvarnu ulogu u etiologiji ISPP-a potrebno je dodatno potvrditi daljnjim segregacijskim istraživanjima, kako bi se utvrdilo prenose li se doista identificirane varijante unutar obitelji, te imaju li stvarnu ulogu u etiologiji ISPP-a. Ovaj pristup predstavlja važan smjer budućih istraživanja, koji bi mogao značajno doprinijeti razjašnjenju genetičke podloge ISPP-a.

Od ukupno 56 detektiranih RPP varijanti u 56 različita gena, 18% (10/56) identificirano je isključivo u skupini s obiteljskim ISPP-om, 37% (21/56) u skupini sa sporadičnim ISPP-om, dok se preostalih 45% (25/56) nalazilo u tzv. kombiniranoj kohorti (Slika 10). Među njima posebno se ističe gen *PRUNE2* (od engl. *prune homolog 2 with BCH domain*) u kojem je RPP varijanta dijeljena među 4 ispitanice (Slika 11). Ovaj se gen proteže na približno 1.3 Mb na kromosomu 9q21.32 [178, 179] te kodira protein s konzerviranom BCH domenom kojom regulira morfogenezu, diferencijaciju, pokretljivost i apoptozu povezujući se s komponentama signalnih mreža [168]. U našem istraživanju, varijanta krivoga smisla c.3634G>C (p.Gly1212Arg) u *PRUNE2* genu pronađena je u tri ispitanice s obiteljskim te u jednoj ispitanici sa sporadičnim ISPP-om, a posebno je zanimljiva jer je potpuno odsutna iz baze gnomAD, koja uključuje „zdrave“ pojedince. Važno je naglasiti da su sve tri ispitanice s obiteljskim ISPP-om u kojih je detektirana, bile u krvnom srodstvu (sestre), što dodatno upućuje na njen mogući nasljedni karakter. Rezultati analize ekspresije gena u posteljnom tkivu žena s preeklampsijom i intrauterinim zastojem rasta, koju su proveli Medina-Bastidas i sur., pokazali su značajnu prekomjernu ekspresiju gena *PRUNE2* u odnosu na posteljice iz terminskih trudnoća [169]. Iako uloga ove varijante u patogenezi ISPP-a još nije definitivno potvrđena, prikazani rezultati svakako upućuju na potrebu za dodatnom validacijom njenog kliničkog značaja, osobito kroz segregacijska i funkcionalna istraživanja.

Kako bi se dodatno provjerio potencijalni klinički značaj utvrđenih RPP varijanti, ovim je istraživanjem provedena i analiza funkcionalne obogaćenosti puteva kojom se ispitalo jesu li navedene varijante povezane s određenim biološkim putevima. Cilj ovog ispitivanja bio je identificirati funkcionalne klastere među novootkrivenim genima i istražiti mehanizme

povezane s patofiziologijom ISPP-a. Analiza puteva za 56 novoidentificiranih gena istaknula je značajnost signalnog puta metabolizma pirimidina, ključnog za niz staničnih funkcija – uključujući metabolizam ugljikohidrata, oksidativnu fosforilaciju, biosintezu nukleotida i prijenos signala (Tablica 20) [170]. U kontekstu povezanosti s etiologijom ISPP-a, posebno se ističu geni *DPYSL2* i *DPYSL3*, koji su u ovom istraživanju povezani s ovim signalnim putem, a poznati su po svojoj ulozi u migraciji stanica i aksonalnoj produkciji. *DPYSL2* (od engl. *dihydropyrimidinase-like 2*) regulira staničnu plastičnost i sazrijevanje neurona, dok *DPYSL3* (od engl. *dihydropyrimidinase-like 3*) ima sličnu funkciju u neurološkom razvoju [171, 172]. Iako ne postoje konkretna istraživanja koja direktno povezuju ove gene s ISPP-om, metabolomska istraživanja ukazuju na povezanost poremećaja u unutarstaničnom metabolizmu energije s ISPP-om. Naime, u placentama žena s ISPP-om identificirane su značajno niže razine metabolita u odnosu na žene s terminskim porodom [173].

Dodatno su analizirani putevi u koje su bili uključeni geni identificirani isključivo u skupini obiteljskog (10/56 gena), odnosno sporadičnog ISPP-a (21/56 gena) (Tablica 20). Dva gena, *PGS1* (od engl. *phosphatidylglycerophosphate synthase 1*) i *MTMR2* (od engl. *myotubularin related protein 2*), identificirana samo u skupini s obiteljskim ISPP-om, sudjeluju u putu metabolizma fosfolipida. Iako ovi geni nisu prethodno povezani s ISPP-om, navedeni put je utemeljen metabolomskim istraživanjima. Morillon i sur. otkrili su niže razine plazmatskih fosfolipida u žena s ISPP-om u odnosu na žene koje su rodile u terminu [174]. Rezultati ove i brojnih drugih metabolomskih studija sugeriraju da disfunkcija u metabolizmu fosfolipida može igrati ulogu u patofiziologiji ISPP-a [174, 175]. Fosfolipidi su ključni za stabilnost bioloških membrana i upalne procese, dok su pohrana i razgradnja lipida povezani s komplikacijama u trudnoći [176]. Iako nije jasno je li disfunkcija u metabolizmu fosfolipida uzrok ili posljedica ISPP-a, naši rezultati sugeriraju da varijante u genima uključenima u ovaj put mogu utjecati na ekspresiju fosfolipida i biti povezane s etiologijom ISPP-a.

S druge strane, u signalni put kadherina uključena su dva gena, *PCDHB1* (od engl. *protocadherin beta 1*) i *CELSR2* (od engl. *cadherin efg lag seven pass g-type receptor 2*), identificirana samo u skupini ispitanica sa sporadičnim ISPP-om. Iako trenutno ne postoje istraživanja koja povezuju ovaj signalni put s ISPP-om, poznato je da kadherini igraju ključnu ulogu u staničnoj adheziji i održavanju integriteta tkiva, osobito u endometriju i placenti [177]. S obzirom na njihovu važnost u ovim procesima, moguće je da imaju ulogu u patofiziologiji, sugerirajući njihov potencijalni doprinos razvoju ovog stanja.

5.2. Panel gena kandidata

Panel gena kandidata konstruiran je na temelju rezultata sustavnog pregleda literature i metaanalize, s ciljem integriranja svih dosad identificiranih povezanosti majčina genoma s

ISPP-om. Ovaj panel uključuje gene koji su proizašli iz istraživanja gena kandidata, kao i one identificirane u sveobuhvatnim genomskim istraživanjima.

Pri odabiru gena primijenjeni su strogi kriteriji: za gene iz istraživanja gena kandidata kriterij uključivanja bila je statistički značajna povezanost nakon metaanalize ($P \leq 0.05$), dok je za gene iz sveobuhvatnih genomskih istraživanja kriterij bila povezanost utvrđena na globalnoj razini ($P \leq 5 \times 10^{-8}$). Na temelju tih kriterija, u panel je iz istraživanja gena kandidata uključen gen *TNF- α* , dok je iz sveobuhvatnih genomskih analiza identificirano 35 gena, od kojih je 13 povezano s ISPP-om, a 22 s gestacijskom dobi ispitanica.

Osim što je sustavnim pregledom identificirano više od 1536 SNP-ova povezanih s ISPP-om, detaljna analiza istraživanja uključenih u pregled pokazala je nedostatak standardizacije u kriterijima za odabir ispitanica. Zbog toga je, s ciljem razjašnjenja i objedinjavanja svih dosad dobivenih rezultata, provedena metaanaliza, što je omogućilo uključivanje relevantnih gena u panel gena kandidata. Međutim, metaanaliza, kao i iz nje proizašli geni uključeni u panel, imali su svoja ograničenja, budući da neke varijante nisu bile obuhvaćene metaanalizom zbog nejasnih kriterija za uključivanje ispitanica u provedenim istraživanjima. Konačno, među analiziranim SNP-ovima, izdvojena su dva ključna SNP-a gena *TNF- α* (rs1800629) i *IL-6* (rs1800795) (Tablice 6 i 7). Rezultati su pokazali da je SNP u *TNF- α* genu jedini statistički značajno povezan s ISPP-om, čime se ističe kao potencijalni faktor rizika i umjeren signal relevantan za buduća istraživanja. *TNF- α* je multifunkcionalni proupalni citokin koji igra ključnu ulogu u pokretanju kaskade događaja koji mogu dovesti do ISPP-a, prvenstveno povećanjem ekspresije MMP-ova koji razgrađuju kolagen, dok istovremeno smanjuje biosintezu TIMP-ova (engl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*) [61].

Iz sveobuhvatnih genomskih istraživanja u panel su uključeni geni koji su na globalnoj razini povezani s dva različita fenotipa: ISPP-om definiranim kao porodom prije 37 tjedana trudnoće, te s gestacijskom dobi kod koje se tjedan poroda uzima u obzir zajedno s porođajnom težinom djeteta. Ovim je pristupom identificirano ukupno 35 gena kandidata. Zhang i sur. otkrili su *EBF1* gen, koji povećava rizik od ISPP-a i gen *EEFSEC*, koji ima protektivnu ulogu, te 3 nova gena (*ADCY5*, *AGTR2* i *WNT4*) povezana s gestacijskom dobi [79]. Huusko i sur. identificirali su gen *HSPA1L* kao značajno povezan s ponovljenim ISPP-om te su također pronašli varijante u genu *DNAJB8*; oba gena kodiraju članove obitelji proteina toplinskog šoka [85, 163]. Gupta i sur. objavili su GWAS istraživanje na ispitanicama klasificiranim prema različitim fenotipovima trudnoće te su identificirali 2 gena, *ASTN1* i *MAST1* [82]. Metaanalizom GWAS istraživanja Sole-Navais i sur. identificirali su 4 nova gena (*KCNAB1*, *HAND2*, *HLA-DQA1* i *LRP5*) povezana s ISPP-om te 15 lokusa povezanih s gestacijskom dobi. Posljednjom metaanalizom Pasanen i sur. identificirana su 2 nova lokusa povezana s ISPP-om, uključujući gene *GC* (*VDR*) i *LINC02824*, te 5 novoopisanih lokusa (*COBL*, *GNAQ*, *KCNN2*, *RHAG*, *ZBTB38* i *WNT3A*) povezanih s gestacijskom dobi.

