

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Milena Gašparović Krpina

**VARIJANTE SEKVENCE GENA ZA VITAMIN D RECEPTOR
I SERUMSKE KONCENTRACIJE VITAMINA D U
IDIOPATSKIM SPONTANIM PRIJEVREMENIM PORODIMA**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2025.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Milena Gašparović Krpina

**VARIJANTE SEKVENCE GENA ZA VITAMIN D RECEPTOR
I SERUMSKE KONCENTRACIJE VITAMINA D U
IDIOPATSKIM SPONTANIM PRIJEVREMENIM PORODIMA**

DOKTORSKI RAD

Mentorica: Izv. prof. dr. sc. Nina Pereza, dr. med.

Komentorica: Prof. dr. sc. Neda Smiljan Severinski, dr. med.

Rijeka, 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Milena Gašparović Krpina

**SEQUENCE VARIANTS IN THE VITAMIN D
RECEPTOR GENE AND SERUM VITAMIN D
CONCENTRATIONS IN IDIOPATHIC SPONTANEOUS
PRETERM BIRTH**

DOCTORAL THESIS

Menthor: Assoc. prof. Nina Pereza, MD, PhD
Comenthor: Prof. Neda Smiljan Severinski, MD, PhD

Rijeka, 2025.

Mentorica: Izv. prof. dr. sc. Nina Pereza, dr. med.

Komentorica: Prof. dr. sc. Neda Smiljan Severinski, dr.med.

Doktorski rad obranjen je dana _____ 2025. godine na Medicinskom fakultetu
Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Rad ima 105 listova

UDK: _____

PREDGOVOR

Rad je izrađen na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci, Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra Rijeka, Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Rijeka te na Kliničkom institutu za medicinsku genetiku, Univerzitetnog kliničkog centra u Ljubljani, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Nine Pereza, dr. med., u sklopu doktorskog studija „Biomedicina“, pri Medicinskom fakultetu u Rijeci. Istraživanje je izvršeno uz potporu dva projekta voditeljice izv. prof. dr. sc. Nine Pereze, dr. med. - Genska varijabilnost i epigenetički čimbenici u idiopatskim ponavljajućim spontanim pobačajima i spontanom prijevremenom porodu, Sveučilište u Rijeci, (br. 17.07.2.1.04) te Varijabilnost gena uključenih u nadzor epigenetičkih modifikacija u idiopatskim ponavljajućim spontanim pobačajima i spontanom prijevremenom porodu, Sveučilište u Rijeci, (br. 16.06.2.1.02.).

SAŽETAK

Cilj: Glavni cilj ovog istraživanja bio je ispitati jesu li polimorfizmi jednog nukleotida (SNP; engl. *single nucleotide polymorphism*) u *VDR* genu te neadekvatna serumska koncentracija 25-hidroksivitamina D3 u majki i njihove novorođene djece, samostalno ili u kombinaciji, čimbenici predispozicije za idiopatski spontani prijevremeni porod.

Ispitanici i metode: Istraživanje je osmišljeno kao istraživanje parova (engl. *case-control study*). Ispitivanu skupinu činile su 162 majke s ISPP-om i 44 prijevremeno rođene djece, a kontrolna skupina su bile 163 majke s terminskim porodom i 44 terminski rođene djece. U istraživanje genetičke povezanosti su bili uključeni svi sudionici, a za genotipizaciju rs2228570 C/T, rs11568820 G/A, rs7975232 T/G, rs1544410 G/A i rs731236 T/C *VDR* SNP-ova koristila se lančana reakcija polimerazom (PCR; engl. *polymerase chain reaction*) i polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP; engl. *restriction fragment length polymorphism*). U biokemijsku analizu serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D3 bilo je uključeno 44 para majki i njihove novorođene djece u skupini ispitanika i jednak broj u skupini kontrola. Serumska koncentracija 25-hidroksivitamina D3 određivana je metodom tekućinske koncentracije visoke djelotvornosti (HPLC; engl. *high performance liquid chromatography*).

Rezultati: Između skupina ispitanika i kontrola utvrđena je statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova i alela *Cdx2* polimorfizma *VDR* gena, pri čemu su genotip GG i alel G bili značajno učestaliji u skupini prijevremeno rođene djece u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P = 0,017$, odnosno $P < 0,001$). Prisutnost G alela povezana je s 3,63 puta većim rizikom za razvoj spontanog prijevremenog poroda ($OR = 3,63$; 95 % CI = 1,88–7,01; $P < 0,001$). U skupini majki s ISPP-om dokazan je statistički značajan utjecaj *FokI* i *ApaI* SNP-ova na porođajnu masu novorođenčadi (*FokI*: $P = 0,007$; *ApaI*: $P = 0,034$). Utvrđena je statistički značajna korelacija koncentracija 25-hidroksivitamina D3 između majki i njihove novorođenčadi u obje skupine ($b = 0,771$; $P < 0,001$). Naposljetku, genotip GG *Cdx2* polimorfizma *VDR* gena bio je povezan sa značajno nižim koncentracijama vitamina D3 u kontrolnim skupinama u majki i djece ($P = 0,001$, odnosno $P = 0,022$).

Zaključak: Dobiveni rezultati upućuju na moguću povezanost varijanti *VDR* gena i statusa vitamina D s podložnošću za idiopatski spontani prijevremeni porod te naglašavaju važnost daljnjih istraživanja genetičkih i metaboličkih čimbenika u njihovom nastanku.

Ključne riječi: istraživanje genetičke povezanosti; polimorfizmi jednog nukleotida; prijevremeni porod; receptor, kalcitriol; vitamin D

SUMMARY

Objective: The main objective of this study was to investigate whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *VDR* gene and inadequate serum concentrations of 25(OH)-vitamin D3 in mothers and their newborns, independently or in combination, are predisposing factors for idiopathic spontaneous preterm birth (ISPTB).

Subjects and Methods: This case-control study included 162 mothers with ISPTB and 44 of their newborns in the patient group, and 163 mothers with full-term deliveries and 44 full-term newborns in the control group. All participants were included in the genetic association analysis. Genotyping of the *VDR* SNPs rs2228570 C/T, rs11568820 G/A, rs7975232 T/G, rs1544410 G/A and rs731236 T/C was performed using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Biochemical analysis of serum 25(OH)-vitamin D3 concentrations was conducted on 44 women–newborn pairs from the patient group and an equal number from the control group. In these participants, serum concentrations of 25(OH)-vitamin D3 were determined using high-performance liquid chromatography (HPLC).

Results: A statistically significant difference in the distribution of *Cdx2* SNP genotypes and alleles was observed between the patient and control groups, with the GG genotype and G allele being significantly more frequent in the group of preterm infants compared to the control group ($P < 0.001$). The odds ratio (OR) analysis showed that the presence of the G allele was associated with a 3.63-fold increased risk of ISPTB (OR = 3.63; 95% CI = 1.88–7.01; $P < 0.001$). In the group of women with ISPTB, a statistically significant effect of the FokI and ApaI SNPs on neonatal birth weight was observed (FokI: $p = 0.007$; ApaI: $p = 0.034$). A statistically significant correlation was observed between maternal and neonatal 25(OH)-vitamin D3 concentrations in both groups ($b = 0.771$; $p < 0.001$). The GG genotype of the *Cdx2* *VDR* SNP was associated with significantly lower concentrations of 25(OH)-vitamin D3 in the control groups, both in women and in children ($P = 0.001$ and $P = 0.022$, respectively).

Conclusion: The obtained results suggest a possible association between *VDR* gene variants and vitamin D status with susceptibility to spontaneous preterm birth, highlighting the importance of further research into genetic and metabolic factors involved in its pathogenesis.

Keywords: Genetic Association Studies; Polymorphism, Single Nucleotide; Preterm Birth; Receptors, Calcitriol; Vitamin D

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. Klasifikacija prijevremenog poroda.....	1
1.2. Patogeneza prijevremenog poroda.....	2
1.3. Čimbenici rizika za prijevremeni porod.....	4
1.4. Genetička predispozicija za idiopatski spontani prijevremeni porod.....	6
1.5. Metabolizam i fiziologija vitamina D	7
1.5.1. Uloga vitamin D u trudnoći	9
1.5.2. Vitamin D i prijevremeni porod	10
1.6. Vitamin D receptor	11
1.7. Polimorfizmi gena za vitamin D receptor.....	12
1.8. Vitamin D receptor i prijevremeni porod	14

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Lokacije istraživanja	16
3.2. Ispitanici	16
3.3. Metode	21
3.3.1. Istraživanje genetičke povezanosti	21
3.3.1.1. Izolacija genomske DNA	21
3.3.1.2. Genotipizacija polimorfizama VDR gena	21
3.3.2. Biokemijska analiza serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D3	24
3.4. Etički aspekti istraživanja	25
3.5. Statistička obrada podataka	25

4. REZULTATI

4.1. Epidemiološke značajke ispitanica	27
4.2. Analiza genetičke povezanosti	32
4.2.1. Učestalost polimorfizama u genu za vitamin D receptor.....	32
4.2.1.1 Analiza pojedinačnih polimorfizama	32
4.2.1.2 Analiza kombinacija polimorfizama	40
4.3. Povezanost polimorfizama VDR gena s kliničkim značajkama ispitanica i njihovih novorođenčadi.....	45
4.4. Biokemijska analiza serumskih koncentracija 25-hidroksivitamina D3.....	50
4.4.1. Analiza serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D 3	50

4.5. Povezanost polimorfizma <i>VDR</i> gena sa serumskim koncentracijama 25-hidroksivitamina D3.....	53
5. RASPRAVA	
5.1. Epidemiološke značajke ispitanica i kontrola	56
5.2. Analiza polimorfizama <i>VDR</i> gena	57
5.2.1. Pojedinačni polimorfizmi.	58
5.2.2. Kombinacije polimorfizama.....	60
5.3. Povezanost polimorfizama <i>VDR</i> gena s kliničkim značajkama ispitanika	61
5.4. Analiza serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D3 i povezanost polimorfizma <i>VDR</i> gena sa serumskom koncentracijom 25-hidroksivitamina D3	64
5.5. Prednosti i nedostaci istraživanja	66
6. ZAKLJUČCI	
7. LITERATURA	
POPIS POKRATA	
ILUSTRACIJE	
Popis slika	89
Popis tablica	90
PRILOZI	
Prilog 1 anketni upitnik (prijevremeni porod).....	93
Prilog 2 anketni upitnik (terminski porod).....	97
ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

Prijevremeni porod (PP; engl. *preterm birth*) definira se kao porod prije navršenog 37. tjedna trudnoće (259 dana gestacije) [1]. Globalna učestalost PP-a iznosi 9,9 %, što odgovara približno 13,4 milijuna prijevremeno rođene djece godišnje [2,3]. Obzirom na to da je PP vodeći uzrok novorođenačkog morbiditeta (70 %) i mortaliteta (više od 75 %) te jedan od glavnih uzroka dugoročnih neuroloških oštećenja prijevremeno rođene djece, predstavlja značajan globalni javnozdravstveni problem [4].

Unatoč napretku u opstetriciji i razvoju zdravstvene skrbi, učestalost PP-a ne pokazuje značajan pad u posljednjem desetljeću [5]. Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO; engl. *World Health Organization*) donja granica prijevremenog poroda je 22+0 tjedna gestacije, što ujedno predstavlja i granicu između poroda i pobačaja [1]. U Republici Hrvatskoj ta je granica usvojena 2001. godine za potrebe vođenja vitalne statistike. Tijekom posljednja dva desetljeća, zahvaljujući kvaliteti perinatalne skrbi u Republici Hrvatskoj, učestalost prijevremenih poroda iznosi oko 6,5 %, a 2020. godine prijevremeno je rođeno približno 2.500 djece [6].

1.1. Klasifikacija prijevremenog poroda

Prema gestacijskoj dobi, PP klasificira se u četiri skupine: izrazito ili ekstremno rani (engl. *extreme preterm birth*), prije navršenog 28. tjedna, vrlo rani (engl. *very early preterm birth*), između navršenih 28 i 31+6 tjedana, rani (engl. *moderate preterm birth*), između navršenih 32 i 33+6 tjedana te kasni (engl. *late preterm birth*), između 34 i 36+6 tjedana [7,8].

Kasni PP-i čine najveći udio svih PP-ova, približno 60 - 70 %, zatim slijede umjereno rani (oko 20 %), vrlo rani (oko 15 %) te ekstremno rani porodi, koji čine otprilike 5 % slučajeva [9,10].

Obzirom na etiologiju, PP može biti medicinski indiciran prijevremeni porod MIPP (engl. *medically indicated preterm birth*) ili spontan prijevremeni porod SPP (engl. *spontaneous preterm birth*) [11]. Medicinski indicirani porodi najčešće su posljedica patoloških stanja majke, poput preeklampsije, predležće posteljice ili abrupcije posteljice te

fetalnih komplikacija, uključujući intrauterini zastoj rasta i fetalni distress [12]. S druge strane, SPP započinje spontanim trudovima bez prsnuća vodenjaka ili nakon prijevremenog preranog prsnuća plodovih ovoja (PPROM; engl. *preterm premature rupture of membranes*), koje se događa najmanje jedan sat prije početka trudova [13,14]. SPP-i čine heterogenu skupinu različitih etioloških uzroka. Isključivanjem poznatih uzroka, odnosno kada se razlog prijevremenog poroda ne može utvrditi, takav se porod naziva idiopatskim spontanim prijevremenim porodom ISPP (engl. *idiopathic spontaneous preterm birth*) [15]. ISPP-i čine 50 % do 65 % svih spontanih prijevremenih poroda [16].

1.2. Patogeneza prijevremenog poroda

Terminski porod počinje složenim i usklađenim procesima koji uključuju hormonske, upalne i mehaničke signale [17]. Ključna je faza sazrijevanje cerviksa, što uključuje promjene u njegovoj strukturi i funkciji koje omogućuju omekšavanje i dilataciju cerviksa. Istovremeno, dolazi do povećanja kontraktilnosti mišića maternice, što je rezultat promjena u ekspresiji receptora za oksitocin i prostaglandine [18,19]. Prsnuće plodovih ovoja najčešće se javlja tijekom aktivne faze poroda te dodatno potiče aktivaciju poroda [13,20].