5.2.1. Rijetke predviđeno patogene varijante

Sekvenciranje cjelokupnog egzoma s ciljem provođenja analize RPP varijanti proveden je u panelu gena kandidata. Kumulativni učinak RPP varijanti procijenjen je analizom opterećenja s ciljem boljeg razumijevanja dosad povezanih gena iz identificiranog panela s ISPP-om. Ideja je bila ispitati jesu li ti geni/panel bogatiji RPP varijantama, s pretpostavkom da bi se mogla istaknuti skupina obiteljskog ISPP-a kao ona koja je opterećenija navedenim varijantama. Rezultati su pokazali da niti jedna ispitivana kohorta (kombinirana kohorta s ISPP-om, kohorta s obiteljskim i sporadičnim ISPP-om) nije bila značajno opterećenija RPP varijantama u odnosu na kontrolnu skupinu ($P > 0.05$) (Tablica 15). Nedostatak statističke značajnosti može se djelomično objasniti metodološkim ograničenjima, osobito malom veličinom uzorka u pojedinim kohortama, uključujući kontrolnu skupinu. Budući da se radi o rijetkim varijantama, iznimno je teško postići statističku značajnost. S ciljem povećanja snage analize opterećenja, buduća istraživanja trebala bi obuhvatiti veći broj ispitanica u svim skupinama te provesti analize segregacije na većem broju članova obitelji, čime bi se omogućilo dublje istraživanje nasljedne komponente.

Dodatno je istraženo jesu li RPP varijante u genima kandidatima iz panela prisutne u skupini ispitanica te jesu li određene varijante dijeljene među više ispitanica. Kako bismo to utvrdili, korišteni su kriteriji koji su uključivali prisutnost RPP varijante u najmanje jednoj ili više različitih ispitanica, uz istovremeno odsustvo iste varijante u kontrolnoj skupini. Takvim je pristupom utvrđena prisutnost RPP varijanti u šest gena iz panela: *COL27A1*, *COBL*, *KDR*, *EBF1*, *KCNAB1* i *TFAP4* (Slika 7), pri čemu je svaka od varijanti bila prisutna u po jednoj ispitanici.

U genu *TFAP4* (engl. *transcription factor ap-4*) iz istraživanja Sole-Navais i sur., detektirana je RPP varijanta u jednoj ispitanici s pozitivnom obiteljskom anamnezom ISPP-a (Tablica 13) [164]. Taj je gen u istom istraživanju također povezan s gestacijskom dobi, što upućuje na njegovu moguću ulogu u modulaciji trajanja trudnoće. Preostale RPP varijante, po jedna u svakoj ispitanici, detektirane su u skupini sa sporadičnim ISPP-om. Gen *COL27A1* (engl. *collagen type xxvii alpha 1 chain*) u prethodno navedenom istraživanju također je povezan s trajanjem gestacije, a prema literaturnim podacima dovodi se u vezu s usporenim embrionalnim rastom, abnormalnom morfologijom te poremećenom vaskularizacijom posteljice u *knock-out* mišjem modelu [178]. Gen *COBL* (engl. *cordon-bleu WH2 repeat protein*) proizašao je iz istraživanja Pasanen i sur. no funkcijom se u literaturi ne povezuje s ISPP-om [165]. Geni *KDR* (engl. *kinase insert domain receptor*) i *KCNAB1* (engl. *potassium voltage-gated channel subfamily a regulatory beta subunit 1*) utvrđeni su u istraživanju Sole-Navais i sur. [178]. Funkcijom se posebno ističe *KDR*, koji ima ključnu ulogu u angiogenezi, regulaciji remodeliranja spiralnih arterija i placentaciji, što je od presudne važnosti za pravilnu funkciju posteljice [78]. Varijante u genu *KCNAB1* su prethodno povezane s porođajnom težinom novorođenčadi, a moguće je da se njegova povezanost s trajanjem gestacije očituje

posredno, putem učinka na rast ploda i porođajnu težinu [179]. Na kraju, gen *EBF1* (engl. *early B-cell factor 1*), u kojem su do danas replicirane brojne česte varijante, također ima i RPP varijantu, što dodatno ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjem, kroz segregacijsku analizu radi utvrđivanja stvarne uloge ovog gena [79, 164].

Istraživanje RPP varijanti u panelu gena izrađenom na temelju prethodnih istraživanja pokazalo je ograničeno preklapanje među ispitanicama, pri čemu su RPP varijante detektirane u svega 17 % (6/36) analiziranih gena, što upućuje na to da mnogi prethodno identificirani kandidati nisu konzistentno povezani s pojavom ISPP-a, čime se dodatno naglašava heterogenost ovog fenotipa.

5.2.2. Česte varijante

Osim RPP varijanti specifično detektiranih u našoj populaciji unutar panela gena kandidata, ovim je istraživanjem ispitana i prisutnost dosad opisanih čestih varijanti (SNP-ova) povezanih s ISPP-om. Rezultati analize ukazuju na to da SNP rs2963463 u genu *EBF1* predstavlja jedini od 6 analiziranih SNP-ova koji pokazuje značajnu povezanost s fenotipom ISPP-a (Tablica 10). Gen *EBF1* utječe na ekspresijske puteve gena koji sudjeluju u imunološkoj toleranciji i apoptozi, procesima koji su ključni za održavanje trudnoće [180]. Poremećaji u tim putevima, potencijalno uzrokovani SNP-ovima *EBF1* gena, mogu narušiti procese potrebne za održavanje zdrave trudnoće, iako do danas ne postoje funkcionalna istraživanja koja precizno opisuju ulogu ovog polimorfizma. U ovom istraživanju, protektivni učinak SNP-a *EBF1* (rs2963463) gena u obiteljskom i sporadičnom ISPP-u potvrđen učestalošću alela i genotipova te primjenom kodominantnog i recesivnog genetičkog modela, čak i nakon stroge Bonferronijeve korekcije ($P_{adj} < 0.05$). Analiza je pokazala da homozigotni CC genotip *minor* alela djeluje kao protektivni faktor, smanjujući rizik od ISPP-a za 3-4 puta ($P_{adj} < 0.05$) u usporedbi s TT+TC genotipovima, pri čemu je ovaj učinak bio prisutan u obiteljskim i sporadičnim slučajevima ISPP-a. Također, *major* T alel rs2963463 povezan je s povećanim rizikom za ISPP u obiteljskim i sporadičnim slučajevima ($P_{adj} < 0.05$), dodatno ga pozicionirajući kao značajan čimbenik rizika. Ovi rezultati genetičke povezanosti su u skladu s najvećim GWAS istraživanjem do sada, koje je identificiralo *EBF1* kao značajno povezan s duljinom gestacije i PP-om [181] te metaanalizama GWAS istraživanja autora Pasanen i sur. [165] te Sole-Navais i sur. [164]. Nedavna istraživanja u kojima su Zhou i sur. pratili razine mRNA *EBF1* tijekom trudnoće otkrila su da je niža ekspresija mRNA značajno povezana s povećanim rizikom od ISPP-a. Žene u najnižoj kvartili ekspresije *EBF1* mRNA tijekom drugog i trećeg tromjesečja imale su 2.86 do 4.43 puta veći rizik od ISPP-a u usporedbi s onima s višim razinama mRNA. Ovo ukazuje na mogućnost da polimorfne varijante gena *EBF1* utječu na ekspresiju mRNA, čime povećavaju rizik od ISPP-a [182, 183]. Međutim, u istraživanju Zhou i sur. korištena je proba "*1879_at for EBF1*", koja nije izravno povezana s SNP-om

analiziranim u navedenom istraživanju, zbog čega rezultati nisu potpuno korelirani. S druge strane, za SNP-a *EBF1* (rs2946169) nije pronađena statistički značajna povezanost. Iako je utvrđena česta varijanta u genu *EBF1*, njezin značaj teško je komentirati zbog ograničenja interpretacije čestih varijanti u genetičkim istraživanjima. Naime, obzirom na veliki broj GWAS lokusa koji su do danas opisani, zajednička karakteristika svih čestih varijanti je da imaju mali učinak na populaciju. Također, evolucijske teorije pretpostavljaju da varijante u genima koji utječu na razvoj bolesti ili stanja trebaju biti rijetki u populaciji, te da su najčešće upravo ti rijetki aleli odgovorni za nastanak bolesti.

Ostali ispitivani geni nisu pokazali statistički značajnu povezanost s ISPP-om, iako su prethodna istraživanja ukazivala na njihov potencijalni značaj. Prethodno opisan gen *TNF-α*, ključan za imunološke i upalne odgovore, povezan je s povećanim razinama *TNF-α* u serumu kod žena sa ISPP-om. Minor A alel SNP-a rs1800629 povećava ekspresiju *TNF-α*, što može izazvati upalne procese u maternici i posteljici [184]. U našem istraživanju, SNP rs1800629 pokazao je povećani rizik u skupini obiteljskog ISPP-a, pri čemu su *minor* alel i genotip bili značajno češći u žena s obiteljskim ISPP-om u usporedbi s kontrolama i sporadičnim ISPP-om ($P \leq 0.05$). Međutim, nakon korekcije, rezultati gube značajnost. Razlike u značajnosti između skupina ISPP-a ukazuju na nekonzistentne povezanosti, što otežava njihovu interpretaciju. Slično tome, gen *ASTN1*, ključan za glijalno vođenu migraciju neurona tijekom razvoja mozga [185], pokazao je značajnu povezanost SNP-a rs146756455 sa sporadičnim ISPP-om prema recesivnom modelu ($P \leq 0.05$), no ta povezanost također je izgubila statističku značajnost primjenom korekcije. Ispitivanjem SNP-ova rs201450565 i rs188343966 u genima *EEFSEC* i *MAST1*, nije uočena značajna povezanost s ISPP-om, vjerojatno zbog većine ispitanica koje su imale homozigotni genotip *major* alela. MAF za varijante u genima *EEFSEC* je 0.02, a za *MAST1* 0.03, što objašnjava ograničenu varijaciju među skupinama.