S druge strane, prijevremeni porod je povezan s preranom aktivacijom ovih mehanizama, često uzrokovanom patološkim stanjima [10,15,21,22]. Infekcije, upalne reakcije, stres i vaskularni poremećaji mogu izazvati prerano otpuštanje upalnih medijatora koji stimuliraju kontrakcije i sazrijevanje cerviksa [23,24]. Također, mehanički faktori poput prekomjernog rastezanja maternice mogu potaknuti prijevremeni porod [8,10,21]. Za razliku od terminskog poroda, prijevremeni porod često je rezultat neadekvatne regulacije ovih procesa, što dovodi do prijevremenog početka poroda.

Trudnoća se dijeli u 4 faze: faza 0, I, II, III.

Nulta faza (tiha faza) je razdoblje tijekom koje maternica raste i priprema se za porod. U ovoj fazi miometrij je relaksiran, a cerviks je zatvoren i čvrst. Tiha faza traje veći dio trudnoće, kada mnogobrojne biološki aktivne komponente u cirkulaciji (npr. progesteron, prostaciklin, dušični oksid, relaksin) djeluju na održavanje mirovanja maternice i sprječavanje preranih kontrakcija. Imunološki sustav majke djeluje kako bi spriječio upalne reakcije koje bi

mogle potaknuti kontrakcije. Progesteron ima ključnu ulogu u održavanju ove faze, smanjujući osjetljivost miometrija na kontraktilne podražaje [25].

Faza I (faza aktivacije) označava početak pripreme maternice za porod. Može ju pokrenuti mehaničko rastezanje maternice kao rezultat fetalnog rasta i/ili aktivacija fetalne hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda osi (HPA; engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal*), kao rezultat fetalne zrelosti. Ova faza uključuje kompleksne promjene na molekularnoj razini. Dolazi do povećanja ekspresije receptora za oksitocin i prostaglandine u miometriju, što maternicu čini osjetljivijom na kontrakcijske signale [26]. Istovremeno, smanjuje se djelovanje progesterona, a raste djelovanje estrogena, što zajedno potiče sazrijevanje cerviksa i povećava kontraktilnost mišića maternice [27-29]. Tijekom faze aktivacije, cerviks počinje omekšavati i gubiti svoju čvrstoću. Tkivo cerviksa se remodelira, kolagen se razgrađuje, a voda se zadržava u njegovoj strukturi, što omogućava njegovo širenje. Upalne stanice i citokini sve su prisutniji u cerviksu, sudjelujući u ovom procesu [30,31]. Ova faza može trajati danima ili čak tjednima i priprema uterus za nadolazeću fazu poroda.

U fazi II, poznatoj kao faza stimulacije miometrija, aktivira se niz događaja koji dovode do pojačanih kontrakcija materničnog mišića, skraćanja cerviksa i širenja ušća maternice [32]. Ovaj proces najčešće započinje placentarnom proizvodnjom kortikotropin otpuštajućeg hormona (CRH; engl. *Corticotropin-releasing hormone*), čija se koncentracija u trudnoći eksponencijalno povećava i dostiže vrhunac tijekom poroda. Cirkulirajući CRH djeluje putem receptora u miometriju, povećavajući kontraktilnu aktivnost mišićnog sloja maternice [33-35]. Oksitocin, koji se luči iz hipofize, ima ključnu ulogu u iniciranju i održavanju ovih kontrakcija, pojačavajući njihovu učestalost i intenzitet [36]. Progesteron, s druge strane, tijekom ranih faza trudnoće održava miometriju u relaksiranom stanju, čime sprječava prerani početak kontrakcija. Njegova koncentracija postupno raste tijekom trudnoće [17], no istovremeno raste i razina estrogena, hormona koji djeluje antagonistički na progesteron. Estrogen potiče ekspresiju kontraktilnih proteina u maternici, mijenja električna svojstva mišićnih stanica te povećava koncentraciju unutarstaničnog kalcija, što je ključno za kontrakcije [37]. Također, estrogen povećava broj električnih spojeva (engl. *gap junctions*) između glatkih mišićnih stanica, omogućujući koordinirane i sinkrone kontrakcije miometrija. Omjer između estrogena i progesterona važan je regulator sinteze prostaglandina, što dodatno utječe na kontraktilnost maternice [38]. Prostaglandini predstavljaju ključne molekule u pokretanju i napredovanju poroda. Oni su derivati arahidonske kiseline i nastaju djelovanjem enzima prostaglandin H-

sintaze (PGHS; engl. *Prostaglandin H synthase*) [39,40]. Za razliku od toga, enzim hidroksiprostaglandin dehidrogenaza (PGDH; engl. *Hydroxyprostaglandin dehydrogenase*) razgrađuje prostaglandine u inaktivne oblike [41]. Aktivnost PGHS stimuliraju estrogini, CRH i kortizol, dok proupalni citokini poput interleukina 1 (IL-1; engl. *Interleukin-1*) i tumorskog nekrotizirajućeg faktora alfa (TNF α ; engl. *Tumor necrosis factor alpha*) povećavaju izražaj PGHS i istovremeno smanjuju aktivnost PGDH [42]. Ovaj mehanizam pojašnjava kako infekcije mogu potaknuti proizvodnju prostaglandina i time izazvati prijevremeni porod. Prostaglandini također igraju važnu ulogu u sazrijevanju cerviksa, potičući razgradnju kolagena i stvaranje međustaničnih veza u miometriju [43]. To omogućuje usklađene i snažne kontrakcije, koje su nužne za efikasan tijek poroda.

Nakon završetka poroda nastupa faza III (faza involucije). Tijekom ove faze, maternica se kontrahira kako bi zatvorila krvne žile i smanjila gubitak krvi. Miometrij postupno prolazi kroz proces strukturne i funkcionalne regresije, vraćajući se na približnu veličinu i morfološko stanje prije trudnoće [44].

Sve četiri faze trudnoće i poroda su usklađene i međusobno povezane. Svaka faza je ključna za pravilan tijek trudnoće i fiziološki tijek poroda. Nepravilnosti ili poremećaji u bilo kojoj od ovih faza mogu dovesti do komplikacija, poput prijevremenog poroda.

1.3. Čimbenici rizika za prijevremeni porod

Prijevremeni porod predstavlja kompleksan i multifaktorijalan entitet, čiji nastanak je uvjetovan brojnim međusobno povezanim čimbenicima rizika [45-48]. Pravovremeno prepoznavanje te ciljano liječenje imaju ključnu ulogu u smanjenju incidencije prijevremenog poroda i pridruženih perinatalnih komplikacija. Obzirom na učestale hospitalizacije prijevremeno rođene novorođenčadi u jedinicama intenzivne njege, kao i potencijalne dugoročne negativne zdravstvene posljedice te visoku stopu smrtnosti, istražuju se različiti čimbenici koji bi mogli doprinijeti boljem razumijevanju PP-a.

Čimbenici rizika najčešće se svrstavaju u ovih 7 skupina: 1. demografski i socijalni čimbenici, 2. obiteljska i prethodna anamneza, 3. čimbenici trudnoće, 4. kirurški čimbenici, 5. upalne i infektivne bolesti, 6. fiziološki i anatomske čimbenici te 7. psihološki i okolišni čimbenici.

Postoje čvrsti znanstveni dokazi i brojni znanstveni radovi koji potvrđuju infekciju kao jedan od vodećih čimbenika rizika za PP [49-51]. Infekcije putem upalnih procesa potiču preranu aktivaciju kontrakcija miometrija i dovode do skraćanja cerviksa te prsnuća plodovih ovoja. Mikroorganizmi mogu dospjeti u amnijsku šupljinu različitim putovima: ascendentno kroz vaginu i cervikalni kanal, hematogenim putem preko placente, slučajno tijekom invazivnih postupaka te retrogradno preko jajovoda. Najčešći način infekcije je ascendentna invazija, koja se najčešće događa tijekom drugog tromjesečja. Infekcije donjeg genitalnog trakta, bakterijska vaginoza, ureaplazma i mikoplazma, kao i upalne bolesti plodovih ovoja - korioamnionitis, predstavljaju važan uzrok prijevremenog poroda, posebice u kontekstu proupalnih citokina i pojačane sinteze prostaglandina [52]. Osim genitalnih i sistemske infekcije kod trudnice mogu indirektno potaknuti preranu aktivaciju porođajnog procesa.

Postupci umjetne oplodnje povezani su s povećanom učestalošću višeplođnih trudnoća, koje su same po sebi značajan čimbenik rizika za prijevremeni porod [53,54]. Višeplođna trudnoća značajno povećava rizik od prijevremenog poroda zbog povećanog mehaničkog opterećenja maternice i cerviksa, što rezultira ranijim širenjem maternice i povećanim rizikom od kontrakcija. Dodatno, u višeplođnim trudnoćama češće se javljaju komplikacije poput preeklampsije i gestacijskog dijabetesa, koje putem mehanizama oksidativnog stresa, upale i poremećaja placentarne perfuzije mogu pridonijeti prijevremenom porodu [55].

Kirurški zahvati na cerviksu, kao što su konizacija i LLETZ (engl. *Large Loop Excision of the Transformation Zone*) predstavljaju važan čimbenik rizika jer mogu dovesti do oštećenja cervikalne strukture, smanjenja mehaničke otpornosti i skraćanja cerviksa [56]. Takve promjene olakšavaju preranu dilataciju ušća maternice, dok oštećenje epitela i promjene u lokalnoj mikrobioti povećavaju rizik od infekcija koje dodatno potiču upalne procese povezane s prijevremenim porodom [57].

Socioekonomski čimbenici, poput niskog socijalnog statusa, povezani su s ograničenim pristupom prenatalnoj skrbi, lošijom prehranom i povećanim psihosocijalnim stresom, što kumulativno doprinosi riziku prijevremenog poroda [58,59]. Pušenje tijekom trudnoće potiče oksidativni stres te narušava placentarnu perfuziju obzirom da nikotin i ugljični monoksid imaju snažan vazokonstriktorni učinak, što rezultira smanjenjem uteroplacentarnog protoka krvi [60,61]. Konzumacija alkohola dodatno kompromitira placentarnu funkciju te je također prepoznata kao rizični čimbenik [62]. Dob majke predstavlja važan demografski čimbenik: adolescentne trudnice često se suočavaju s većim rizikom zbog neadekvatnog razvoja

reproduktivnog sustava i nepovoljnih socioekonomskih uvjeta, dok trudnice starije od 35 godina češće imaju kronične bolesti i komplikacije koje doprinose češćem prijevremenom porodu u toj dobnoj skupini. Dodatno, kronične bolesti majke, kao što su hipertenzija, šećerna bolest, autoimune bolesti i bubrežne bolesti te anatomske abnormalnosti maternice (npr. septum, miomi) također povećavaju rizik od prijevremenog poroda [63]. Posljednjih godina sve se više istražuje genetička predispozicija kao ključni čimbenik u razvoju ISPP-a.

1.4. Genetička predispozicija za idiopatski spontani prijevremeni porod

Brojna epidemiološka istraživanja potvrdila su da je genetička predispozicija majke i/ili fetusa, jedan od ključnih rizičnih faktora za ISPP [64,65].

Pozitivna osobna i/ili obiteljska anamneza predstavlja najsnažniji prediktor PP-a [66,67]. Žene koje su i same rođene prijevremeno imaju gotovo dvostruko veći rizik od prijevremenog poroda u vlastitoj trudnoći, neovisno o drugim čimbenicima [68]. Nadalje žene koje imaju sestru koja je rodila prijevremeno imaju 80 % veći rizik za PP [69]. Studije koje su temeljene na istraživanjima blizanaca ukazuju da nasljedni čimbenici mogu doprinijeti do 40 % rizika [70]. Osim toga, žene koje su rodile prijevremeno u prvoj trudnoći imaju tri do sedam puta veći rizik od PP-a u sljedećim trudnoćama u usporedbi sa ženama koje su prvo dijete rodile u terminu [71]. Također je dokazano da se učestalost PP-a značajno razlikuje ovisno o geografskom i etničkom podrijetlu [72].

Iako se danas najveća pažnja posvećuje metodama sekvenciranja cijelog egzoma i genoma, koje obećavaju najprecizniju identifikaciju funkcionalno značajnih genetičkih varijanti odgovornih za ISPP [73], istraživanja genetičke povezanosti (engl. *Genetic association studies*) ostaju podjednako važna za razumijevanje složene etiologije ovog stanja [74]. Istraživanjem genetičke povezanosti proučava se povezanost određenih genetičkih varijanti, poput polimorfizama jednog nukleotida (SNP; engl. *Single nucleotide polymorphisms*), s pojavom određene bolesti ili fenotipa u populaciji [75]. SNP-ovi čine najčešći oblik intragenskih varijanti sekvence, a nastaju zamjenom jednog nukleotida [66,76]. Ako je SNP prisutan u kodirajućem dijelu gena, može dovesti do promjene funkcije i/ili strukture proteina, dok SNP-ovi u promotorskoj regiji, a ponekad i nekodirajućim slijedovima, mogu dovesti do promijenjenog izražaja pripadajućeg gena [77-79]. Istraživanja genetičke povezanosti u ISPP-u mogu biti sveobuhvatna, kao i ciljana. Ciljana istraživanja usmjerena su

na prepoznavanje varijante sekvenci u potencijalnim kandidatima gena majke (poput TNF α , IL-4, IL-6, VEGF, faktora Va) i fetusa (uključujući TNF α , IL-1, IL-4, MMP1, MMP9, TLR4) koje su povezane s rizikom od PP-a [80,81]. Jedan od gena od posebnog interesa u biologiji reproduktivnog sustava jest gen za vitamin D receptor (VDR; engl. *Vitamin D receptor*).

1.5. Metabolizam i fiziologija vitamina D

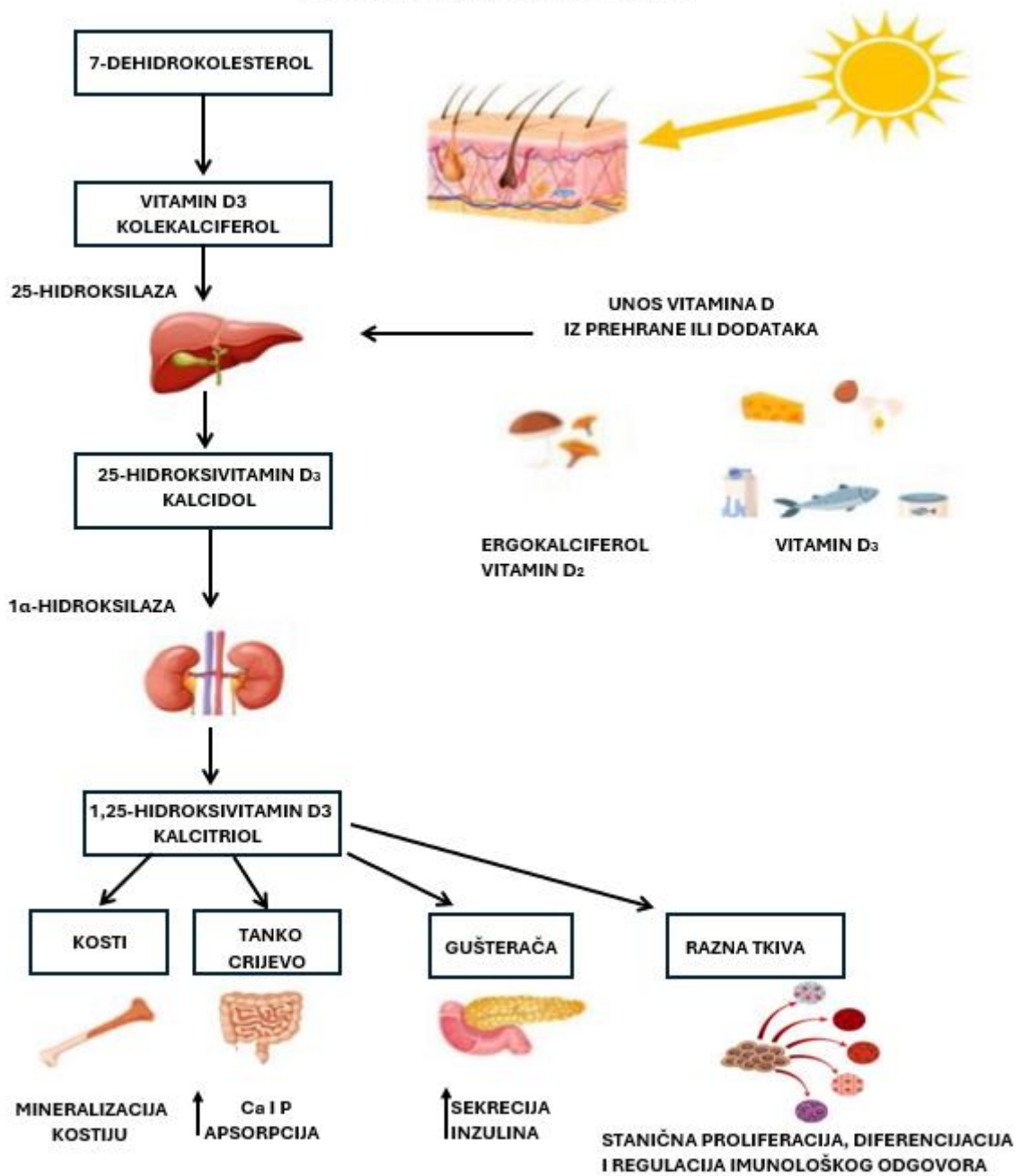
Vitamin D je vitamin topiv u mastima, koji se danas smatra prohormonom. Metabolizam vitamina D uključuje složen proces koji započinje njegovim unosom ili sintezom, a završava nastankom biološki aktivnog oblika hormona [82].

Glavni izvor vitamina D je endogena sinteza u koži pod utjecajem UVB zračenja (valne duljine 290 - 315 nm), pri čemu 7-dehidrokolesterol prelazi u previtamin D3, a zatim u vitamin D3 (kolekalciferol) [83]. Vitamin D može se unijeti hranom, u obliku vitamina D2 (ergokalciferol) iz biljnih izvora i gljiva te vitamina D3 iz životinjskih izvora (masna riba, jaja, jetra) te suplementacijom u farmakološkim oblicima [84].

Jednom apsorbiran ili sintetiziran, vitamin D se veže na vitamin D-vezni protein (VDBP; engl. *Vitamin D-binding protein*) u plazmi i transportira do jetara [85]. U jetrima prolazi prvu hidroksilaciju pomoću enzima 25-hidroksilaze, pri čemu nastaje 25-hidroksivitamin D3, glavni cirkulirajući oblik i najbolji pokazatelj statusa vitamina D u organizmu (Slika 1).

Nakon toga, u bubrezima se uz djelovanje enzima 1 α -hidroksilaze provodi druga hidroksilacija, čime nastaje biološki aktivan hormon 1,25-dihidroksivitamin D, poznat i kao kalcitriol. Aktivnost 1 α -hidroksilaze reguliraju paratiroidni hormon (PTH), koncentracije kalcija i fosfata te fibroblastni faktor rasta 23 (FGF23 eng. *Fibroblast growth factor 23*) [86].

METABOLIZAM VITAMINA D



Slika 1. Metabolizam vitamina D

Ca - kalcij, P - fosfor

Preuzeto i prilagođeno prema Md Isa i sur. [87].

Kalcitriol djeluje putem VDR-a u ciljnim tkivima, regulirajući ekspresiju brojnih gena uključenih u homeostazu kalcija i fosfata, mineralizaciju kosti, imunološku funkciju i druge biološke procese [88]. Prekomjerne koncentracije aktivnog oblika razgrađuju se putem 24-hidroksilaze, koja vodi do neaktivnih metabolita koji se potom izlučuju urinom i žuči.

Uloga vitamina D u regulaciji metabolizma kalcija i fosfora dobro je poznata, vitamin D održava mineralnu ravnotežu i zdravlje kostiju, potičući apsorpciju kalcija u crijevima te reapsorpciju u bubrezima [89]. Međutim, njegovi biološki učinci nadilaze klasičnu ulogu u mineralnom metabolizmu [90]. Vitamin D djeluje kao steroidni hormon koji, vezujući se na nuklearni VDR, regulira ekspresiju više od 200 gena uključenih u proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu stanica [91]. Ima važnu imunomodulatornu ulogu, potičući diferencijaciju monocita u makrofage, pojačavajući fagocitozu te stimulirajući sintezu antimikrobnih peptida poput katelicidina i defensina [92]. Istodobno, vitamin D smanjuje produkciju proupalnih citokina (npr. IL-6, TNF- α) i povećava sintezu protuupalnih citokina, čime modulira upalni odgovor [93]. Njegovo protuupalno djelovanje posebno je značajno u prevenciji i modulaciji kroničnih upalnih bolesti te u održavanju imunološke homeostaze tijekom trudnoće. Osim toga, vitamin D ima ulogu u regulaciji funkcije glatkih mišićnih stanica, angiogenezi, inzulinskoj osjetljivosti i kardiovaskularnom zdravlju. Neadekvatni status vitamina D povezuje se s povećanim rizikom od kroničnih bolesti, uključujući maligne bolesti, autoimune i upalne bolesti, šećernu bolest tipa 2, neurokognitivne poremećaje te povećanu smrtnost [86,94]. Budući da vitamin D, osim uloge u metabolizmu kalcija i fosfora, posjeduje značajne učinke u regulaciji imunološkog odgovora, protuupalne učinke te regulira ekspresiju brojnih gena, sve se više istražuje njegova potencijalna uloga u etiologiji i prevenciji prijevremenog poroda.

1.5.1. Uloga vitamina D u trudnoći

Vitamin D i njegove funkcije posredovane vezanjem za vitamin D receptor imaju značajnu ulogu tijekom implantacije, placentacije i održavanja normalne trudnoće [95-97].

Vitamin D ima ključnu ulogu u održavanju uredne trudnoće, ponajprije kroz regulaciju homeostaze kalcija i fosfata, čime podržava mineralizaciju fetalnog skeleta i normalan razvoj zuba [98]. Osim toga, djeluje na imunološki sustav trudnice, potičući toleranciju prema fetusu te smanjujući rizik od prekomjernog proupalnog odgovora [99]. Vitamin D sudjeluje u regulaciji angiogeneze i formiranja posteljice, što je važno za adekvatan uteroplacentarni protok krvi [100]. Njegova sposobnost modulacije ekspresije brojnih gena može doprinijeti

pravilnom rastu i sazrijevanju fetalnih organa. Optimalne koncentracije vitamina D povezane su s manjim rizikom od komplikacija poput preeklampsije i gestacijskog dijabetesa [101-103].

Koncentracija aktivnog oblika vitamina D u cirkulaciji kontinuirano raste tijekom trudnoće te u terminu poroda doseže dvostruko do trostruko višu koncentraciju u usporedbi sa ženama koje nisu trudne [101].

Prema Institutu za medicinu (IOM; engl. *Institute of Medicine*), optimalne, odnosno zadovoljavajuće vrijednosti vitamina D smatra se koncentracija 50 nmol/L (20 ng/mL) i više. Insuficijencija, odnosno nedostatak vitamina D definira se kao koncentracija 30 - 50 nmol/L (12 - 20 ng/mL), dok se deficijencija odnosno manjak vitamina D smatraju koncentracije ispod 30 nmol/L (12 ng/mL) [104]. Gotovo 50 % svjetske populacije pati od insuficijencije vitamina D [105].

Smjernice Američkog kolegija opstetričara i ginekologa (ACOG; engl. *American College of Obstetricians and Gynecologists*) i Kraljevskog kolegija opstetričara i ginekologa (RCOG; engl. *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists*) preporučuju održavanje razina vitamina D iznad 50 nmol/L (20 ng/mL) u trudnoći, uz standardnu suplementaciju od 400–600 IU dnevno, a kod manjka vitamina D mogu se primijeniti i veće doze [106,107]. Neadekvatne serumske koncentracije vitamina D u trudnica povezane su s brojnim komplikacijama trudnoće i lošijim perinatalnim ishodom [108]. Osim toga, prijevremeno rođena djeca pokazuju niže razine vitamina D u cirkulaciji [99], a nekoliko je studija jasno potvrdilo i uzročnu povezanost između statusa vitamina D u trudnica i rizika od PP-a [96-98].

1.5.2. Vitamin D i prijevremeni porod

Metabolizam vitamina D tijekom trudnoće i njegova povezanost s PP-om predmet je intenzivnih istraživanja.

U kontekstu globalne pandemije nedostatka vitamina D, procjenjuje se da između 30 % i 80 % trudnica diljem svijeta ima neadekvatne koncentracije vitamina D tijekom trudnoće, ovisno o geografskom području, izloženosti Suncu, prehrambenim navikama i drugim čimbenicima [109]. Za europsku populaciju, taj postotak iznosi oko 40 - 60 % trudnica [110]. Neodgovarajuće koncentracije vitamina D u serumu trudnica povezane su s brojnim komplikacijama trudnoće i lošijim perinatalnim ishodima, poput gestacijskog dijabetesa, preeklampsije, primarnog carskog reza i intrauterinog zastoja u rastu.

Obzirom na to da koncentracija vitamina D u plodu u potpunosti ovisi o statusu majčinog cirkulirajućeg vitamina D, neadekvatne koncentracije u trudnica mogu imati posljedice na ishod trudnoće i zdravlje djece. Tako je dokazano da su neadekvatne koncentracije vitamina D tijekom trudnoće povezane s brojnim komplikacijama i lošijim perinatalnim ishodom, kao što su preeklampsija, gestacijski dijabetes melitus (GDM; engl. *Gestational diabetes mellitus*), intrauterini zastoje rasta ploda i PP [111]. Iako su rezultati pojedinačnih prethodnih istraživanja oprečni te uvelike ovise o uključenim i isključenim kriterijima za ispitanike, kao i laboratorijskim metodama za određivanje vitamina D, metaanalize upućuju na to da trudnice s neadekvatnim serumskim koncentracijama vitamina D imaju povišeni rizik za PP [112-116]. Nadalje, rezultati randomiziranih kontroliranih istraživanja upućuju na to da suplementacija vitaminom D smanjuje rizik za PP [115].

1.6. Vitamin D receptor

Vitamin D receptor spada u superporodicu receptora u jezgri i kao transkripcijski čimbenik posrednik je u metaboličkom putu vitamina D. To je proteinska molekula sastavljena od nekoliko funkcionalnih domena: DNA-vezne domene (DBD; engl. DNA-binding domain), koja se veže na specifične sekvence DNA poznate kao vitamin D-odgovorni elementi (VDRE), te ligandom vezne domene (LBD; engl. ligand-binding domain), koja prepoznaje i veže aktivni oblik vitamina D, kalcitriol (1,25-dihidroksivitamin D₃). Nakon vezanja liganda, VDR tvori heterodimer s retinoidnim X receptorom (RXR), što omogućuje regulaciju transkripcije ciljnih gena. VDR je prisutan u gotovo svim tkivima organizma, uključujući kost, crijeva, bubrege, posteljicu i stanice imunološkog sustava, što objašnjava širok spektar bioloških učinaka vitamina D.

Vitamin D receptor je izražen na majčino - fetalnom spoju te potiče transkripciju gena čiji proizvodi promiču apsorpciju kalcija, sekreciju hormona, migraciju, diferencijaciju i proliferaciju stanica [117,118].