5.3. Prednosti i nedostaci istraživanja

Ključna prednost ovog istraživanja jest što po prvi put pruža sveobuhvatan pregled dosadašnjih spoznaja o genetičkoj predispoziciji za ISPP, s posebnim naglaskom na analizu RPP varijanti unutar cjelokupnog egzoma ispitanica. Ovakav pristup omogućio je identifikaciju novih gena kandidata povezanih s ovim stanjem, čime se proširuje postojeće znanje o genetičkoj osnovi ISPP-a. Dodatna vrijednost istraživanja leži u uključivanju podskupina unutar ISPP populacije, osobito obiteljskih slučajeva, što je omogućilo analizu razlika u opterećenju, broju i preklapanju RPP varijanti između podskupina. Utvrđeno je da skupina s pozitivnom obiteljskom anamnezom nosi veći broj RPP varijanti u odnosu na sporadične slučajeve, što ukazuje na potencijalni smjer budućih istraživanja usmjerenih na razumijevanje različitih mehanizama nastanka ISPP-a. U usporedbi s prethodnim istraživanjima, važna metodološka

prednost ovog rada leži u činjenici da su sve varijante prisutne u kontrolnoj skupini isključene već u početnoj fazi analize, čime je značajno povećana specifičnost rezultata [85].

Jedan od nedostataka ovog istraživanja jest ograničen broj članova iz iste pogođene obitelji u skupini obiteljskog ISPP-a. Uključivanje većeg broja članova iz iste obitelji, kako onih pogođenih ISPP-om, ali i zdravih pojedinaca, moglo bi doprinijeti boljem razumijevanju načina na koji identificirane RPP varijante naslijeđene unutar obitelji utječu na razvoj ISPP-a. S obzirom na frekvenciju rijetkih varijanti u populaciji, veći broj ispitanica, ali i kontrola, bio bi koristan za jačanje statističke snage budućih istraživanja, osobito u segmentu provođenja analize opterećenja panela gena RPP varijantama. Jedan od nedostataka predstavlja i izostanak funkcionalnih analiza identificiranih varijanti, koje bi pomogle u potvrđivanju njihove uloge u patogenezi ISPP-a.

Na temelju navedenog, kao jedan od potencijalnih smjerova za buduća istraživanja ističe se dublje istraživanje genetičkih mehanizama koji stoje u osnovi ISPP-a, s posebnim fokusom na žene s ranijim početkom prijevremenog poroda uz pozitivnu obiteljsku anamnezu ISPP-a, s obzirom na to da se smatra kako su u takvim slučajevima genetički faktori u većoj mjeri izraženi.

6. ZAKLJUČCI

Ovim je istraživanjem potvrđena polazišna hipoteza istraživanja, da je genetička predispozicija za ISPP određena varijabilnošću genoma žene. Pronađene RPP varijante statistički su značajno češće u ispitanica s obiteljskim ISPP-om u usporedbi sa sporadičnim slučajevima, što ukazuje na važnost nasljednih čimbenika u etiologiji ovog stanja. Dodatno, identificirane RPP varijante dovele su do otkrića novih gena kandidata, kao i signalnih puteva koji dosad nisu bili povezivani s patogeneзом ISPP-a. Među novoidentificiranim genima, posebno se istaknuo gen *PRUNE2* čije su varijante utvrđene u više članova iz dvaju obitelji s ISPP-om.

Panel gena kandidata, definiran provedenim sustavnim pregledom i metaanalizom, nije pokazao značajno opterećenje RPP varijantama, dok je samo jedna česta varijanta u genu *EBF1* bila statistički značajno povezana s ISPP-om u ispitivanoj populaciji.

Zaključno, ovo istraživanje pruža značajne nove uvide u genetičke čimbenike povezane s ISPP-om, potvrđujući složenost ovog stanja i ukazujući na mogući poligenski utjecaj, pri čemu više gena i varijanti zajednički doprinose njegovom razvoju.

7. LITERATURA

- [1] Ohuma E, Moller A-B, Bradley E. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth in 2020, with trends from 2010: a systematic analysis (in press). *Lancet* [Internet]. 2023 Feb [cited 2025 Apr 15]. Available from: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(23\)00878-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(23)00878-4/fulltext)
- [2] Ohuma EO, Moller A-B, Bradley E, Chakwera S, Hussain-Alkhateeb L, Lewin A, et al. National, regional, and global estimates of preterm birth in 2020, with trends from 2010: a systematic analysis. *The Lancet* 2023;402:1261–71.
- [3] Perin J, Mulick A, Yeung D i sur. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–19: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet Child Adolesc Health* 2022;6:106–15.
- [4] Bhattacharjee E, Maitra A. Spontaneous preterm birth: the underpinnings in the maternal and fetal genomes. *NPJ Genom Med* 2021;6:1:43.
- [5] Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008;371:75.
- [6] Rodin U, Cerovečki I, Barišić I, Jezdić D. Childbirths in healthcare institutions in Croatia in 2022; Croatian health statistics yearbook 2022 [Internet]. 2022 Feb [cited 2025 Apr 15]. Available from: <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2023/11/Bilten-porodi-2022.-g..pdf>
- [7] Filipović-Grčić B, Rodin U. Variations in very preterm birth rates in 30 high-income countries: are valid international comparisons possible using routine data? *BJOG* 2017;124:1623–4.
- [8] Mensah NA, Fassett MJ, Shi JM i sur. Examining recent trends in spontaneous and iatrogenic preterm birth across race and ethnicity in a large managed care population. *Am J Obstet Gynecol* 2023;228:736.e1-736.e15.
- [9] Quinn J-A, Munoz FM, Gonik B i sur. Preterm birth: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunisation safety data. *Vaccine* 2016;34:6047–56.
- [10] Norwitz ER, Robinson JN, Challis JR. The control of labor. *N Engl J Med*. 1999;341(9):660-6.
- [11] Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev*. 2000;21(5):514-50.
- [12] Elvedi-Gašparović V. Prijevremeni porod. U: Đelmiš Josip, Orešković Slavko, editors. *Fetalna medicina i opstetricija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2014; str. 358-364.
- [13] Villar J, Papageorgiou AT, Knight HE i sur. The preterm birth syndrome: A prototype phenotypic classification. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:119–23.
- [14] Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: One syndrome, many causes. *Science* 2014;345:760–5.
- [15] Agrawal V, Hirsch E. Intrauterine infection and preterm labor. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012;17:12–9.

- [16] Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine Infection and Preterm Delivery. *New England Journal of Medicine* 2000;342:1500–7.
- [17] Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP i sur. The preterm parturition syndrome. *BJOG* 2006;113:17–42.
- [18] Han CS, Schatz F, Lockwood CJ. Abruptio-associated prematurity. *Clin Perinatol* 2011;38:407–21.
- [19] Gravett MG, Rubens CE, Nunes TM. Global report on preterm birth and stillbirth (2 of 7): discovery science. *BMC Pregnancy Childbirth* 2010;10:S2.
- [20] Vink J, Feltovich H. Cervical etiology of spontaneous preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med* 2016;21:106–12.
- [21] Mesiano S. The Endocrinology of Parturition. U: Smith R, ur. *Basic Science and Clinical Application*. Basel, Karger 2001; str 27-57.
- [22] Menon R. Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: Etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008;87:590–600.
- [23] Waldenström U, Aasheim V, Nilsen ABV, Rasmussen S, Pettersson HJ, Shytt E. Adverse Pregnancy Outcomes Related to Advanced Maternal Age Compared With Smoking and Being Overweight. *Obstetrics & Gynecology* 2014;123:104–12.
- [24] Smith GCS, Pell JP. Teenage pregnancy and risk of adverse perinatal outcomes associated with first and second births: population based retrospective cohort study. *BMJ* 2001;323:476–476.
- [25] Wong SPW, Twynstra J, Gilliland JA, Cook JL, Seabrook JA. Risk Factors and Birth Outcomes Associated with Teenage Pregnancy: A Canadian Sample. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2020;33:153–9.
- [26] Behrman RE, Butler AS. Causes of Preterm Birth U: Behrman RE, Butler AS, ur. *Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention*. Washington (DC): National Academies Press; 2007; str. 87-255
- [27] Smith GCS. Interpregnancy interval and risk of preterm birth and neonatal death: retrospective cohort study. *BMJ* 2003;327:313–0.
- [28] Fiscella K. Race, Perinatal Outcome, and Amniotic Infection. *Obstet Gynecol Surv* 1996;51:60–6.
- [29] Goldenberg RL, Cliver SP, Mulvihill FX i sur. Medical, psychosocial, and behavioral risk factors do not explain the increased risk for low birth weight among black women. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:1317–24.
- [30] Staneva A, Bogossian F, Pritchard M, Wittkowski A. The effects of maternal depression, anxiety, and perceived stress during pregnancy on preterm birth: A systematic review. *Women and Birth* 2015;28:179–93.

- [31] Soneji S, Beltrán-Sánchez H. Association of Maternal Cigarette Smoking and Smoking Cessation With Preterm Birth. *JAMA Netw Open* 2019;2:e192514.
- [32] Rang NN, Hien TQ, Chanh TQ, Thuyen TK. Preterm birth and secondhand smoking during pregnancy: A case–control study from Vietnam. *PLoS One* 2020;15:e0240289.
- [33] Ashford KB, Blair LM, McCubbin AK, Wiggins AT, Rayens MK, Hahn EJ. Municipal smoke-free laws and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2022;227:767.e1-767.e10.
- [34] Qiu J, He X, Cui H i sur. Passive Smoking and Preterm Birth in Urban China. *Am J Epidemiol* 2014;180:94–102.
- [35] Hamadneh S, Hamadneh J. Active and Passive Maternal Smoking During Pregnancy and Birth Outcomes: A Study From a Developing Country. *Ann Glob Health* 2021;87.
- [36] Dale MTG, Bakketeig LS, Magnus P. Alcohol consumption among first-time mothers and the risk of preterm birth: a cohort study. *Ann Epidemiol* 2016;26:275–82.
- [37] Weile LKK, Hegaard HK, Wu C i sur. Alcohol Intake in Early Pregnancy and Spontaneous Preterm Birth: A Cohort Study. *Alcohol Clin Exp Res* 2020;44:511–21.
- [38] Reynolds CME, Egan B, O'Malley EG, McMahon L, Sheehan SR, Turner MJ. Fetal growth and maternal alcohol consumption during early pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2019;236:148–53.
- [39] Nørgaard M, Nielsson MS, Heide-Jørgensen U. Birth and Neonatal Outcomes following Opioid Use in Pregnancy: A Danish Population-Based Study. *Subst Abuse* 2015;9s2.
- [40] Gouin K, Murphy K, Shah PS. Effects of cocaine use during pregnancy on low birthweight and preterm birth: systematic review and metaanalyses. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:340.e1-340.e12.
- [41] Sharifzadeh F, Kashanian M, Jouhari S, Sheikhansari N. Relationship between pre-pregnancy maternal BMI with spontaneous preterm delivery and birth weight. *J Obstet Gynaecol (Lahore)* 2015;35:354–7.
- [42] Hendler I, mc elenberg RL, Mercer BM i sur. The Preterm Prediction study: Association between maternal body mass index and spontaneous and indicated preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:882–6.
- [43] Phillips C, Velji Z, Hanly C, Metcalfe A. Risk of recurrent spontaneous preterm birth: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2017;7:e015402.
- [44] Wadon M, Modi N, Wong HS, Thapar A, O'Donovan MC. Recent advances in the genetics of preterm birth. *Ann Hum Genet* 2020;84:205–13.
- [45] Wilcox AJ, Skjaerven R, Lie RT. Familial Patterns of Preterm Delivery: Maternal and Fetal Contributions. *Am J Epidemiol* 2008;167:474–9.
- [46] Svensson AC, Sandin S, Cnattingius S i sur. Maternal Effects for Preterm Birth: A Genetic Epidemiologic Study of 630,000 Families. *Am J Epidemiol* 2009;170:1365–72.