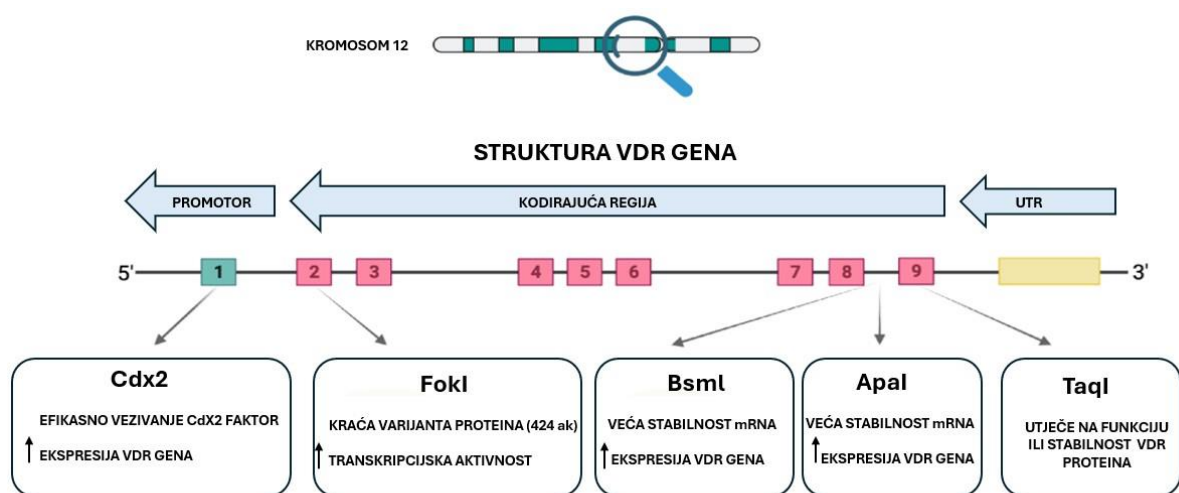
1.7. Polimorfizmi gena za vitamin D receptor

Polimorfizmi u genu za *VDR* mogu utjecati na funkcionalnu aktivnost receptora i povezani su s povećanim rizikom za različite bolesti, uključujući PP.

Metaboličko djelovanje vitamina D ostvaruje se vezanjem za *VDR*, koji je kodiran *VDR* genom. *VDR* gen nalazi se na 12. kromosomu, a unutar njega je otkriveno više od 60 varijanti sekvence, pri čemu su najistraženiji i najbolje opisani SNP-ovi: rs11568820 (*Cdx2*) u promotorskoj regiji, rs2228570 (*FokI*) u drugom egzonu te SNP-ovi smješteni u blizini 3' nekodirajuće regije (engl. *untranslated region*, UTR), rs1544410 (*BsmI*), rs7975232 (*ApaI*) i rs731236 (*TaqI*) (Slika 2). Ove genske varijante povezane su s promjenama u ekspresiji gena te izmijenjenom strukturom i/ili funkcijom *VDR* mRNA i proteina [119]. Obzirom na to da je vitamin D receptor izražen na sučelju majka - plod, polimorfizmi u *VDR* genu mogu imati značajan utjecaj na tijek trudnoće. Povezanost ovih SNP-ova u *VDR* genu s pojavom SPP ispitivana je u nekoliko genetskih studija, no rezultati su bili kontradiktorni.

Tablica 1. Utjecaj polimorfizama *FokI* (rs2228570), *ApaI* (rs7975232), *Cdx2* (rs11568820), *BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236) *VDR* gena na gensku ekspresiju

Polimorfizam	Alel	Utjecaj na gensku ekspresiju
<i>FokI</i> rs2228570	T	kodira dužu varijantu <i>VDR</i> proteina (427 aminokiselina), koja ima nižu transkripcijsku aktivnost
	C	kodira kraću varijantu <i>VDR</i> proteina (424 aminokiseline), koja ima veću transkripcijsku aktivnost
<i>ApaI</i> rs7975232	T	niža stabilnost mRNA i manja ekspresija <i>VDR</i> gena
	G	veća stabilnost mRNA i veća ekspresija <i>VDR</i> gena
<i>Cdx2</i> rs11568820	A	slabije vezivanje <i>CDX2</i> faktora, što dovodi do manje ekspresije <i>VDR</i> gena
	G	efikasno vezivanje <i>CDX2</i> faktora, što dovodi do veće ekspresije <i>VDR</i> gena
<i>BsmI</i> rs1544410	A	veća stabilnost mRNA i veća ekspresija <i>VDR</i> gena
	G	niža stabilnost mRNA i manja ekspresija <i>VDR</i> gena
<i>TaqI</i> rs731236	T	može biti povezan sa smanjenom ekspresijom <i>VDR</i> gena
	C	može biti povezan sa povećanom stabilnošću mRNA, koja dovodi do veće količine <i>VDR</i> proteina i veće ekspresije ciljnih gena



Slika 2. Struktura gena za vitamin D receptor

VDR - vitamin D receptor, UTR - nekodirajuća regija (engl; *Untranslated Region*), Cdx2 faktor - transkripcijski faktor caudal-type homeobox 2 (engl; *Caudal-type homeobox transcription factor 2*), ak - aminokiseline, mRNA - glasnička ribonukleinska kiselina (engl; *messenger ribonucleic acid*)

1.8. Vitamin D receptor i prijevremeni porod

Povezanost navedenih polimorfizama *VDR* gena u majki s SPP-om ispitana je u svega nekoliko istraživanja genetičke povezanosti, a rezultati su oprečni [120-124]. U pojedinačnim istraživanjima utvrđena je povezanost SPP-a s FokI i Cdx2 polimorfizmima gena za vitamin D receptor, kao i s određenim genotipskim kombinacijama polimorfizama BsmI, ApaI i TaqI [120-123]. Rosenfield i sur. dokazali su da majčin i fetalni *VDR* genotip utječu na trajanje trudnoće [124].

Iako povezanost navedenih polimorfizama *VDR* gena i serumske razine D vitamina u etiologiji SPP dosad nije istraživana u europskoj populaciji, brojna istraživanja drugih poremećaja upućuju na to da genetička struktura *VDR* gena utječe na serumske koncentracije vitamina D [125,126].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj bio je istražiti jesu li SNP-ovi u *VDR* genu te neadekvatna serumska koncentracija 25-hidroksivitamina D3 u majki i njihove novorođene djece, samostalno ili u kombinaciji, čimbenici predispozicije za ISPP.

Osnovna pretpostavka je da SNP-ovi u *VDR* genu te neadekvatna serumska koncentracija 25-hidroksivitamina D3 u majki i njihove novorođene djece, samostalno ili u kombinaciji, predstavljaju čimbenike predispozicije za ISPP.

Specifični ciljevi istraživanja bili su sljedeći:

1. Odrediti i usporediti frekvencije genotipova i alela sljedećih SNP-ova u *VDR* genu između ispitivane skupine i kontrola (majke s ISPP-om vs. majke s terminskim porodom; prijevremeno rođena djeca vs. terminski rođena djeca):
 - rs 2228570 C<T (FokI),
 - rs 11568820 G<A (Cdx2),
 - rs 7975232 T<G (ApaI), a dodatno su učinjene i sljedeće analize:
 - rs 1544410 G<A (BsmI),
 - rs 731236 T<C (TaqI)
2. Utvrditi genetičku povezanost genotipova i alela SNP-ova u *VDR* genu s predispozicijom za ISPP zasebno u majki i djece.
3. Odrediti i usporediti serumsku koncentraciju 25-hidroksivitamina D3 između ispitivane skupine i kontrola (majke s ISPP-om vs. majke s terminskim porodom; prijevremeno rođena djeca vs. terminski rođena djeca).
4. Utvrditi povezanost između serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D3 majki i njihove novorođene djece zasebno u ispitivanoj i kontrolnoj skupini.
5. Usporediti serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D3 ovisno o genotipu pojedinih SNP-ova u *VDR* genu u ispitivanoj skupini (zasebno majke s ISPP-om i prijevremeno rođena djeca) i kontrola (zasebno majke s terminskim porodom i terminski rođena djeca).
6. Utvrditi međusobnu povezanost između genotipova SNP-ova u *VDR* genu, serumskih koncentracija 25-hidroksivitamina D3 i porođajne mase novorođene djece zasebno u ispitivanoj i kontrolnoj skupini.
7. Ispitati utjecaj dodatnih pridruženih čimbenika na ISPP i njihovo međusobno djelovanje na ISPP, kao što su starosna dob majke pri porodu, indeks tjelesne mase prije trudnoće.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Lokacije istraživanja

Istraživanje je provedeno na:

1. Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci (pohrana uzoraka, izolacija genomske DNA, genotipizacija polimorfizama *VDR* gena)
2. Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Rijeka (biokemijska analiza serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D3)
3. Klinici za ginekologiju i porodništvo, Kliničkog bolničkog centra Rijeka (prikupljanje uzoraka)
4. Kliničkom institutu za genomsku medicinu Univerzitetnog kliničkog centra u Ljubljani (prikupljanje uzoraka, izolacija genomske DNA)

Svi materijali prikupljeni su prilikom poroda na:

1. Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Uzorci pripadaju Biobanci TransMedRi - Banka biouzoraka u sklopu istraživanja prijevremenih poroda (voditelj: prof. dr. sc. Saša Ostojić, dr. med.; EU-FP7 Regpot-2010-5, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci). Prikupljanje bioloških uzoraka trajalo je od 2017. do 2019. godine.
2. Kliničkom institutu za genomsku medicinu Univerzitetnog kliničkog centra u Ljubljani, Slovenija. Prikupljanje bioloških uzoraka trajalo je 2010. do 2019 godine.

3.2. Ispitanici

Istraživanje je provedeno kao istraživanje parova (engl. *case-control study*), pri čemu su uključene dvije skupine sudionika: skupina ispitanika s ISPP-om te kontrolna skupina.

Ukupno je prikupljeno 175 uzoraka krvi ispitanica s ISPP-om te isti broj u kontrolnoj skupini s terminskim porodom za provođenje istraživanja genetičke povezanosti te određivanje koncentracije 25-hidroksivitamina D3. Međutim, kvantifikacija 25-hidroksivitamina D3 nije bila moguća kod dijela uzoraka zbog neadekvatne kvalitete kromatograma. Dodatno, određeni uzorci nisu pravilno pohranjeni pri -20 °C, što je dovelo do njihove degradacije. Ukoliko je i jedan uzorak para majka - dijete bio neadekvatan za analizu, cijeli par je isključen iz daljnjeg istraživanja. Nakon primjene ovih kriterija kvalitete, za daljnju analizu uključene su 162

ispitanice s ISPP-om te 163 majke s terminskim porodom. Ovaj pristup osigurao je pouzdanost i točnost dobivenih rezultata.

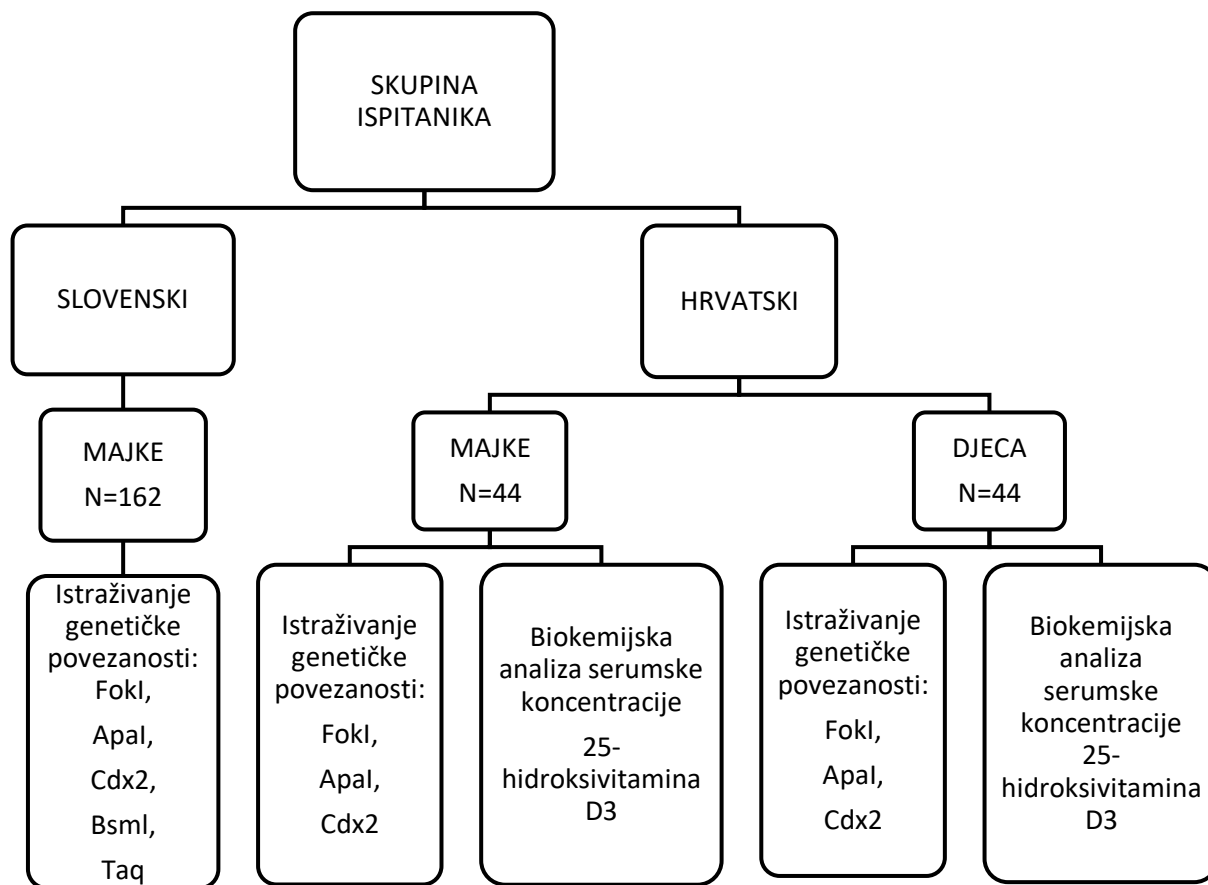
U skupini ispitanica s ISPP-om od ukupno 162 majke, 118 je bilo slovenskih sudionica te 44 hrvatskih sudionica, zajedno s njihovih 44 prijevremeno rođene djece (Slika 3). Uključni kriterij za SPP definiran je kao porod prije navršenog 37. tjedna gestacije, a započeo je spontano, bez medicinske indukcije. Sukladno strogo određenim isključnim kriterijima, iz istraživanja su isključene sve ispitanice s poznatim etiološkim čimbenicima prijevremenog poroda, uključujući trudnoće ostvarene medicinski potpomognutom oplodnjom, višepodne trudnoće, bubrežne bolesti, prethodne kirurške zahvate na vratu maternice (npr. konizacija i LLETZ), dokazane infekcije donjeg genitalnog trakta te komplikacije tijekom trudnoće kao što su gestacijska hipertenzija i GDM. Iz istraživanja su isključene sve ispitanice koje su rodile mrtvorođeno dijete, kao i one čija su novorođenčad imala dijagnosticirane kongenitalne anomalije ili potvrđene infekcije.

Kontrolnu skupinu činile su 163 majke s urednim terminskim porodom, 119 slovenskih sudionica te 44 hrvatskih sudionica te njihovo 44 novorođenčadi rođene u terminu (Slika 4). Uključni kriterij za terminski porod definiran je kao dovršenje trudnoće između 37. i 42. tjedna gestacije. Svi porodi su dovršeni spontanom vaginalnim porodom, nakon nekomplikirane trudnoće. U skladu sa strogim uključnim kriterijima, u istraživanje su uključene sudionice istog pariteta, usporedive dobi, etničke pripadnosti, socioekonomskog i demografskog statusa, s istog geografskog područja, koje su imale jednak pristup antenatalnoj skrbi te mogućnost poroda u ustanovi tercijarne zdravstvene zaštite, a porođaji su se dogodili u istom godišnjem razdoblju kao i kod ispitanica s ISPP-om. Kontrolna skupina odabrana je prema čim sličnijim značajkama kao skupina ispitanica s ISPP-om, čime je značajno smanjen utjecaj varijabilnosti populacijskih parametara na rezultate istraživanja. Isključni kriteriji za kontrolnu skupinu bili su identični onima primijenjenima na skupinu ispitanica s ISPP-om. Iz istraživanja su stoga isključene sve trudnice kod kojih je trudnoća rezultat potpomognute oplodnje, one s višeplođnom trudnoćom, bubrežnim bolestima, prethodnim zahvatima na cerviksu (npr. konizacija ili LLETZ), kao i one s potvrđenim infekcijama donjeg genitalnog trakta ili komplikacijama tijekom trudnoće, poput gestacijske hipertenzije i GDM. Dodatno, isključene su sve žene koje su rodile mrtvorođeno dijete ili čija su novorođenčad imala prirođene malformacije ili potvrđene infekcije.

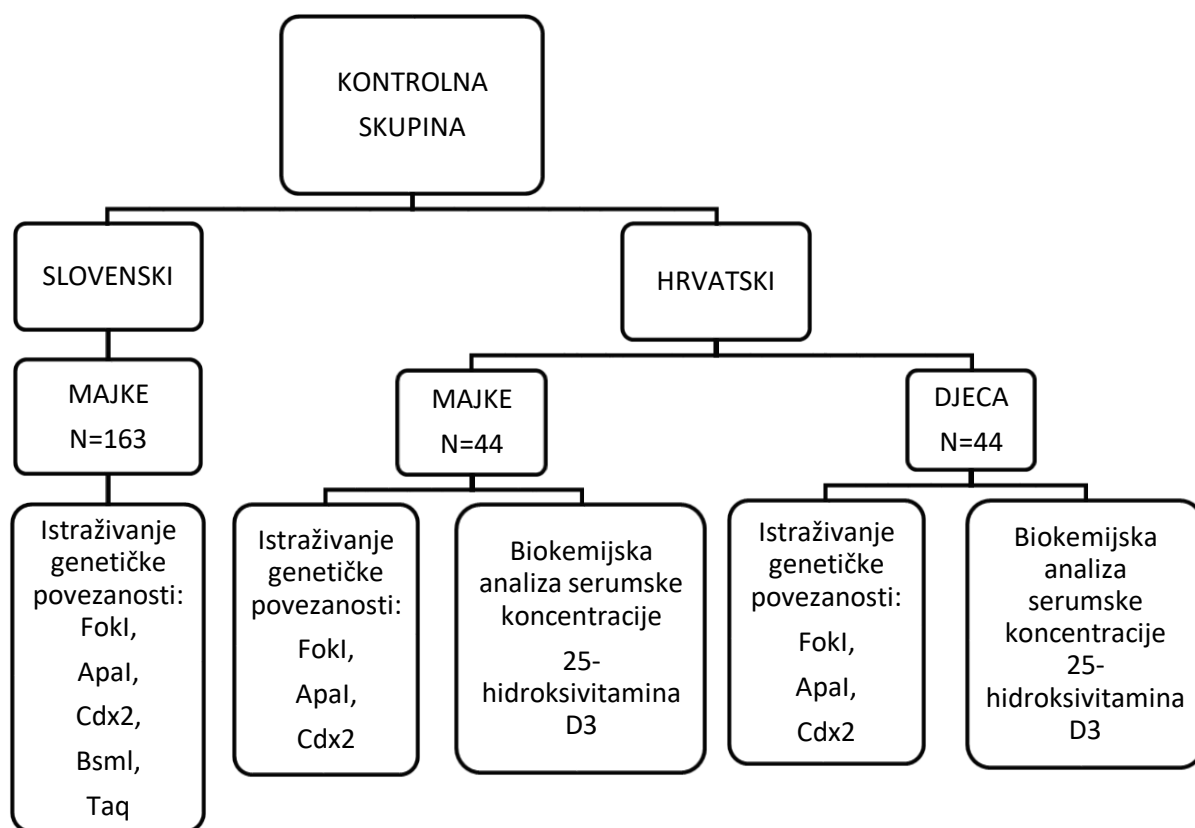
U obje skupine, skupini ispitanica s ISPP-om i kontrolnoj skupini, gestacijska dob određena je na temelju prvog dana posljednjeg menstruacijskog ciklusa, a potvrđena ultrazvučnim pregledom tijekom prvog tromjesečja. U slučajevima nesukladnosti između

datuma izračunatog prema menstruacijskom ciklusu i ultrazvučnog nalaza, za konačnu procjenu gestacijske dobi uzet je ultrazvučni nalaz kao relevantniji pokazatelj.

Sve sudionice uključene u istraživanje prethodno su detaljno informirane o ciljevima i metodologiji istraživanja, a njihov informirani pristanak za sudjelovanje te suglasnost za korištenje pohranjenih uzoraka krvi i DNA potvrđeni su potpisivanjem pisanog obrasca informiranog pristanka. Prikupljanje anamnestičkih i kliničkih podataka provedeno je putem strukturiranih upitnika, posebno izrađenih za skupinu ispitanica s ISPP-om i kontrolnu skupinu (Prilozi 1 i 2). Upitnici su ispunjavani uz stručnu pomoć liječnika na dan poroda.



Slika 3. Shematski prikaz skupine ispitanika i primjenjenih istraživanja



Slika 4. Shematski prikaz kontrolne skupine i primjenjenih istraživanja

3.3. Metode

3.3.1. Istraživanje genetičke povezanosti

U istraživanje genetičke povezanosti uključeni su svi sudionici, odnosno 162 majke s ISPP-om i 44 prijevremeno rođene djece te 163 majke s urednim terminskim porodom i 44 terminski rođene djece.

3.3.1.1. Izolacija genomske DNA

Izolacija genomske DNA molekule provedena je na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci i Kliničkom institutu za medicinsku genetiku Univerzitetskog kliničkog centra u Ljubljani uz pomoć komercijalno dostupnih kitova za izolaciju DNA, prema standardnom postupniku proizvođača (Qiagen FlexiGene DNA kit, Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka). Koncentracija i čistoća izolirane genomske DNA molekule određena je spektrofotometrom prema postupniku proizvođača (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, Sjedinjene Američke Države). Navedeni uzorci krvi i genomske DNA molekule pohranjeni su na -20 °C na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Genomska DNA izolirana je iz leukocita periferne venske krvi majki, prikupljene venepunkcijom (10 mL) u epruvetu s EDTA antikoagulansom, tijekom poroda. Također, DNA je izolirana iz leukocita krvi pupkovine novorođenčadi (10 mL), prikupljene neposredno nakon rođenja djeteta, a prije porođaja posteljice.

3.3.1.2. Genotipizacija polimorfizama VDR gena

Za genotipizaciju FokI rs2228570, Cdx2 rs11568820, ApaI rs7975232, BsmI rs1544410, TaqI rs731236 polimorfizama korištena je kombinacija metoda lančane reakcije polimerazom (PCR; engl. *polymerase chain reaction*) i polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP; engl. *restriction fragment length polymorphism*). Uvjeti za PCR-RFLP reakcije, uključujući početnice, temperaturne cikluse i vrste restrikcijskih endonukleaza preuzeti su iz standardnog protokola [127]. Sljedovi nukleotida specifičnih početnica i veličine PCR produkata korištenih za analizu VDR polimorfizama prikazani su u Tablici 2, a uvjeti PCR reakcija u Tablici 3.

Amplifikacija ciljnih sekvenci DNA provedena je pomoću PCR uređaja (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg, Njemačka, i 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems,

Carlsbad, CA, SAD), u ukupnom reakcijskom volumenu od 10 μ L. Za kontrolu moguće kontaminacije PCR smjese korištene su negativne kontrole.

Nakon PCR-a, proizvodi reakcije podvrgnuti su enzimskom cijepanju korištenjem specifičnih restrikcijskih enzima, sukladno protokolima proizvođača (New England Biolabs, Ipswich, MA, SAD). Sastav smjesa za restrikcijsku analizu VDR polimorfizama, korišteni enzimi, uvjeti provedbe restrikcije te veličine dobivenih fragmenata prikazani su u Tablici 4.

Razdvajanje amplificiranih PCR produkata i njihovih restrikcijskih fragmenata izvedeno je elektroforezom, pri naponu od 85 V tijekom 45 minuta, na agaroznim gelovima koncentracije 1 % i 3 %, uz dodatak 15 μ L boje GelRed™ (Olerup SSP®, Saltsjöbaden, Švedska). Vizualizacija rezultata izvršena je pomoću transiluminatora pod UV svjetlom. Za procjenu veličine fragmenata korišteni su DNA standardi veličine 50 i 100 bp.

Tablica 2. Slijedovi nukleotida specifičnih početnica i veličine PCR produkata korištenih za analizu polimorfizama VDR gena

Polimorfizam	Početnice	PCR produkt
FokI rs2228570	5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT -3' 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC -3'	267 bp
Cdx2 rs1156882	5'-GGATCCCCAAAAGGAAAGGAA-3' 5'-TGTTCCAGATGGTAAAAATAGAATGA-3'	396 bp
ApaI rs7975232	5'-GGATCCTAAATGCACGGAGA-3' 5'-ACGTCTGCAGTGTGTTGGAC-3'	265 bp
BsmI rs1544410	5'-CCTCACTGCCCTTAGCTCTG-3' 5'-TGCCTCCAAAATCAATCAGG-3'	247 bp
TaqI rs731236	5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3' 5'-CACTTCGAGCACAAGGGGCGTTAGC-3'	501 bp

PCR produkt - produkt lančane reakcije polimeraze (engl; *Polymerase Chain Reaction product*), bp - bazni parovi

Tablica 3. Uvjeti PCR reakcija korištenih za analizu polimorfizama VDR gena

Korak	FokI rs2228570	Cdx2 rs1156882	ApaI rs7975232	BsmI rs1544410	Taq rs731236
<i>Temperatura °C / Vrijeme trajanja</i>					
1. početna denaturacija	94 °C / 5 min	95 °C / 5 min	95 °C / 5 min	95 °C / 5 min	95 °C / 5 min
2. denaturacija	94 °C / 35 sec	95 °C / 60 sec	95 °C / 60 sec	95 °C / 60 sec	95 °C / 60 sec
3. sparivanje početnica	61 °C / 35 sec	55 °C / 60 sec	55 °C / 60 sec	55 °C / 60 sec	55 °C / 60 sec
4. produljivanje lanaca	72 °C / 1 min	72 °C / 60 sec	72 °C / 60 sec	72 °C / 60 sec	72 °C / 60 sec
broj ponavljanja koraka 2. - 4.	35	35	35	35	35
5. završno produljivanje lanaca	72 °C / 7 min	72 °C / 10 min	72 °C / 10 min	72 °C / 10 min	72 °C / 10 min

°C - stupnjeva Celzija, min - minuta, sec - sekunda

Tablica 4. Vrste restrikcijskih enzima, uvjeti restrikcije i veličine restrikcijskih fragmenata korištenih za analizu polimorfizama VDR gena [127]

Polimorfizam	Restrikcijski enzim	Restrikcijski fragmenti (bp)
FokI rs2228570	FokI	C alel: 267 T alel: 195 + 72
Cdx2 rs1156882	HpyCH4III	A alel: 316 + 80 G alel: 265 + 80 + 51
ApaI rs7975232	ApaI	T alel: 265 G alel: 146 + 119
BsmI rs1544410	BsmI	A alel: 247 G alel: 144 + 103
TaqI rs731236	TaqI	T alel: 495 + 6 C alel: 294 + 201 + 6

bp - bazni parovi

3.3.2. Biokemijska analiza serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D3

U istraživanje biokemijske analize serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D3 bilo je ukupno uključeno 176 sudionika, od toga 44 majke s ISPP-om i njihova 44 prijevremeno rođena djeca te 44 majke s urednim terminskim porodom i njihova 44 terminski rođena djeca. Uzorci krvi prikupljeni su na Zavodu za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra Rijeka, na dan poroda. Uzorci periferne venske krvi ispitanica dobivene venepunkcijom te krvi iz pupkovine djeteta, prikupljeni su u epruvetu s heparinskim gelom. Krv iz pupkovine uzorkovana je neposredno nakon rođenja djeteta, a prije porođaja posteljice. Uzorci prikupljene krvi za biokemijsku analizu koncentracija 25-hidroksivitamina D3 centrifugirani su na 1500 okretaja u minuti, tijekom 10 minuta. Dobiveni uzorci seruma su oprezno izdvojeni, alikvotirani u mikroeprove i zamrznuti na -20 °C do daljnjih analiza.