- [47] York TP, Eaves LJ, Lichtenstein P i sur. Fetal and maternal genes' influence on gestational age in a quantitative genetic analysis of 244,000 swedish births. *Am J Epidemiol* 2013;178:543–50.
- [48] Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 2009;10:241–51.
- [49] Mead EC, Wang CA, Phung J i sur. The Role of Genetics in Preterm Birth. *Reproductive Sciences* 2023;30:3410–27.
- [50] Strauss JF, Romero R, Gomez-Lopez N i sur. Spontaneous preterm birth: advances toward the discovery of genetic predisposition. *Am J Obstet Gynecol* 2018;218:294-314.e2.
- [51] Di Renzo GC, Tosto V, Giardina I. The biological basis and prevention of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2018;52:13–22.
- [52] Pandey M, Chauhan M, Awasthi S. Interplay of cytokines in preterm birth. *Indian Journal of Medical Research* 2017;146:316–27.
- [53] Awasthi S, Pandey M. Association of TLR4 and TNF- α Gene Polymorphisms and TLR4 mRNA Levels in Preterm Birth in a Northern Indian Population. *Indian Pediatr.* 2019;56(3):202-204.
- [54] Menon R, Velez DR, Thorsen P i sur. Ethnic differences in key candidate genes for spontaneous preterm birth: TNF- α and its receptors. *Hum Hered* 2006;62:107–18.
- [55] Bitner A, Kalinka J. IL-1 β , IL-6 promoter, TNF- α promoter and IL-1RA gene polymorphisms and the risk of preterm delivery due to preterm premature rupture of membranes in a population of Polish women. *Archives of Medical Science* 2010;6:552–7.
- [56] Belousova VS, Svitich OA, Timokhina E V., Strizhakov AN, Bogomazova IM. Polymorphism of the IL-1 β , TNF, IL-1RA and IL-4 Cytokine Genes Significantly Increases the Risk of Preterm Birth. *Biochemistry (Moscow)* 2019;84:1040–6.
- [57] Liang M, Wang X, Li J i sur. Association of combined maternal-fetal TNF-alpha gene G308A genotypes with preterm delivery: a gene-gene interaction study. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:396184.
- [58] Pandey M, Awasthi S, Baranwal S. IL-6: An endogenous activator of MMP-9 in preterm birth. *J Reprod Immunol* 2020;141.
- [59] Barlik M, Mrozikiewicz AE, Drews-Piasecka E, Kurzawinska G, Malewski Z, Drews K. The relevance of IL-1 β and IL-1RN gene polymorphisms in the etiology of preterm delivery in the population of Polish women. *Ginekol Pol* 2019;90:212–6.
- [60] Murtha AP, Nieves A, Hauser ER, Swamy GK, Yonish BA, Sinclair TR, et al. Association of maternal IL-1 receptor antagonist intron 2 gene polymorphism and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:1249–53.
- [61] Pandey M, Awasthi S, Singh U, Mahdi AA. Association of IL-10 Gene Polymorphism (–819C > T, –592C > A and –1082G > A) with Preterm Birth. *Indian J Pediatr* 2018;85:93–101.

- [62] Malmström E, Sennström M, Holmberg A i sur. The importance of fibroblasts in remodelling of the human uterine cervix during pregnancy and parturition. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine* 2007;13:333–41.
- [63] Barišić A, Dević Pavlić S, Ostojić S, Pereza N. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinases gene polymorphisms in disorders that influence fertility and pregnancy complications: A systematic review and meta-analysis. *Gene* 2018;647:48–60.
- [64] Anum EA, Hill LD, Pandya A, Strauss III JF. Connective Tissue and Related Disorders and Preterm Birth: Clues to Genes Contributing to Prematurity. *Placenta* 2009;30:207–15.
- [65] Vogel I, Hollegaard MV, Hougaard DM, Thorsen P, Grove J. Polymorphisms in the promoter region of relaxin-2 and preterm birth: involvement of relaxin in the etiology of preterm birth. *In Vivo*. 2009;23(6):1005-1009.
- [66] Rocha FG, Slavin TP, Li D, Tiirikainen MI, Bryant-Greenwood GD. Genetic associations of relaxin: Preterm birth and premature rupture of fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*, vol. 209, Mosby Inc.; 2013, p. 258.e1-258.e8.
- [67] Boron DG, Kurzawinska G, Szpera-Gozdziewicz A i sur. Genetic variants of progesterone receptor in etiology of preterm delivery. *Ginekol Pol* 2022;93:930–6.
- [68] Kadivnik M, Kralik K, Muller-Vranješ A, Vučemilović-Jurić V, Šijanović S, Wagner J. Progesterone receptor genetic variants in pregnant women and fetuses as possible predictors of spontaneous premature birth: A preliminary case–control study. *J Obstet Gynaecol Res*. 2022;48:1099–109.
- [69] Javorski N, Lima CAD, Silva LVC, Crovella S, de Azêvedo Silva J. Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms are associated to spontaneous preterm birth and maternal aspects. *Gene* 2018;642:58–63.
- [70] Gašparović Krpina M, Barišić A, Peterlin A, Tul N, Ostojić S, Peterlin B, et al. Vitamin D receptor polymorphisms in spontaneous preterm birth: A case-control study. *Croat Med J* 2020;61:338–45.
- [71] Manzon L, Altarescu G, Tevet A, Schimmel MS, Elstein D, Samueloff A, et al. Vitamin D receptor polymorphism FokI is associated with spontaneous idiopathic preterm birth in an Israeli population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014;177:84–8.
- [72] Rosenfeld T, Salem H, Altarescu G, Grisaru-Granovsky S, Tevet A, Birk R. Maternal–fetal vitamin D receptor polymorphisms significantly associated with preterm birth. *Arch Gynecol Obstet* 2017;296:215–22.
- [73] Nan Y, Li H. MTHFR genetic polymorphism increases the risk of preterm delivery. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Jun 1;8(6):7397-402.
- [74] Uvuz F, Kilic S, Yilmaz N, Tuncay G, Cakar E, Yuksel B, et al. Relationship between preterm labor and thrombophilic gene polymorphism: A prospective sequential cohort study. *Gynecol Obstet Invest* 2009;68:234–8.

- [75] Haataja R, Karjalainen MK, Luukkonen A i sur. Mapping a new spontaneous preterm birth susceptibility gene, IGF1R, using linkage, haplotype sharing, and association analysis. *PLoS Genet* 2011;7.
- [76] Velez DR, Fortunato SJ, Thorsen P, Lombardi SJ, Williams SM, Menon R. Preterm birth in Caucasians is associated with coagulation and inflammation pathway gene variants. *PLoS One* 2008;3(9):e3283
- [77] Hao K, Wang X, Niu T i sur. A candidate gene association study on preterm delivery: Application of high-throughput genotyping technology and advanced statistical methods. *Hum Mol Genet* 2004;13:683–91.
- [78] Andraweera PH, Dekker GA, Thompson SD, North RA, Mccowan LME, Roberts CT. The interaction between the maternal bmi and angiogenic gene polymorphisms associates with the risk of spontaneous preterm birth. *Mol Hum Reprod* 2012;18:459–65.
- [79] Zhang G, Srivastava A, Bacelis J, Juodakis J, Jacobsson B, Muglia LJ. Genetic studies of gestational duration and preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2018;52:33–47.
- [80] Bacelis J, Juodakis J, Sengpiel V i sur. Literature-informed analysis of a genome-wide association study of gestational age in Norwegian women and children suggests involvement of inflammatory pathways. *PLoS One* 2016;11.
- [81] Myking S, Boyd HA, Myhre R i sur. X-Chromosomal Maternal and Fetal SNPs and the Risk of Spontaneous Preterm Delivery in a Danish/Norwegian Genome-Wide Association Study. *PLoS One* 2013;8.
- [82] Gupta JK, Care A, Goodfellow L, Alfirevic Z, Müller-Myhsok B, Alfirevic A. Genome and transcriptome profiling of spontaneous preterm birth phenotypes. *Sci Rep* 2022;12.
- [83] Goswami C, Chattopadhyay A, Chuang EY. Rare variants: data types and analysis strategies. *Ann Transl Med* 2021;9:961–961.
- [84] McElroy JJ, Gutman CE, Shaffer CM i sur. Maternal coding variants in complement receptor 1 and spontaneous idiopathic preterm birth. *Hum Genet* 2013;132:935–42.
- [85] Huusko JM, Karjalainen MK, Graham BE i sur. Whole exome sequencing reveals HSPA1L as a genetic risk factor for spontaneous preterm birth. *PLoS Genet* 2018;14.
- [86] Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt P i sur. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021;372:n71.
- [87] Mladenović T, Zoričić D, Batičić L, Ostojić S, Perez N. Prijevod - Pravila PRISMA 2020.: ažurirane smjernice za izvještavanje u sustavnim pregledima. *Medicina Fluminensis* 2021;57:444–65.
- [88] Staines-Urias E, Paez MC, Doyle P i sur. Genetic association studies in pre-eclampsia: Systematic meta-analyses and field synopsis. *Int J Epidemiol* 2012;41:1764–75.