Laboratorijske analize koncentracija 25-hidroksivitamina D3 u serumu provedene su na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Koncentracije 25-hidroksivitamina D3 u serumu određene su metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC; engl. *High Performance Liquid Chromatography*) na uređaju Nexera X2 (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Priprema uzoraka provedena je ručno, korištenjem komponenata iz komercijalnog HPLC kompleta za 25-hidroksivitamin D3 (Recipe, München, Njemačka). Postupak pripreme obuhvaćao je sljedeće korake: 500 µL reagensa Precipitat p pomiješano je s 400 µL seruma, a zatim je dodano 400 µL unutarnjeg standarda te je smjesa homogenizirana 30 sekundi. Nakon miješanja, uzorci su centrifugirani 5 minuta pri 10.000 g, pri čemu su nastale dvije tekuće faze. Gornja faza (supernatant) korištena je za HPLC analizu.

Pripremljeni uzorci analizirani su na Nexera X2 modularnom tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti, koristeći komercijalni HPLC komplet za 25-hidroksivitamin D3 (Recipe, München, Njemačka). Sustav Nexera X2 bio je opremljen s dva LC-30AD modula za isporuku otapala, SIL-30A autosamplerom, CTO-30A kolonskom pećnicom i SPD-M30A detektorom s fotodiodnim nizom.

Uvjeti HPLC analize bili su sljedeći: protok 0,9 mL/min, temperatura 40 °C, volumen injekcije 30 µL, vrijeme trajanja analize 12 minuta, a detektor je bio postavljen na valnu duljinu od 264 nm. Linearnost metode bila je u rasponu od 7,3 do 1210 nmol/L, a donja granica kvantifikacije iznosila je 2,7 nmol/L za 25-hidroksivitamin D3, dok je za drugi analizirani

parametar linearan raspon bio od 6,5 do 1250 nmol/L. Koncentracije 25-hidroksivitamin D3 izražene su u nmol/L.

3.4. Etički aspekti istraživanja

U ovom istraživanju poštivani su temeljni etički i bioetički principi i standardi, uključujući osobni integritet - autonomnost, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost, koji su u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. Nadalje, medicinski podaci prikupljeni su u skladu s bioetičkim standardima te je osigurana privatnost (medicinska tajna) ispitanika uključenih u istraživanje i zaštita tajnosti podataka. Identitet sudionika uvijek će ostati anoniman, s obzirom na to da ispitanici prilikom uključivanja u istraživanje dobiju pripadajuću šifru. Ispitanice su upoznate s cjelokupnim istraživanjem te su dale svoj pristanak na istraživanje potpisivanjem informirane suglasnosti.

Prikupljanje biološkog materijala i medicinskih podataka odobrili su Etičko povjerenstvo za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Rijeci, Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Rijeka te su Državna komisija za biomedicinsku etiku Republike Slovenije. Provođenje predloženih istraživanja u sklopu znanstveno-istraživačkih projekata odobrilo je Etičko povjerenstvo za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Rijeci (003-08/19-01/5; 2170-24-24-3-19-3), i Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Rijeka (003-05/19-1/21; 2170-29-02/1-19-2).

3.5. Statistička obrada podataka

Prikupljeni podaci statistički su obrađeni u programu Microsoft Excel (Microsoft Office), a statistička analiza provedena je u programu Statistica for Windows, inačica 14.0.0.15 (StatSoft Inc., Tulsa Oklahoma, Sjedinjene Američke Države) i MedCalc v12.1.3. i MedCalc, inačica 12.1.3. (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija). Statistička snaga testa izračunata je pomoću DSS Researcher's Toolkit (<https://www.dssresearch.com/resources/calculators/statistical-power-calculator-percentage/>).

Analiza genotipova prema Hardy-Weinbergovom principu provedena je korištenjem Simple Hardy-Weinberg Calculator-a Court Lab (Washington State University College of Veterinary Medicine, Pullman, WA, SAD).

Epidemiološki podaci sudionika prikazani su deskriptivnom statistikom. Normalnost distribucije numeričkih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovljev testom. Učestalosti kategorijskih varijabli prikazane su apsolutnim i relativnim frekvencijama, dok su numeričke varijable prikazane prikladnim mjerama središnjice (aritmetička sredina ili medijan) i raspršenjima (standardna devijacija ili interkvartilni raspon). U epidemiološkim karakteristikama, dob i indeksa tjelesne mase (BMI; engl. *body mass index*) ispitanica prikazani su kao srednje vrijednosti i standardna devijacija, a razlike između skupina testirane su t-testom za nezavisne uzorke. Porođajna masa i duljina prikazani su kao medijani i interkvartilni rasponi (IKR), a razlike između skupina testirane su Mann-Whitneyjevim testom.

Za usporedbu frekvencija genotipova i alela ispitivanih polimorfizma VDR gena, kao i njihovih kombinacija između skupina ispitanika i kontrola (zasebno majke s ISPP-om i majke s terminskim porodom te prijevremeno i terminski rođene djece) korišten je Pearsonov hi-kvadrat test. Nadalje, za analizu genetičke povezanosti genotipova i alela ispitivanih SNP-ova u VDR genu prema dominantnom, recesivnom i kodominantnom modelu zasebno u žena i djece korišten je omjer izgleda (OR; engl. *odds ratio*) i pripadajući 95 % intervali pouzdanosti (CI; engl. *confidence interval*).

Jednosmjerna i dvosmjerna analiza varijance (ANOVA) s faktorijskim dizajnom i post-hoc Scheffé testom korištene su za usporedbu učinka genotipova VDR gena na porođajnu masu novorođenčadi (jednostavna ANOVA za pojedinačne SNP-ove, dvostruka ANOVA za interakciju između SNP-ova).

Serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D3 prikazane su kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama. Za usporedbu serumskih koncentracija 25-hidroksivitamina D3 između ispitivane skupine i kontrola (zasebno između majki s ISPP-om i terminskim porodom, kao i prijevremeno i terminski rođene djece) korišten je t-test za nezavisne uzorke. Za analizu povezanost koncentracija 25-hidroksivitamina D3 između majki i njihove novorođene djece korišten je Pearsonov test korelacije.

Multipla linearna regresija korištena je za analizu korelacija između kombinacija genotipova, serumskih koncentracija 25-hidroksivitamina D3 i kliničkih karakteristika u različitim skupinama ispitanika. Svi korišteni testovi bili su dvosmjerni, a P vrijednost od 5 % ili manja smatrala se statistički značajnom.

Osim toga, razlike u koncentracijama 25-hidroksivitamina D3 između različitih genotipova testirane su jednosmjernom ANOVOM.

Razina statističke značajnosti za sve analize procijenjena je na $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Epidemiološke značajke ispitanika

Od ukupno 162 ispitanica s ISPP-om, 118 (72,8 %) su bile slovenske sudionice, a 44 (27,2 %) hrvatske sudionice, u kontrolnoj skupini 119 (73,0 %) su bile slovenske sudionice, dok su 44 (27,0 %) bile hrvatske sudionice. Svi ispitanici u skupini novorođenčadi, uključujući skupinu prijevremeno rođene i terminski rođene djece (44 djece u svakoj skupini, 100 %), pripadali su hrvatskim sudionicima.

Epidemiološke značajke sudionica te njihove novorođenčadi prikazane su u Tablici 5. Prosječna dob majki u skupini s ISPP-om iznosila je $30,3 \pm 5,1$ godina, dok je u kontrolnoj skupini bila $30,6 \pm 4,3$ godine. Razlika srednjih vrijednosti dobi između skupina iznosila je 0,3 godine i nije bila statistički značajna ($P = 0,561$). Najmlađa ispitanica s ISPP-om imala je 17 godina, dok je u kontrolnoj skupini najmlađa sudionica imala 20 godina. Najstarija ispitanica s ISPP-om imala je 43 godine, a u kontrolnoj skupini 42 godine. Kada podijelimo dob sudionica u 5 podskupina: mlađe od 25, od 26 do 30 godina, od 31 do 35 godina, od 36 do 40 godina te starije od 41 godinu dobivamo sljedeće rezultate za ispitivanu skupinu: 18 (12,1 %), 55 (36,9 %), 50 (33,5 %), 21 (14,1 %), 5 (3,4 %) te u skupini kontrola 7 (6,5 %), 46 (42,6 %), 40 (37,0 %), 12 (11,1 %), 3 (2,8 %) ($\chi^2 = 3,25$, $P = 0,517$).

Distribucija PP-a prema trajanju gestacije bila je u skladu s prethodno objavljenim podacima [8]: kasni prijevremeni porod bio je zastupljen s udjelom od 83,2 %, srednje rani s 9,7 %, a rani sa 7,1 %.

U pogledu konzumacije duhanskih proizvoda, 27,4 % ispitanice iz skupine s ISPP-om navelo je izloženost duhanskom dimu tijekom trudnoće, u usporedbi s 15,2 % u kontrolnoj skupini. Nasuprot tome, 72,6 % ispitanica u skupini s ISPP-om i 84,8 % u kontrolnoj skupini izjavilo je da ne konzumira duhanske proizvode. Ova razlika bila je statistički značajna ($P = 0,018$).

Osobna anamneza barem jednog prethodnog PP-a zabilježena je kod 10,8 % ispitanica te kod niti jedne sudionice u kontrolnoj skupini.

Obiteljska anamneza PP-a (majka, sestra) prisutna je kod 28,6 % ispitanica, dok u kontrolnoj skupini nitko nije naveo pozitivni obiteljski status.

Medijan porođajne mase prijevremeno rođene djece iznosio je 2490 g (interkvartilni raspon: 2060 - 2850 g), a terminski rođene djece 3477 g (interkvartilni raspon: 3185 - 3665 g). Podijelom porođajne mase novorođenčadi u podskupine izrazito niske porođajne mase < 1000 g, jako niske porođajne mase 1000 - 1499 g, niske porođajne mase 1500 - 2499 g, normalne

porođajne mase 2499 - 3999 g te visoke porođajne mase > 4000 g dobivamo sljedeće rezultate za grupu pacijenata 7 (4,5 %), 8 (5,1 %), 65 (41,4 %), 77 (49,0 %), 0 (0,0 %). Za kontrolnu grupu rezultati su: 0 (0,0 %), 0 (0,0 %), 2 (1.8 %), 102 (91,1 %), 8 (7.1 %) ($\chi^2 = 80,45$, $P < 0,001$).

Tablica 5. Odabrane epidemiološke značajke ispitanika (N=162) i kontrola (N=163) slovenske i hrvatske populacije

ZNAČAJKE MAJKI	Ispitanice s ISPP-om	Kontrole		
Starosna dob pri porodu (godine)	AS ± SD		Razlika srednjih vrijednosti (95% CI)	P
	30,3 ± 5,1	30,6 ± 4,3	0,30 (-1,69 - 2,29)	0,764
	N (%)		χ ²	P
Gestacijska dob (tjedni)				
<28	12 (7,1)	0		
28-31	16 (9,7)	0		
32-36	134 (83,2)	0		
37-41	0	163 (100)		
Konzumacija duhanskih proizvoda				
Da	43 (27,4)	17 (15,2)	5,62	0,018
Ne	114 (72,6)	95 (84,8)		
Prethodni PP				
Da	17 (10,8)	0	18,58	< 0,001
Ne	140 (89,2)	163 (100)		
Obiteljski PP				
Da	44 (28,6)	0	54,08	< 0,001
Ne	110 (71,4)	163 (100)		
ZNAČAJKE NOVOROĐENČADI	Prijevremeno rođena djeca	Kontrole		
Porodajna masa (g)	Medijan (IKR)		Razlika medijana	P
	2490 (2060 - 2850)	3477 (3185 - 3665)	987	< 0,001

ISPP - idiopatski spontani prijevremeni porod, PP - prijevremeni porod, IKR - interkvartilni raspon,

AS - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, CI - interval pouzdanosti (*engl; Confidence Interval*), P - p-vrijednost statističke značajnosti, g - grami, Korištena statistička analiza: Studentov t-test za nezavisne uzorke; Pearsonov hi-kvadrat test; Mann-Whitney U test

Za hrvatske sudionice bili su dostupni i sljedeći epidemiološki podaci prikazani u Tablici 6.

Iako je prosječna vrijednost BMI-a u obje skupine bila unutar granica normalnog, skupina s ISPP-om je imala prosječan BMI $23,9 \pm 3,9$ kg/m², dok je u kontrolnoj skupini iznosio $22,4 \pm 3,1$ kg/m². Razlika srednjih vrijednosti BMI-a između skupina bila je 1,5 kg/m² i bila je statistički značajna ($P = 0,048$).

Nije bilo statistički značajne razlike u stručnoj spremi između skupine s ISPP-om i kontrola ($\chi^2 = 4,54$, $P = 0,209$).

Niti jedna ispitanica u skupini s ISPP-om i kontrolnoj skupini nije navela konzumaciju alkohola tijekom trudnoće.

Suplementaciju vitaminom D tijekom trudnoće navelo je 59,1 % ispitanica s ISPP-om te 68,2 % u kontrolnoj skupini ($\chi^2 = 0,79$, $P = 0,375$).

Broj poroda nije se značajno razlikovao između skupine s ISPP-om i kontrolne skupine ($\chi^2 = 4,27$, $P = 0,371$).

Nekontroliranu trudnoću (definiranu kao manje od jednog antenatalnog pregleda tijekom trudnoće) imale su dvije ispitanice u skupini s ISPP-om te jedna u kontrolnoj skupini. Nije utvrđena statistički značajna razlika među skupinama niti u broju antenatalnih pregleda ($\chi^2 = 0,58$; $P = 0,747$) ni u razini obrazovanja ($\chi^2 = 4,54$, $P = 0,209$).

Medijan porođajne dužine iznosio je 46,5 cm (interkvartilni raspon: 33 - 52 cm) za prijevremeno rođenu djecu te 51,5 cm (interkvartilni raspon: 47 - 57 cm) za djecu terminski rođenu djecu ($P < 0,001$).

Procjena vitalnih funkcija novorođenčadi po porodu ocjenjuje se Apgar indeksom u 1. i u 5. minuti života. Vrijednosti Apgar indeksa u 1. i u 5. minuti bile su statistički značajno različite između prijevremeno rođene novorođenčadi i kontrolne skupine ($P < 0,001$) što je i očekivano obzirom na razliku u gestacijskoj dobi.

**Tablica 6. Odabrane epidemiološke značajke ispitanika (N = 44) i kontrola (N = 44)
hrvatske populacije**

ZNAČAJKE MAJKI	Ispitanice s ISPP-om	Kontrole		
Indeks tjelesne mase prije trudnoće (kg/m²)	AS ± SD		Razlika srednjih vrijednosti (95 % CI)	P
	23,9 ± 3,9	22,4 ± 3,1	1,5 (0,01 - 2,99)	0,048
	N (%)		χ²	P
Stručna sprema				
Niska stručna sprema	3 (6,82)	0	4,54	0,209
Srednja stručna sprema	19 (43,18)	23 (52,27)		
Viša stručna sprema	9 (20,45)	12 (27,27)		
Visoka stručna sprema	13 (29,55)	9 (20,45)		
Suplementacija vitaminom D				
Da	26 (59,1)	30 (68,2)	0,79	0,375
Ne	18 (40,9)	14 (31,8)		
Broj poroda				
1	20 (45,4)	17 (38,6)	4,27	0,371
2	19 (43,2)	20 (45,5)		
3	2 (4,6)	6 (13,6)		
> 3	3 (6,8)	1(2,3)		
Broj pregleda u trudnoći				
> 6	39 (88,64)	41 (93,18)	0,58	0,747
1 - 6	3 (6,82)	2 (4,55)		
< 1	2 (4,55)	1 (2,27)		
ZNAČAJKE NOVOROĐENČADI	Prijevremeno rođena djeca	Kontrole		
Porodajna dužina (cm)	Medijan (IKR)		Razlika medijana	P
	46,5 (33 - 52)	51,5 (47 - 57)	5	< 0,001
Spol	N (%)		χ²	P
Muško	27 (61,4)	16 (36,4)	4,55	0,033
Žensko	17 (38,6)	28 (63,6)		

API u 1. minuti				
10	22 (50,0)	42 (95,4)	23,39	< 0,001
9	12 (27,3)	2 (4,6)		
8	4 (9,1)	0 (0)		
7	2 (4,5)	0 (0)		
6	1 (2,3)	0 (0)		
5	3 (6,8)	0 (0)		
API u 5. minuti				
10	25 (56,8)	44 (100)	24,23	< 0,001
9	11 (25,0)	0 (0)		
8	2 (4,6)	0 (0)		
7	3 (6,8)	0 (0)		
6	2 (4,6)	0 (0)		
5	1 (2,2)	0 (0)		

ISPP - idiopatski spontani prijevremeni porod, AS - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija,

IKR - interkvartilni raspon, CI - interval pouzdanosti (*engl; Confidence Interval*), P - p-vrijednost statističke značajnosti (*engl; P-value*), API - Apgar indeks, Korištena statistička analiza: Studentov t-test za nezavisne uzorke; Pearsonov hi-kvadrat test; Mann-Whitney U test

4.2. Analiza genetičke povezanosti

4.2.1. Učestalost polimorfizama u genu za vitamin D receptor

4.2.1.1 Analiza pojedinačnih polimorfizam

Kod majki analizirano je svih pet polimorfizama VDR gena: FokI (rs2228570), ApaI (rs7975232), Cdx2 (rs11568820), BsmI (rs1544410) i TaqI (rs731236). Polimorfizmi FokI (rs2228570), ApaI (rs7975232), Cdx2 (rs11568820) VDR gena analizirani su na uzorcima genomske DNA svih ispitanica s ISPP-om (N=162) i kontrola (N=163), dok su polimorfizmi BsmI (rs1544410) i TaqI (rs731236) VDR gena analizirani na 118 ispitanica s ISPP-om i 119 kontrola.

U novorođenčadi su u analizu uključeni FokI (rs2228570), ApaI (rs7975232) i Cdx2 (rs11568820) polimorfizmi VDR gena, koji su ispitani na uzorcima genomske DNA 44 prijevremeno rođene i 44 terminski rođene djece. U analizu uzoraka novorođenčadi nisu bili

uključeni polimorfizami BsmI (rs1544410) i TaqI (rs731236) *VDR* gena jer FokI (rs2228570), ApaI (rs7975232) i Cdx2 (rs11568820) polimorfizmi *VDR* gena imaju veću funkcionalnu važnost, budući da izravno utječu na ekspresiju i aktivnost *VDR* proteina te razine 25-hidroksivitamina D3, što može biti povezano s predispozicijom za PP. Nasuprot tome, polimorfizmi BsmI (rs1544410) i TaqI (rs731236) *VDR* gena smješteni su u nekodirajućim regijama i uglavnom djeluju posredno, zbog čega njihova analiza kod novorođenčadi nije učinjena.

Učestalost genotipova i alela polimorfizama *VDR* gena u ispitanica s ISPP-om i kontrolnoj skupini prikazana je u Tablicama 7 - 10. Raspodjela genotipskih frekvencija za sve analizirane polimorfizme *VDR* gena bila je u skladu s očekivanjima prema Hardy-Weinbergovoj ravnoteži u obje ispitivane skupine ($P > 0,05$). Statistička snaga bila je dovoljna za otkrivanje 1,5 puta povećane učestalosti T alela FokI (rs2228570), G alela ApaI (rs7975232), A alela BsmI (rs1544410), A alela Cdx2 (rs11568820) i C alela TaqI (rs731236) polimorfizama (rezultati nisu prikazani) [128].

Analizom učestalosti genotipova i alela nije utvrđena statistički značajna razlika između skupine ispitanica s ISPP-om i kontrolne skupine niti za jedan polimorfizam *VDR* gena ($P > 0,05$).

Tablica 7. Učestalost genotipova i alela FokI rs2228570, ApaI rs7975232, Cdx2 rs1156882 polimorfizama VDR gena u ispitanica s ISPP-om (N = 162) i kontrola (N = 163) hrvatske i slovenske populacije

			Ispitanice s ISPP-om / N (%)	Kontrole / N (%)	χ^2	P	OR (95 % CI)	P
FokI rs2228570	Genotip	CC	58 (35,8)	50 (30,7)	2,91	0,233	referentni	
		CT	78 (48,2)	94 (57,7)			0,72 (0,44 - 1,16)	0,173
		TT	26 (16,0)	19 (11,6)			1,18 (0,58 - 2,38)	0,645
	Alel	C	194 (59,9)	194 (40,5)	0,01	0,938	referentni	
		T	130 (40,1)	132 (40,1)			0,99 (0,72 - 1,35)	0,938
ApaI rs7975232	Genotip	TG	89 (54,9)	94 (57,7)	0,26	0,877	referentni	
		GG	39 (24,1)	36 (22,1)			1,14 (0,67 - 1,95)	0,623
		TT	34 (21,0)	33 (20,2)			1,09 (0,62 - 1,91)	0,763
	Alel	T	157 (48,5)	160 (49,1)	0,03	0,875	referentni	
		G	167 (51,5)	166 (50,9)			1,02 (0,75 - 1,39)	0,875
Cdx2 rs1156882	Genotip	GG	107 (66,0)	106 (65,0)	0,07	0,967	referentni	
		AG	45 (27,8)	46 (28,2)			0,97 (0,59 - 1,58)	0,903
		AA	10 (6,2)	11 (6,8)			0,90 (0,37 - 2,21)	0,819
	Alel	G	259 (79,9)	258 (79,1)	0,05	0,816	referentni	
		A	65 (20,1)	68 (20,9)			0,95 (0,65 - 1,39)	0,801

ISPP - idiopatski spontani prijevremeni porod, χ^2 - hi-kvadrat test (engl; *Chi-square test*), OR omjer izgleda (engl. Odds Ratio), CI interval pouzdanosti (engl. Confidence interval), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test, OR (95 % CI) izračunat logističkom regresijom

Tablica 8. Učestalost genotipova i alela FokI rs2228570, ApaI rs7975232, Cdx2 rs1156882 polimorfizama VDR gena u ispitanica s ISPP-om (N = 118) i kontrola (N = 119) slovenske populacije

			Ispitanice s ISPP-om / N (%)	Kontrole / N (%)	χ^2	P	OR (95 % CI)	P
FokI rs2228570	Genotip	CC	41 (34,7)	36 (30,2)	1,23	0,540	referentni	
		CT	59 (50)	68 (57,1)			1,31 (0,74 - 1,34)	0,347
		TT	18 (15,2)	15 (12,6)			1,95 (0,42 - 2,15)	0,900
	Alel	C	141 (59,7)	140 (58,8)	0,01	0,912	referentni	
		T	95 (40,3)	98 (41,2)			1,04 (0,72 - 1,50)	0,838
ApaI rs7975232	Genotip	TG	63 (53,4)	63 (52,9)	0,44	0,803	referentni	
		GG	30 (25,4)	34 (28,6)			1,13 (0,62 - 2,07)	0,684
		TT	25 (21,2)	22 (18,5)			0,88 (0,45 - 1,72)	0,709
	Alel	T	113 (47,9)	107 (45,0)	2,03	0,155	referentni	
		G	123 (52,1)	131 (55,0)			0,77 (0,54 - 1,08)	0,131
Cdx2 rs1156882	Genotip	GG	80 (67,8)	84 (70,6)	0,61	0,737	referentni	
		AG	33 (27,9)	32 (23,9)			1,92 (0,52 - 1,64)	0,786
		AA	5 (4,2)	3(2,5)			0,57 (0,13 - 2,47)	0,454
	Alel	G	193 (81,8)	200 (84,0)	0,28	0,596	referentni	
		A	43 (18,2)	38 (15,9)			0,85 (0,53 - 1,38)	0,515

ISPP - idiopatski spontani prijevremeni porod , χ^2 - hi-kvadrat test (engl; *Chi-square test*), , OR omjer izgleda (engl. Odds Ratio), CI interval pouzdanosti (engl. Confidence interval), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test, OR (95 % CI) izračunat logističkom regresijom

Tablica 9. Učestalost genotipova i alela BsmI rs1544410 i Taq rs731236 polimorfizama VDR gena u ispitanica s ISPP-om (N = 118) i kontrola (N = 119) slovenske populacije

			Ispitanice s ISPP-om N (%)	Kontrole N (%)	χ^2	P	OR (95 % CI)	P
BsmI rs1544410	Genotip	GG	47 (39,8)	45 (37,8)	0,41	0,813	referentni	
		AG	58 (49,1)	63 (52,0)			1,13 (0,66 - 1,95)	0,788
		AA	13 (11,0)	11 (9,2)			0,88 (0,36 - 2,17)	0,648
	Alel	A	84 (35,6)	85 (35,3)	0,00	0,955	referentni	
		G	152 (64,4)	153 (64,3)			1,00 (0,68-1,45)	0,978
Taq rs731236	Genotip	TT	53 (44,9)	56 (47,0)	0,84	0,655	referentni	
		CT	52 (44,0)	54 (45,4)			0,98 (0,57 - 1,68)	0,949
		CC	13 (11,0)	9 (7,6)			0,65 (0,26 - 1,66)	0,370
	Alel	T	158 (66,9)	166 (69,7)	0,31	0,578	referentni	
		C	78 (33,0)	72 (30,2)			0,88 (0,60 - 1,29)	0,512

ISPP - idiopatski spontani prijevremeni porod, χ^2 -hi-kvadrat test (engl; *Chi-square test*), OR omjer izgleda (engl. Odds Ratio), CI interval pouzdanosti (engl. Confidence interval), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test, OR (95 % CI) izračunat logističkom regresijom

Tablica 10. Učestalost genotipova i alela FokI rs2228570, ApaI rs7975232, Cdx2 rs1156882 polimorfizama VDR gena u ispitanica s ISPP-om (N = 44) i kontrola (N = 44) hrvatske populacije

0			Ispitanice s ISPP-om N (%)	Kontrole N (%)	χ^2	P	OR (95 % CI)	P
FokI rs2228570	Genotip	CC	17 (38,6)	14 (31,8)	2,28	0,319	referentni	
		CT	19 (43,2)	26 (59,1)			0,60 (0,24 - 1,51)	0,277
		TT	8 (18,2)	4 (9,1)			1,65 (0,41 - 6,65)	0,481
	Alel	C	53 (60,2)	54 (61,4)	0,21	0,647	referentni	
		T	35 (39,8)	34 (38,6)			1,05 (0,57 - 1,92)	0,879
ApaI rs7975232	Genotip	GG	9 (20,5)	2 (4,5)	1,17	0,558	referentni	
		TG	26 (59,0)	31 (70,5)			0,19 (0,04 - 0,94)	0,041
		TT	9 (20,5)	11 (25,0)			0,18 (0,03 - 1,07)	0,059
	Alel	G	44 (50,0)	35 (39,8)	1,02	0,879	referentni	
		T	44 (50,0)	53 (60,2)			0,66 (0,36 - 1,20)	0,174
Cdx2 rs1156882	Genotip	GG	27 (61,4)	22 (50,0)	1,36	0,507	referentni	
		AG	12 (27,3)	14 (31,8)			0,70 (0,27 - 1,81)	0,460
		AA	5 (11,3)	8 (18,2)			0,51 (0,15 - 1,78)	0,290
	Alel	A	22 (25,0)	30 (34,1)	1,75	0,186	referentni	
		G	66 (75,0)	58 (65,9)			1,55 (0,81 - 2,98)	0,190

ISPP - idiopatski spontani prijevremeni porod, χ^2 - hi-kvadrat test (engl; *Chi-square test*), OR omjer izgleda (engl. Odds Ratio), CI interval pouzdanosti (engl. Confidence interval), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test, OR (95 % CI) izračunat logističkom regresijom

Učestalost genotipova i alela FokI rs2228570, ApaI rs7975232, Cdx2 rs1156882 polimorfizama *VDR* gena u novorođenčadi rođenoj prijevremeno ($N = 44$) i kontrolnoj skupini novorođenčadi ($N = 44$) prikazana je u Tablici 11. Analizom raspodjele genotipova i alela FokI i ApaI polimorfizama *VDR* gena nije utvrđena statistički značajna razlika između skupine prijevremeno rođene djece i kontrolne skupine ($P > 0,05$) te nije potvrđena povezanost navedenih varijanti s povećanim rizikom za ISPP. Suprotno tome, za *VDR* Cdx2 polimorfizam (rs11568820) dokazana je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između dviju skupina. Genotip GG i alel G bili su značajno češći u skupini prijevremeno rođene djece u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P < 0,001$). Analiza omjera izgleda (OR) pokazala je da je prisutnost G alela povezana s 3,63 puta većim rizikom za ISPP (OR = 3,63, 95 % CI = 1,88 - 7,01, $P < 0,001$).