- [89] Dolan SM, Hollegaard MV, Merialdi M i sur. Synopsis of preterm birth genetic association studies: The preterm birth genetics knowledge base (PTBGene). *Public Health Genomics* 2010;13:514–23.
- [90] Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA, ur. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. 2nd Edition. Chichester: John Wiley & Sons, 2019.
- [91] McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010;20:1297–303.
- [92] Auwera G van der, O'Connor BD. *Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra*. Sebastopol, CA: O'Reilly Media; 2020.
- [93] McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GRS, Thormann A, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol* 2016;17:122.
- [94] Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G i sur. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020;581:434–43.
- [95] Sim N-L, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res* 2012;40:W452–7.
- [96] Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet* 2013;76.
- [97] Chen Y, Moustaki I, Zhang H. A Note on Likelihood Ratio Tests for Models with Latent Variables. *Psychometrika* 2020;85:996–1012.
- [98] Steinhaus R, Proft S, Schuelke M, Cooper DN, Schwarz JM, Seelow D. MutationTaster2021. *Nucleic Acids Res* 2021;49:W446–51.
- [99] Rentzsch P, Schubach M, Shendure J, Kircher M. CADD-Splice—improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome Med* 2021;13:31.
- [100] Tordai H, Torres O, Csepi M, Padányi R, Lukács GL, Hegedűs T. Analysis of AlphaMissense data in different protein groups and structural context. *Sci Data* 2024;11:495.
- [101] Chen S, Francioli LC, Goodrich JK i sur. A genome-wide mutational constraint map quantified from variation in 76,156 human genomes 2022.
- [102] Juvan P, Maver A, Majnik T. CMGgenomics: CMGgenomics Workflows at KIGM/CMG 2024.
- [103] R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* 2021.
- [104] Landrum MJ, Lee JM, Riley GR i sur. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D980–5.
- [105] Xie Z, Bailey A, Kuleshov MV i sur. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Curr Protoc* 2021;1.
- [106] Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD i sur. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* 2016;44:W90–7.

- [107] Chen EY, Tan CM, Kou Y i sur. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 2013;14:128.
- [108] Karjalainen MK, Huusko JM, Tuohimaa A, Luukkonen A, Haataja R, Hallman M. A study of collectin genes in spontaneous preterm birth reveals an association with a common surfactant protein D gene polymorphism. *Pediatr Res* 2012;71:93–9.
- [109] Annells MF, Hart PH, Mullighan CG, Heatley SL i sur. Interleukins-1, -4, -6, -10, tumor necrosis factor, transforming growth factor- β , FAS, and mannose-binding protein C gene polymorphisms in Australian women: Risk of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:2056–67.
- [110] Barišić A, Kolak M, Peterlin A i sur. DNMT3B rs1569686 and rs2424913 gene polymorphisms are associated with positive family history of preterm birth and smoking status. *Croat Med J* 2020;61:8–17.
- [111] Chang TY, Wang LK, Kuo YH, Chen CY, Pai TW, Chen CP. Interferon-stimulated gene 15 polymorphisms are associated with spontaneous preterm birth in Taiwanese women. *American Journal of Reproductive Immunology* 2023;90.
- [112] Chaves JHB, Babayan A, De Melo Bezerra C, Linhares IM, Witkin SS. Maternal and neonatal interleukin-1 receptor antagonist genotype and pregnancy outcome in a population with a high rate of pre-term birth. *American Journal of Reproductive Immunology* 2008;60:312–7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2008.00625.x>.
- [113] Chen D, Hu Y, Chen C i sur. Polymorphisms of the paraoxonase gene and risk of preterm delivery. *Epidemiology* 2004;15:466–70.
- [114] Christensen KE, Dahhou M, Kramer MS, Rozen R. The MTHFD1 1958G>A variant is associated with elevated C-reactive protein and body mass index in Canadian women from a premature birth cohort. *Mol Genet Metab* 2014;111:390–2.
- [115] Christiaens I, Ang QW, Gordon LN i sur. Two novel genetic variants in the mineralocorticoid receptor gene associated with spontaneous preterm birth. *BMC Med Genet* 2015;16.
- [116] Doh K, Sziller I, Vardhana S, Kovacs E, Papp Z, Witkin SS. β 2-adrenergic receptor gene polymorphisms and pregnancy outcome. *J Perinat Med* 2004;32:413–7.
- [117] Gebhardt S, Bruiners N, Hillermann R. A novel exonic variant (221delT) in the LGALS13 gene encoding placental protein 13 (PP13) is associated with preterm labour in a low risk population. *J Reprod Immunol* 2009;82:166–73.
- [118] Grisaru-Granovsky S, Tevet A, Bar-Shavit R i sur. Association study of protease activated receptor 1 gene polymorphisms and adverse pregnancy outcomes: Results of a pilot study in Israel. *Am J Med Genet A* 2007;143:2557–63.
- [119] Hirano E, Sugita N, Kikuchi A i sur. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Polymorphism and Periodontitis in Pregnant Japanese Women. *J Periodontol* 2010;81:897–906.

- [120] Hollegaard MV, Grove J, Thorsen P i sur. Polymorphisms in the tumor necrosis factor alpha and interleukin 1-beta promoters with possible gene regulatory functions increase the risk of preterm birth. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008;87:1285–90.
- [121] Hwang IW, Kang YD, Kwon BN i sur. Genetic variations of MTHFR gene and their association with preterm birth in Korean women. *Medicina (Lithuania)* 2017;53:380–5.
- [122] Ijabi J, Moradi-Sardareh H, Afrisham R, Seifi F, Ijabi R. SKA2 gene – A novel biomarker for latent anxiety and preterm birth prediction. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 2019;237:106–12.
- [123] Iwanaga R, Sugita N, Hirano E i sur. FcyRIIB polymorphisms, periodontitis and preterm birth in Japanese pregnant women. *J Periodontal Res* 2011;46:292–302..
- [124] Jones NM, Holzman C, Tian Y i sur. Innate immune system gene polymorphisms in maternal and child genotype and risk of preterm delivery. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2012;25:240–7.
- [125] Karjalainen MK, Ojaniemi M, Haapalainen AM i sur. CXCR3 Polymorphism and Expression Associate with Spontaneous Preterm Birth. *The Journal of Immunology* 2015;195:2187–98.
- [126] Kwon HS, Sohn IS, Lee JY, Lee SJ, Kim SN, Kim BJ. Intercellular adhesion molecule-1 K469E polymorphism in Korean patients with spontaneous preterm delivery. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2009;104:37–9.
- [127] Kwon BN, Lee NR, Kim HJ i sur. Folate metabolizing gene polymorphisms and genetic vulnerability to preterm birth in Korean women. *Genes Genomics* 2021;43:937–45.
- [128] Langmia IM, Apalasamy YD, Omar SZ, Mohamed Z. Association of VEGFA gene polymorphisms and VEGFA plasma levels with spontaneous preterm birth. *Pharmacogenet Genomics* 2015;25:199–204.
- [129] Langmia IM, Apalasamy YD, Omar SZ, Mohamed Z. Interleukin 1 receptor type 2 gene polymorphism is associated with reduced risk of preterm birth. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2016;29:3347–50.
- [130] Lathouras K, Saso S, Tzafetas M i sur. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases 1-3 and their inhibitor are not associated with premature labor. *Future Sci OA* 2018;4.
- [131] Lee NR, Hwang IW, Kim HJ, Kang YD, Park JW, Jin HJ. Genetic association of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene I/D polymorphism with preterm birth in Korean women: Case-control study and meta-analysis. *Medicina (Lithuania)* 2019;55.
- [132] Lyubomirskaya E, Kamyshnyi A, Krut Y i sur. SNPs and transcriptional activity of genes of innate and adaptive immunity at the maternal-fetal interface in woman with preterm labour, associated with preterm premature rupture of membranes. *Wiadomosci Lekarskie* 2020;73:25–30.

- [133] Manuck TA, Major HD, Varner MW, Chettier R, Nelson L, Esplin MS. Progesterone receptor genotype, family history, and spontaneous preterm birth. *Obstet Gynecol.* 2010;115(4):765-770.
- [134] Menon R, Velez DR, Simhan H i sur. Multilocus interactions at maternal tumor necrosis factor- α , tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-6 receptor genes predict spontaneous preterm labor in European-American women. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:1616–24.
- [135] Moore S, Ide M, Randhawa M, Walker JJ, Reid JG, Simpson NAB. An investigation into the association among preterm birth, cytokine gene polymorphisms and periodontal disease. *BJOG* 2004;111:125–32.
- [136] Moura E, Mattar R, de Souza E, Torloni MR, Gonçalves-Primo A, Daher S. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and spontaneous preterm birth. *J Reprod Immunol* 2009;80:115–21.
- [137] Mustafa MD, Pathak R, Ahmed T i sur. Association of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress markers in preterm labor. *Clin Biochem* 2010;43:1124–8.
- [138] Mustafa MD, Sharma T, Banerjee BD i sur. Genetic polymorphisms in Cytochrome P 4501B1 and susceptibility to idiopathic preterm labor in North Indian population. *Clin Biochem* 2013;46:1812–5.
- [139] Myking S, Myhre R, Gjessing HK i sur. Candidate gene analysis of spontaneous preterm delivery: New insights from re-analysis of a case-control study using case-parent triads and control-mother dyads. *BMC Med Genet* 2011;12.
- [140] Pereza N, Pleša I, Peterlin A i sur. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinases 1 and 9 genes in women with spontaneous preterm birth. *Dis Markers.* 2014;2014:171036.
- [141] Peterlin A, Maver A, Jan Z, Lovrecic L, Tul N, Peterlin B. Polymorphism of the ADRB2 rs1042713 gene is not associated with spontaneous preterm birth: Analyses in a Slovenian sample and meta analysis. *Balkan Journal of Medical Genetics* 2017;20:35–42.
- [142] Preda A, Caracostea G, Ona D, Zaharie G, Stamatian F. Association between maternal/newborn genetic variants, placental pathology and spontaneous preterm birth risk: a Romanian population-based study. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2020;33(7):1171-1177.
- [143] Ramos BR de A, Mendes ND, Tanikawa AA i sur. Ancestry informative markers and selected single nucleotide polymorphisms in immunoregulatory genes on preterm labor and preterm premature rupture of membranes: A case control study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2016;16.
- [144] Roberts AK, Monzon-Bordonaba F, Van Deerlin PG i sur. Association of polymorphism within the promoter of the tumor necrosis factor α gene with increased risk of preterm premature rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180(5):1297-1302.

- [145] Romero R, Velez Edwards DR, Kusanovic JP i sur. Identification of fetal and maternal single nucleotide polymorphisms in candidate genes that predispose to spontaneous preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:431.e1-431.e34.
- [146] Ryckman KK, Morken NH, White MJ i sur. Maternal and fetal genetic associations of PTGER3 and PON1 with preterm birth. *PLoS One* 2010;5.
- [147] Salem H, Yatchenko Y, Anosov M i sur. Maternal and neonatal irisin precursor gene FNDC5 polymorphism is associated with preterm birth. *Gene* 2018;649:58–62.
- [148] Salem H, Rosenfeld T, Altarescu G, Grisaru-Granovsky S, Birk R. Maternal and neonatal leptin and leptin receptor polymorphisms associated with preterm birth. *Gene* 2016;592:209–13.
- [149] Salminen A, Paananen R, Karjalainen MK i sur. Genetic association of SP-C with duration of preterm premature rupture of fetal membranes and expression in gestational tissues. *Ann Med* 2009;41:629–42.
- [150] Simhan HN, Krohn MA, Roberts JM, Zeevi A, Caritis SN. Interleukin-6 promoter - 174 polymorphism and spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:915–8.
- [151] Sugita N, Kobayashi T, Kikuchi A i sur. Immunoregulatory gene polymorphisms in Japanese women with preterm births and periodontitis. *J Reprod Immunol* 2012;93:94–101.
- [152] Thota C, Menon R, Wentz MJ i sur. A single-nucleotide polymorphism in the fetal catechol-o-methyltransferase gene is associated with spontaneous preterm birth in African Americans. *Reproductive Sciences* 2012;19:135–42.
- [153] Velez DR, Fortunato SJ, Williams SM, Menon R. Interleukin-6 (IL-6) and receptor (IL6-R) gene haplotypes associate with amniotic fluid protein concentrations in preterm birth. *Hum Mol Genet* 2008;17:1619–30.
- [154] Velez DR, Menon R, Thorsen P i sur. Ethnic differences in interleukin 6 (IL-6) and IL6 receptor genes in spontaneous preterm birth and effects on amniotic fluid protein levels. *Ann Hum Genet* 2007;71:586–600.
- [155] Velez DR, Fortunato S, Thorsen P, Lombardi SJ, Williams SM, Menon R. Spontaneous preterm birth in African Americans is associated with infection and inflammatory response gene variants. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:209.e1-209.e27.
- [156] Wang LK, Huang MC, Liu CC, Chen CP. Second-trimester plasma mannose-binding lectin levels and risk of preterm birth. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2017;30:678–83.
- [157] Karjalainen MK, Huusko JM, Ulvila J i sur. A Potential Novel Spontaneous Preterm Birth Gene, AR, Identified by Linkage and Association Analysis of X Chromosomal Markers. *PLoS One* 2012;7.
- [158] Bhattacharjee E, Thiruvengadam R, Ayushi i sur. Genetic variants associated with spontaneous preterm birth in women from India: a prospective cohort study. *The Lancet Regional Health - Southeast Asia* 2023;14.

- [159] Juvinao-Quintero DL, Sanchez SE, Workalemahu T i sur. Genetic association study of preterm birth and gestational age in a population-based case-control study in Peru. *J Neonatal Perinatal Med* 2024;1–16.
- [160] Hasegawa K, Kumasaka N, Nakabayashi K i sur. Genome-wide association study of preterm birth and gestational age in a Japanese population. *Hum Genome Var* 2023;10.
- [161] Hur YM, Yoo JY, You YA i sur. A genome-wide and candidate gene association study of preterm birth in Korean pregnant women. *PLoS One* 2023;18:e0294948.
- [162] Zhang H, Baldwin DA, Bukowski RK i sur. A Genome-Wide Association Study of Early Spontaneous Preterm Delivery. *Genet Epidemiol* 2015;39:217–26
- [163] Huusko JM, Tiensuu H, Haapalainen AM i sur. Integrative genetic, genomic and transcriptomic analysis of heat shock protein and nuclear hormone receptor gene associations with spontaneous preterm birth. *Sci Rep* 2021;11.
- [164] Solé-Navais P, Flatley C, Steinthorsdottir V i sur. Genetic effects on the timing of parturition and links to fetal birth weight. *Nat Genet* 2023;55:559–67.
- [165] Pasanen A, Karjalainen MK, Zhang G i sur. Meta-analysis of genome-wide association studies of gestational duration and spontaneous preterm birth identifies new maternal risk loci. *PLoS Genet* 2023;19:e1010982.
- [166] Lee S, Abecasis GR, Boehnke M, Lin X. Rare-variant association analysis: Study designs and statistical tests. *Am J Hum Genet* 2014;95:5–23.
- [167] Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nat Rev Genet* 2012;13:135–45.
- [168] Li T, Huang S, Yan W, Zhang Y, Guo Q. PRUNE2 inhibits progression of colorectal cancer in vitro and in vivo. *Exp Ther Med* 2021;23:169.
- [169] Medina-Bastidas D, Guzmán-Huerta M, Borboa-Olivares H i sur. Placental Microarray Profiling Reveals Common mRNA and lncRNA Expression Patterns in Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction. *Int J Mol Sci* 2020;21:3597.
- [170] Hubert L, Sutton VR. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism*, Elsevier; 2017, p. 283–99.
- [171] Safran M, Rosen N, Twik M i sur. The GeneCards Suite. *Practical Guide to Life Science Databases*, Singapore: Springer Nature Singapore; 2021, p. 27–56.
- [172] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I i sur. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinformatics* 2016;54.
- [173] Cifkova E, Karahoda R, Stranik J i sur. Metabolomic analysis of the human placenta reveals perturbations in amino acids, purine metabolites, and small organic acids in spontaneous preterm birth. *EXCLI J* 2024;23:264–82.
- [174] Morillon A-C, Yakkundi S, Thomas G i sur. Association between phospholipid metabolism in plasma and spontaneous preterm birth: a discovery lipidomic analysis in the cork pregnancy cohort. *Metabolomics* 2020;16:19.

- [175] Jiang S, Jiang J, Xu H i sur. Maternal dyslipidemia during pregnancy may increase the risk of preterm birth: A meta-analysis. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2017;56:9–15.
- [176] Baig S, Lim JY, Fernandis AZ i sur. Lipidomic analysis of human placental Syncytiotrophoblast microvesicles in adverse pregnancy outcomes. *Placenta* 2013;34:436–42.
- [177] Güvey H, Soyer Çalışkan C, Çelik S i sur. Relationship between serum cadherin 6 and 11 levels and severe and early-onset preeclampsia: A pilot study. *Journal of Turkish Society of Obstetric and Gynecology* 2022;19:104–10.
- [178] Verma RK, Soni UK, Chadchan SB i sur. miR-149-PARP-2 Signaling Regulates E-cadherin and N-cadherin Expression in the Murine Model of Endometrium Receptivity. *Reproductive Sciences* 2022;29:975–92.
- [179] Beaumont RN, Warrington NM, Cavadino A i sur. Genome-wide association study of offspring birth weight in 86 577 women identifies five novel loci and highlights maternal genetic effects that are independent of fetal genetics. *Hum Mol Genet* 2018;27:742–56.
- [180] Vilagos B, Hoffmann M, Souabni A i sur. Essential role of EBF1 in the generation and function of distinct mature B cell types. *Journal of Experimental Medicine* 2012;209:775–92.
- [181] Zhang G, Feenstra B, Bacelis J i sur. Genetic Associations with Gestational Duration and Spontaneous Preterm Birth. *New England Journal of Medicine* 2017;377:1156–67.
- [182] Zhou G, Holzman C, Heng YJ, Kibschull M, Lye SJ, Vazquez A. EBF1 Gene mRNA Levels in Maternal Blood and Spontaneous Preterm Birth. *Reproductive Sciences* 2020;27:316–24.
- [183] Zhou G, Holzman C, Chen B i sur. EBF1-Related Long Non-coding RNA Transcript Levels in 3rd Trimester Maternal Blood and Risk of Spontaneous Preterm Birth. *Reproductive Sciences* 2021;28:541–9.
- [184] El-Raheem TA, Mahmoud RH, Hefzy EM, Masoud M, Ismail R, Aboraia NMM. Tumor necrosis factor (TNF)- α - 308 G/A gene polymorphism (rs1800629) in Egyptian patients with alopecia areata and vitiligo, a laboratory and in silico analysis. *PLoS One* 2020;15
- [185] Gupta JK, Alfirevic A. Systematic review of preterm birth multi-omic biomarker studies. *Expert Rev Mol Med* 2022;24.

ILUSTRACIJE

Popis slika

Slika 1. Predloženi mehanizmi nastanka spontanog prijevremenog poroda

Slika 2. Dizajn istraživanja

Slika 3. Primjer prikaza alelne diskriminacije s usporedbom vrijednosti Alela 1 (VIC® boja) i Alela 2 (FAM™ boja)

Slika 4. Dijagram toka trećeg koraka istraživanja: sekvenciranje cjelokupnog egzoma

Slika 5. PRISMA dijagram toka odabira istraživanja uključenih u sustavni pregled i metaanalizu

Slika 6. Hodogram filtriranja rijetkih predviđeno patogenih varijanti iz panela gena kandidata

Slika 7. Broj rijetkih predviđeno patogenih varijanti po genu iz panela i skupini ispitanica

Slika 8. Hodogram filtriranja rijetkih predviđeno patogenih varijanti iz cjelokupnog egzoma

Slika 9. Usporedba razlika u broju rijetkih predviđeno patogenih varijanti po skupinama ispitanica

Slika 10. Udio gena s rijetkim predviđeno patogenim varijantama detektiranih u skupinama ispitanica s ISPP-om

Slika 11. Broj rijetkih predviđeno patogenih varijanti po novo identificiranom genu i skupini ispitanica

Popis tablica

Tablica 1. Prikaz analiziranih polimorfizama sa sljedovima nukleotida specifičnih TaqMan početnica

Tablica 2. Sadržaj Real-Time PCR reakcijske smjese

Tablica 3. Uvjeti Real-Time PCR reakcija

Tablica 4. Pregled istraživanja temeljenih na hipotezi uključenih u sustavni pregled

Tablica 5. Istraživanja iz sustavnog pregleda uključena u metaanalizu

Tablica 6. Metaanaliza polimorfizma gena *TNF- α* (rs1800629)

Tablica 7. Metaanaliza polimorfizma gena *IL-6* (rs1800795)

Tablica 8. Pregled istraživanja bez unaprijed definirane hipoteze uključenih u sustavni pregled

Tablica 9. Kliničke značajke ispitanica te njihovih novorođenčadi

Tablica 10. Usporedba učestalosti genotipova i alela polimorfizama gena *ASTN1*, *EBF1* i *TNF- α* između ispitanica i kontrola

Tablica 11. Analiza polimorfizma gena *EBF1* (rs2963463) u obiteljskom i sporadičnom ISPP-u te kontrolama

Tablica 12. Analiza genetičke povezanosti polimorfizama gena *ASTN1*, *EBF1* i *TNF- α* primjenom različitih genetičkih modela

Tablica 13. Varijanta koja uzrokuje gubitak funkcije gena detektirana u ispitanici s obiteljskim ISPP-om u panelu gena kandidata

Tablica 14. Varijante krivoga smisla detektirane u ispitanicama sa sporadičnim ISPP-om u panelu gena kandidata

Tablica 15. Rezultati analize opterećenja panela gena kandidata rijetkim predviđeno patogenim varijantama

Tablica 16. Varijante koje uzrokuju gubitak funkcije gena detektirane u skupini ispitanica s obiteljskim ISPP-om u cjelokupnom egzomu

Tablica 17. Varijante krivoga smisla detektirane u skupini ispitanica s obiteljskim ISPP-om u cjelokupnom egzomu

Tablica 18. Varijante koje uzrokuju gubitak funkcije gena detektirane u skupini ispitanica sa sporadičnim ISPP-om u cjelokupnom egzomu

Tablica 19. Varijante krivoga smisla detektirane u skupini ispitanica s sporadičnim ISPP-om u cjelokupnom egzomu

Tablica 20. Statistički značajni signalni putevi novoidentificiranih gena

POPIS POKRATA

AF (od engl. *allele frequency*) – učestalost alela

ASTN1 (od engl. *astrotactin 1*) – astrotaktin 1

CAP (od engl. *contraction-associated proteins*) – proteini povezani s kontrakcijama

CELSR2 (od engl. *cadherin egf lag seven pass g-type receptor 2*) – kadherin egf lag sedmeroprolazni g-tip receptor 2

CL (od engl. *confidence interval*) – interval pouzdanosti

COBL (od engl. *cordon-bleu WH2 repeat protein*) – kordon-bleu WH2 ponavljajući protein

COL27A1 (od engl. *collagen type xxvii alpha 1 chain*) – kolagen tipa xxvii alfa 1 lanac

COX-2 (od engl. *cyclooxygenase-2*) – ciklooksigenaza 2

CRH (od engl. *corticotropin-releasing hormone*) – hormon koji oslobađa kortikotropin

DPYSL2 (od engl. *dihydropyrimidinase-like 2*) – dihidropirimidinasama sličan protein 2

DPYSL3 (od engl. *dihydropyrimidinase-like 3*) – dihidropirimidinasama sličan protein 3

EBF1 (od engl. *early B-cell factor 1*) – čimbenik ranih B stanica 1

EEFSEC (od engl. *eukaryotic translation elongation factor sec*) – eukariotski elongacijski faktor translacije specifičan za selenocisteinsku tRNA

FDR (od engl. *false discovery rate*) – stopa lažnog otkrića

GWAS (od engl. *genome-wide association studies*) – cjelogenomska asocijacijska istraživanja

HPA (od engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal*) os – hipotalamusno-hipofizno-nadbubrežna os

HSPA1L (od engl. *heat shock protein family a member 1-like*) – protein toplinskog šoka iz obitelji a, član 1 – sličan

ISPP – idiopatski spontani prijevremeni porod

IGF1 (od engl. *insulin-like growth factor 1*) – inzulinu sličan faktor rasta 1

IL-1 β (od engl. *interleukin-1 beta*) – interleukin 1 beta

ITM – indeks tjelesne mase

KCNAB1 (od engl. *potassium voltage-gated channel subfamily a regulatory beta subunit 1*) – beta regulatorna podjedinica a podskupine kalijevih naponom upravljanih kanala

KDR (od engl. *kinase insert domain receptor*) – receptor s umetnutom domenom kinaze

LOF (od engl. *loss of function*) varijanta – varijanta koja uzrokuje gubitak funkcije gena

MAF – učestalost minor alela

MAST1 (od engl. *microtubule associated serine/threonine kinase 1*) – mikrotubulima pridružena serin/treonin kinaza 1

MIPP – medicinski indiciran prijevremeni porod

MMP (od engl. *matrix metalloproteinases*) – matriks metaloproteinaze

MTMR2 (od engl. *myotubularin related protein 2*) – miotubularinu srodan protein 2

NGS (od engl. *next generation sequencing*) – sekvenciranje nove generacije

NI – nema informacija

OR (od engl. *odds ratio*) – omjer izgleda

OXTR (od engl. *oxytocin receptor*) – oksitocinski receptor

PCDHB1 (od engl. *protocadherin beta 1*) – protokadherin beta 1

PGS1 (od engl. *phosphatidylglycerophosphate synthase 1*) – fosfatidilglicerofosfat sintetaza1

PP – prijevremeni porod

PPPO – prijevremeno prsnuće plodovih ovoja

PRUNE2 (od engl. *prune homolog 2 with BCH domain*) – prune homolog 2 s BCH domenom

RPP (od engl. *rare predicted pathogenic*) varijanta – rijetka predviđeno patogena varijanta

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

SPP – spontani prijevremeni porod

TFAP4 (od engl. *transcription factor ap-4*) – transkripcijski čimbenik ap-4

TIMP (od engl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*) – tkivni inhibitori metaloproteinaza

TLR (od engl. *toll-like receptors*) – toll-uslični receptori

TNF- α (od engl. *tumor necrosis factor alpha*) – tumorski faktor nekroze alfa

VEGF (od engl. *vascular endothelial growth factor*) – vaskularni endotelni faktor rasta

WES (od engl. *whole exome sequencing*) – sekvenciranje cjelokupnog egzoma

WHO (od engl. *World Health Organization*) – Svjetska zdravstvena organizacija

χ^2 – Pearsonov hi-kvadrat test

PRIVITCI

Privitak 1 - Anketni upitnik

Varijabilnost genoma žene kao predispozicija za spontani prijevremeni porod (upitnik za prijevremeni porod)

I. MAJKA

OSNOVNI PODACI:

1. Ime i prezime: _____
2. ID broj Biobanke: _____
3. Datum uzimanja podataka i biouzoraka: _____
4. OIB: _____
5. Datum i mjesto rođenja: _____
6. Adresa prebivališta: _____
7. Zanimanje: _____

*PODACI NEVEZANI ZA TRUDNOĆU:

1. Socioekonomski status: a. ugrožen b. dobar
2. Stručna sprema: a. NSS b. SSS c. VŠS d. VSS
3. Visina (cm): _____
4. Težina prije trudnoće (kg): _____
5. Kronične bolesti
a. NE b. DA: I) hipertenzija II) dijabetes m. tipa 1 III) ostalo: _____
6. Pušenje
a. NE b. DA: I) broj kutija dnevno: _____ II) razdoblje uzimanja: _____
7. Alergije
a. NE b. DA: I) vrsta: _____

OPĆA GINEKOLOŠKA ANAMNEZA:

1. Anomalije maternice
a. NE b. DA: I) vrsta: _____
2. Prethodna konizacija / LLETZ / drugi zahvati
a. NE b. DA: I) vrsta: _____
3. Ginekološke bolesti
a. NE b. DA: I) vrsta: _____
4. Ukupan broj:
a. dosadašnjih trudnoća: _____
b. poroda: _____
c. prijevremenih poroda: _____
d. spontanih pobačaja: _____
e. namjernih pobačaja: _____
I. medicinski indiciranih pobačaja (razlog): _____
f. živorođene djece: _____
g. mrtvorodne djece: _____
5. Podaci o trudnoćama vezani za istog partnera:
a. DA b. NE (napomena: _____)

ANAMNEZA TRUDNOĆA KOJE SU ZAVRŠILE PRIJEVREMENIM PORODOM:

	1. PRIJEVREMENI POROD	2. PRIJEVREMENI POROD	3. PRIJEVREMENI POROD
1) Način začeća	a. prirodno b. asistirano / vrsta:	a. prirodno b. asistirano / vrsta:	a. prirodno b. asistirano / vrsta:
2) Tjedan poroda			
3) Redni broj / interval od zadnje trudnoće			
4) Medicinska indikacija zaporod	a. NE b. DA / razlog:	a. NE b. DA / razlog:	a. NE b. DA / razlog:
5) Blizanačka trudnoća	a. NE b. DA	a. NE b. DA	a. NE b. DA
6) Mrtvorodstvo	a. NE b. DA	a. NE b. DA	a. NE b. DA
7) Početak prijevremenog poroda	a. RVP b. trudovi	a. RVP b. trudovi	a. RVP b. trudovi
8) Ginekološke kontrole	a. NE b. DA / broj:	a. NE b. DA / broj:	a. NE b. DA / broj:
9) Psihološki stres (npr. razvod, smrt...)	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:
10) Uzimanje nadomjestaka prije / tijekom trudnoće (npr. folna kiselina, željezo...)	a. NE b. DA / vrsta i razdoblje uzimanja:	a. NE b. DA / vrsta i razdoblje uzimanja:	a. NE b. DA / vrsta i razdoblje uzimanja:
11) 12. Korištenje lijekova (npr. tokolitici, antibiotici...)	a. NE b. DA / vrsta i razdoblje uzimanja:	a. NE b. DA / vrsta i razdoblje uzimanja:	a. NE b. DA / vrsta i razdoblje uzimanja:
12) Konzumacija alkohola	a. NE b. DA / dnevna količina i razdoblje uzimanja:	a. NE b. DA / dnevna količina i razdoblje uzimanja:	a. NE b. DA / dnevna količina i razdoblje uzimanja:
13) Pušenje	a. NE b. DA / dnevna količina i razdoblje uzimanja:	a. NE b. DA / dnevna količina i razdoblje uzimanja:	a. NE b. DA / dnevna količina i razdoblje uzimanja:
14) Komplikacije trudnoće (npr. hipertenzija, krvarenje...)	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:
15) Serklaža	a. NE b. DA	a. NE b. DA	a. NE b. DA
16) Infekcije porodnog kanala	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:

17) Prijevremeni porod u obitelji: a. NE b. DA

1. srodnik/ca: _____

2. broj prijevremenih poroda: _____

3. tjedan trudnoće prilikom poroda: _____

4. starosna dob pri porodu: _____

5. bolesti: _____

6. napomene: _____

I. DIJETE

OSNOVNI PODACI:

1. Ime i prezime: _____

2. ID broj majke: _____

3. Datum rođenja: _____ 4. Spol: M Ž

5. Porodna težina (g): _____

6. Porodna težina (cm): _____

7. Prirođene anomalije:

a. NE b. DA / vrsta: _____

8. Infekcije:

a. NE b. DA / vrsta: _____

ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: Tea Mladenić

Datum rođenja: 20.04.1997.

Adresa: Mladeníci 99, Viškovo 51216

Elektronička pošta: tea.mladenic@uniri.hr

Obrazovanje

2021. -

Doktor znanosti, Doktorska škola – Biomedicina, Medicinski fakultet u Rijeci

2018. - 2020.

Magistar biotehnologije u medicini , Biotehnologija u medicini , Sveučilište u Rijeci, Fakultet za biotehnologiju

2015. - 2028.

Sveučilišni prvostupnik biotehnologije i istraživanja lijekova, Istraživanje i razvoj lijekova, Sveučilište u Rijeci, Fakultet za biotehnologiju

Radno iskustvo

1.2.2020. -

Znanstveni novak – asistent, Zavod za medicinsku biologiju i genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

1.11.2020. - 31.1.2020.

Znanstveni novak - asistent (zamjena), Zavod za temeljnu i kliničku farmakologiju s toksikologijom, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Usavršavanja

1.9.2024. - 27.9.2024.

Erasmus znanstveno usavršavanje u polju molekularne genetike (NGS) u sklopu doktorata Klinički institut za genomsu medicinu, Sveučilišni klinički centar Ljubljana

2.9.2024. - 6.9.2024.

7th course Basics in Human Genetic Diagnostics – A course for CLGs* in education, Figueira da Foz, The European Society of Human Genetics

10.7.2023.

Engleski kao jezik visokoškolske nastave u medicini (EJVINMed), Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet

15.6.2022. - 15.9.2022.

Erasmus stručno i znanstveno usavršavanje u polju molekularne genetike, Klinički institut za genomsku medicinu, Sveučilišni klinički centar Ljubljana

Znanstveni radovi

1. Mladenčić T, Barišić A, Vukelić I, Gršković A, Starčević Čizmarević N, Vraneković J. Asthenozoospermia in a patient with reciprocal translocation t(12;15): A case report. Urol Case Rep. 2025;61:103077. doi:10.1016/j.eucr.2025.103077
2. Gašparović Krpina M, Dević Pavlić S, Mladenčić T, i sur. Association of 25(OH)-Vitamin D3 Serum Concentrations and Vitamin D Receptor Gene Variants with the Risk of Idiopathic Spontaneous Preterm Birth in the Croatian Population. Int J Mol Sci. 2024;25(21):11712. doi:10.3390/ijms252111712
3. Mladenčić T, Barišić A, Perez N, Ostojić S, Peterlin B, Dević Pavlić S. Maternal genetic risk factors for spontaneous preterm birth: A systematic review and meta-analysis. Int J Gynaecol Obstet. doi:10.1002/ijgo.16056
4. Dević Pavlić S, Šverko R, Barišić A, i sur. MTHFR Gene Polymorphisms and DNA Methylation in Idiopathic Spontaneous Preterm Birth. Medicina (Kaunas). 2024;60(12):2028. doi:10.3390/medicina60122028
5. Mladenčić T, Wagner J, Kadivnik M, i sur., Protective Effect of EBF Transcription Factor 1 (EBF1) Polymorphism in Sporadic and Familial Spontaneous Preterm Birth: Insights from a Case-Control Study. Int J Mol Sci. 2024;25(20):11192. doi:10.3390/ijms252011192
6. Saftić Martinović L, Mladenčić T, Lovrić D, Ostojić S, Dević Pavlić S. Decoding the Epigenetics of Infertility: Mechanisms, Environmental Influences, and Therapeutic Strategies. Epigenomes. 2024;8(3):34. doi:10.3390/epigenomes8030034
7. Mladenčić T, Mavrinac M, Dević Pavlić S, i sur. Non-genetic physicians' knowledge, attitudes and behavior towards medical genetics. Wien Klin Wochenschr. 2024;136(5-6):137-145. doi:10.1007/s00508-023-02152-0
8. Page, M.J., McKenzie, J.E., Bossuyt, P., i sur. Pravila PRISMA 2020.: ažurirane smjernice za izvještavanje u sustavnim pregledima. Medicina Fluminensis, 2021;57(4):444-465. doi:10.21860/medflum2021_264903

Kongresna priopćenja

1. Mladenić T, Turk A, Maver A, Ostojić S, Peterlin B, Dević Pavlić S. Higher incidence of rare predicted pathogenic variants in familial spontaneous preterm birth cases suggests possible heritability risk. 58th European journal of human genetics. Milano 24.5.2025.-27.5.2025. (poster prezentacija)
2. Pereza N, Dević Pavlić S, Mladenić T i sur. A Retrospective Study of Diagnostic Next Generation Sequencing at the University of Rijeka, Faculty of Medicine, Croatia from 2018 to 2023. 13th ISABS Conference on Applied Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine. Split 17.6.2024.-20.6.2024. (poster prezentacija)
3. Dević Pavlić S, Mladenić T, Krišto R, Pereza N. The role of ACE gene polymorphism in preterm birth: insights from a meta-analysis and a case-control study in the Croatian population. 13th ISABS Conference on Applied Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine. Split 17.6.2024.-20.6.2024. (poster prezentacija)
4. Peterlin AM, Mladenić T, Dević Pavlić S, Peterlin B. Chromosomal Microarray Analysis in Congenital Heart Disease: Meta-Analysis of Diagnostic Yield. 57th European journal of human genetics. Berlin 1.6.2024.-4.6.2024. (poster prezentacija)
5. Mladenić T, Barišić A, Pereza N, Ostojić S, Peterlin B, Dević Pavlić S. Maternal genetic risk factors for spontaneous preterm birth: a systematic review and meta-analysis. 57th European journal of human genetics. Berlin 1.6.2024.-4.6.2024. (poster prezentacija)
6. Mladenić T, Mance K, Barišić A, Wagner J, Kadivnik M, Ostojić S, Peterlin B, Dević Pavlić S, Pereza N. Association between TNF-alpha -308 G/A polymorphism and familial spontaneous preterm birth. "Science and Us" 2nd Biomedicine and Health PhD Students Congress University of Rijeka. Rijeka 16.5.2024.-18.5.2024. (poster prezentacija)
7. Mladenić T, Liehr T, Barišić A, Padutsch N, Kankel S, Gršković A, Starčević Čizmarević N, Vraneković J. Balanced complex chromosomal rearrangement of chromosome 2 in an infertile male. 14th European Cytogenomics Conference-ECA 2023. Montpellier 1.7.2023.-4.7.2023. (poster prezentacija)
8. Mladenić T, Mavrinac M, Dević Pavlić S, Malnar A, Matić M, Mikić S, Ostojić S, Pereza N. Non-genetic health professionals' knowledge, attitudes, and behaviors towards medical genetics in Croatia. 55th European Human Genetics Conference 2022. Beč 11.6.-14.6.2022. (poster prezentacija)
9. Pilipović K, Jurički I, Mladenić T, Harej Hrkać A, Gržeta N, Parpura V, Župan G. Chemically-functionalized single-walled carbon nanotubes increase the expression of glial fibrillary

acidic protein in the mouse primary astrocytes exposed to severe in vitro traumatic brain injury. Neuroscience 2021. Washington 11.1.-13.1.2021. (poster prezentacija)

10. Mladenović T, Barišić A, Liehr T, Starčević Čizmarević N, Brajenović-Milić B, Ostojić S, Vraneković J. Fluorescence in situ hybridization: a Gold Standard in Identification of Small Supernumerary Marker Chromosome in Prenatal Diagnostics. The 8th World Congress on Controversies in Preconception, Preimplantation and Prenatal Genetic Diagnosis online conference. Online 6.11.2021. (poster prezentacija)
11. Mladenović T, Dević Pavlić S, Barišić A, Vraneković J, Stanković A, Peterlin A, Peterlin B Ostojić S, Pereza, N. VDR gene polymorphisms and DNA methylation in idiopathic spontaneous preterm birth. The 8th World Congress on Controversies in Preconception, Preimplantation and Prenatal Genetic Diagnosis online conference. Online 6.11.2021. (poster prezentacija)
12. Mladenović T, Gržeta N, Harej Hrkać A, Parpura V, Pilipović K. Effects of single-walled carbon nanotubes on the survival and release of cytokines from stretch- injured astrocytes. 7th Congress of the European Academy of Neurology. Online 19.6.-22.6.2021. (poster prezentacija)

Nagrade i priznanja

18.6.2025.-24.06.2025.

Stipendija "European Society of Human Genetics" za sudjelovanje na "The ESHG International Mentorship Programme" Jena, Njemačka

4.4.2025.

Nagrada za nastavnu izvrsnost u akademskoj godini 2023./2024.

8.9.2025. - 12.9.2025.

Stipendija "European Society of Human Genetics" za sudjelovanje na "Basics in human genetic diagnostics – A course for CLGs* in education" Figueira da Foz, Portugal

1.7.2023. - 4.7.2023.

Stipendija "European Cytogeneticists Association" za sudjelovanje na "14th European Cytogenomics Conference" Montpellier, Francuska

11.6.2022. - 14.6.2022.

Stipendija "European Society of Human Genetics" za sudjelovanje na "European Human Genetics Conference" Beč, Austrija

Znanstveni projekti

2024. - 2025.

Fond PROMETEJ, Sveučilište u Rijeci - voditelj

2024. -

Komparativno metabolomičko profiliranje folikularnih tekućina žena podvrgnutim postupcima medicinski pomognute oplodnje (MPO), Sveučilište u Rijeci - suradnik

2024. -

Uloga varijabilnosti genoma žene u idiopatskom spontanom prijevremenom porodu, Sveučilište u Rijeci - suradnik

2021. -

Genetički i epigenetički čimbenici u etiologiji ponavljajućih spontanih pobačaja i spontanih prijevremenih poroda, Sveučilište u Rijeci – suradnik

Članstva

2024. -

European Society of Human Reproduction and Embryology

2023. -

The European Society of Human Genetics, European Cytogeneticists Association, Hrvatsko društvo za humanu genetiku