Tablica 11. Učestalost genotipova i alela FokI rs2228570, ApaI rs7975232, Cdx2 rs1156882 polimorfizama VDR gena u prijevremeno rođene djece (N = 44) i kontrola (N = 44) hrvatske populacije

			Prijevremeno rođena djeca N (%)	Kontrole N (%)	χ^2	P	OR (95 % CI)	P
FokI rs2228570	Genotip	CT	16 (36,4)	23 (52,3)	2,28	0,320	referentni	
		CC	18 (40,9)	13 (29,5)			1,99 (0,77 - 5,18)	0,158
		TT	10 (22,7)	8 (18,2)			1,80 (0,58 - 5,56)	0,308
	Alel	C	52 (59,1)	49 (55,7)	0,21	0,647	referentni	
		T	36 (40,9)	39 (44,3)			0,87 (0,48 - 1,58)	0,647
ApaI rs7975232	Genotip	GG	9 (20,5)	11 (25,0)	1,17	0,558	referentni	
		TG	21 (47,7)	16 (36,4)			1,60 (0,54 - 4,78)	0,400
		TT	14 (31,8)	17 (38,6)			1,01 (0,33 - 3,12)	0,987
	Alel	T	49 (55,7)	50 (56,8)	0,02	0,977	referentni	
		G	39 (44,3)	38 (43,2)			1,05 (0,58 - 1,91)	0,874
Cdx2 rs1156882	Genotip	AG	19 (43,2)	24 (54,6)	17,0 1	< 0,001	referentni	
		GG	25 (56,8)	10 (22,7)			3,16 (1,22 - 8,17)	0,017
		AA	0 (0,0)	10 (22,7)			0,0 (0,00 - 1,09)	0,057
	Alel	G	69 (78,4)	44 (50,0)	15,4 5	< 0,001	referentni	
		A	19 (21,6)	44 (50,0)			0,28 (0,14 - 0,53)	< 0,001

χ^2 - hi-kvadrat test (engl; *Chi-square test*), OR omjer izgleda (engl. Odds Ratio) CI interval pouzdanosti (engl. Confidence interval), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*),

Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test, OR (95 % CI) izračunat logističkom regresijom

4.2.1.2 Analiza kombinacije polimorfizama

Dodatno su analizirane kombinacije genotipova te je između skupine ispitanica s ISPP-om i kontrolne skupine dokazana statistički značajna razlika u raspodjeli učestalosti kombinacija genotipova VDR FokI rs2228570 i ApaI rs7975232 ($P = 0,049$, $P = 0,035$), iako su P vrijednosti blizu graničnoj (Tablica 12). Ostale kombinacije genotipova polimorfizma VDR gena nisu se statistički značajno razlikovale između skupina ($P > 0,05$) (Tablice 13-14).

Tablica 12. Učestalost kombinacija genotipova FokI rs2228570 i ApaI rs7975232 polimorfizama VDR gena u ispitanica s ISPP-om (N = 162) i kontrola (N = 163)

VDR FokI rs2228570	VDR ApaI rs7975232				
Genotip		Ispitanice s ISPP-om N (%)	Kontrole N (%)	OR (95 % CI)	P
CC	GG	17 (29,3)	8 (16,0)	referenca	-
CC	TG	27 (46,6)	34 (68,0)	0,37 (0,14 - 0,99)	0,049
CC	TT	14 (24,1)	8 (16,0)	0,82 (0,24 - 2,75)	0,753
CT	GG	14 (18,0)	21 (22,3)	0,31 (0,11 - 0,92)	0,035
CT	TG	48 (61,5)	53 (56,5)	0,43 (0,17 - 1,08)	0,071
CT	TT	16 (20,5)	20 (21,3)	0,38 (0,13 - 1,09)	0,073
TT	GG	8 (30,8)	7 (36,8)	0,54 (0,14 - 2,00)	0,356
TT	TG	14 (53,8)	7 (36,8)	0,94 (0,27 - 3,24)	0,923
TT	TT	4 (15,4)	5 (26,4)	0,38 (0,09 - 1,79)	0,220

ISPP - idiopatski spontani prijevremeni porod, VDR - vitamin D receptor,), OR omjer izgleda (engl.

Odds Ratio), CI interval pouzdanosti (engl. Confidence interval), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test; OR (95 % CI) izračunat logističkom regresijom

Tablica 13. Učestalost kombinacija genotipova Cdx2 rs1156882 i ApaI rs7975232 polimorfizama VDR gena u ispitanica s ISPP-om (N = 162) i kontrola (N = 163)

VDR Cdx2 rs1156882		VDR ApaI rs7975232			
Genotip		Ispitanice s ISPP-om N (%)	Kontrola N (%)	OR (95 % CI)	P
AA	GG	3 (30,0)	1 (9,1)	referenca	-
AA	TG	4 (40,0)	8 (72,7)	0,17 (0,01 - 2,16)	0,170
AA	TT	3 (30,0)	2 (10,1)	0,50 (0,03 - 8,95)	0,638
AG	GG	7 (15,6)	8 (17,4)	0,29 (0,02 - 3,48)	0,330
AG	TG	27 (60,0)	28 (60,9)	0,32 (0,03 - 3,28)	0,338
AG	TT	11 (24,4)	10 (21,7)	0,37 (0,03 - 4,12)	0,416
GG	GG	29 (27,1)	27 (25,5)	0,36 (0,04 - 3,65)	0,386
GG	TG	58 (54,2)	58 (54,7)	0,33 (0,03 - 3,30)	0,348
GG	TT	20 (18,7)	21 (19,8)	0,32 (0,03 - 3,31)	0,337

VDR - vitamin D receptor, OR omjer izgleda (engl. Odds Ratio), CI interval pouzdanosti (engl. Confidence interval), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test; OR (95 % CI) izračunat logističkom regresijom

Tablica 14. Učestalost kombinacija genotipova FokI rs2228570 i Cdx2 rs1156882 polimorfizama VDR gena u ispitanica s ISPP-om (N = 162) i kontrola (N = 163)

VDR FokI rs2228570		VDR Cdx2 rs1156882			
Genotip		Ispitanice s ISPP-om N (%)	Kontrole N (%)	OR (95 % CI)	P
CC	AA	6 (10,4)	3 (6,0)	referenca	-
CC	AG	18 (31,0)	18 (36,0)	0,50 (0,10 - 2,31)	0,375
CC	GG	34 (58,6)	29 (58,0)	0,5(0,13 - 2,55)	0,477
CT	AA	4 (5,1)	7 (7,5)	0,29(0,04 - 1,82)	0,185
CT	AG	20 (25,7)	25 (26,6)	0,40 (0,09 - 1,80)	0,233
CT	GG	54 (69,2)	62 (65,9)	0,43(0,10 - 1,82)	0,256
TT	AA	0 (0)	1 (5,3)	-	-
TT	AG	7 (26,9)	3 (15,8)	1,17(0,17 - 8,09)	0,876
TT	GG	19 (73,1)	15 (78,9)	0,63(0,13 - 2,96)	0,562

VDR - vitamin D receptor, OR omjer izgleda (engl. Odds Ratio), CI interval pouzdanosti (engl. Confidence interval), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test; OR (95 % CI) izračunat logističkom regresijom

Analizom kombinacija genotipova između skupine prijevremeno rođene djece i terminski rođene djece nije pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli učestalosti kombinacija genotipova (Tablice 15-17).

Tablica 15. Učestalost kombinacija genotipova FokI rs2228570 i ApaI rs7975232 polimorfizama VDR gena u prijevremeno rođene djece (N = 44) i kontrola (N = 44)

VDR FokI rs2228570		VDR ApaI rs7975232			
Genotip		Prijevremeno rođena djeca N (%)	Kontrole N (%)	OR (95 % CI)	P
CC	GG	4 (22,2)	4 (30,8)	referenca	-
CC	TG	7 (38,9)	4 (30,8)	1,75 (0,27 - 11,15)	0,554
CC	TT	7 (38,9)	5 (38,4)	1,40 (0,23 - 8,46)	0,714
CT	GG	3 (18,7)	6 (26,1)	0,50 (0,07 - 3,54)	0,488
CT	TG	7 (43,8)	10 (43,5)	0,70 (0,12 - 3,79)	0,679
CT	TT	6 (37,5)	7 (30,4)	0,85 (0,14 - 4,99)	0,864
TT	GG	2 (20,0)	1 (12,5)	2,00 (0,12 - 31,97)	0,624
TT	TG	7 (70,0)	2 (25,0)	3,50 (0,43 - 28,44)	0,241
TT	TT	1 (10,0)	5 (62,5)	0,20 (0,01 - 2,57)	0,217

VDR - vitamin D receptor, OR omjer izgleda (engl. Odds Ratio), CI interval pouzdanosti (engl. Confidence interval), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test; OR (95 % CI) izračunat logističkom regresijom

Tablica 16. Učestalost kombinacija genotipova ApaI rs7975232 i Cdx2 rs1156882 polimorfizama VDR gena u prijevremeno rođene djece (N = 44) i kontrola (N = 44)

VDR Cdx2 rs1156882		VDR ApaI rs7975232			
Genotip		Prijevremeno rođena djeca N (%)	Kontrole N (%)	OR (95 % CI)	P
AA	GG	0	3 (30,0)	referenca	-
AA	TG	0	3 (30,0)	-	-
AA	TT	0	4 (40,0)	-	-
AG	GG	5 (26,3)	6 (25,0)	0,52 (0,10 - 2,65)	0,433
AG	TG	8 (42,1)	10 (41,7)	0,50 (0,11 - 2,13)	0,350
AG	TT	6 (31,6)	8 (33,3)	0,46 (0,10 - 2,18)	0,335
GG	GG	4 (16,0)	2 (20,0)	1,25 (0,16 - 9,53)	0,830
GG	TG	13 (52,0)	3 (30,0)	2,70 (0,50 - 14,54)	0,245
GG	TT	8 (32,0)	5 (50,0)	-	-

VDR - vitamin D receptor, OR omjer izgleda (engl. Odds Ratio), CI interval pouzdanosti (engl. Confidence interval), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test; OR (95 % CI) izračunat logističkom regresijom

Tablica 17. Učestalost kombinacija genotipova Cdx2 rs1156882 i FokI rs2228570 polimorfizama VDR gena u prijevremeno rođene djece (N = 44) i kontrola (N = 44)

VDR Cdx2 rs1156882		VDR FokI rs2228570			
Genotip		Prijevremeno rođena djeca N (%)	Kontrole N (%)	OR (95 % CI)	P
AA	CC	0	4 (40,0)	referenca	-
AA	CT	0	4 (40,0)	-	-
AA	TT	0	2 (20,0)	-	-
AG	CC	7 (36,8)	7 (29,1)	-	-
AG	CT	9 (47,4)	13 (54,2)	-	-
AG	TT	3 (15,0)	4 (16,7)	0,21 (0,02 - 1,87)	0,164
GG	CC	11 (44,0)	2 (20,0)	1,57 (0,17 - 13,86)	0,684
GG	CT	7 (28,0)	6 (60,0)	0,33 (0,04 - 2,25)	0,260
GG	TT	7 (28,0)	2 (20,0)	-	-

VDR - vitamin D receptor, OR omjer izgleda (engl. Odds Ratio), CI interval pouzdanosti (engl. Confidence interval), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test; OR (95 % CI) izračunat logističkom regresijom

4.3. Povezanost polimorfizama VDR gena s kliničkim značajkama ispitanica i njihovih novorođenčadi

Ispitana je povezanost polimorfizama VDR gena s kliničkim značajkama ispitanica, uključujući porođajnu masu novorođenčeta, konzumiranje duhanskih proizvoda i obiteljski prisutan PP.

Analizirana je povezanost FokI rs2228570, ApaI rs7975232, Cdx2 rs1156882 polimorfizama VDR gena s porođajnom masom novorođenčadi u skupini ispitanica slovenske i hrvatske populacije. Rezultati su dokazali statistički značajan učinak FokI i ApaI polimorfizama na porođajnu masu novorođenčadi u skupini ispitanica s ISPP-om ($P = 0,007$, $P = 0,034$), dok takav učinak nije zabilježen u kontrolnoj skupini (Tablica 18).

Tablica 18. Povezanost FokI rs2228570, ApaI rs7975232 i Cdx2 rs1156882 polimorfizama VDR gena i porođajne mase novorođenčadi u skupini ispitanica s ISPP-om i kontrolnoj skupini slovenske i hrvatske populacije

Polimorfizmi	Skupina	F	P
FokI rs2228570	ISPP	5,17	0,007
	Kontrola	0,57	0,569
ApaI rs7975232	ISPP	3,48	0,034
	Kontrola	0,37	0,689
Cdx2 rs1156882	ISPP	2,12	0,347
	Kontrola	1,09	0,581

F - F-statistika iz ANOVA testa, P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: jednosmjerna analiza varijance (one-way ANOVA)

Dvofaktorska ANOVA pokazala značajnu interakciju između FokI rs2228570 i ApaI rs7975232 polimorfizma VDR gena ($P = 0,007$) (Tablica 19), post-hoc test pokazao je da su novorođenčad nositeljica FokI TT i ApaI TT genotipa imala najnižu porođajnu masu (Tablica 20).

Tablica 19. Povezanost FokI rs2228570 i ApaI rs7975232 polimorfizama VDR gena i porođajne mase novorođenčadi u skupini ispitanica s ISPP-om i kontrolnoj skupini

VDR polimorfizmi	F	P
FokI rs2228570	3,23	0,042
ApaI rs7975232	0,14	0,867
FokI xApaI	3,70	0,007

VDR - vitamin D receptor, F - F-statistika iz ANOVA testa, P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: dvofaktorska analiza varijance (two-way ANOVA)

Tablica 20. Post-hoc analiza kombinacije FokI rs2228570 i ApaI rs7975232 genotipova na porođajnu masu novorođenčadi u skupini s ISPP-om

FokI rs2228570	ApaI rs7975232	Prosječna porođajna masa (g)	Post-hoc usporedba	P
TT	TT	2009	referenca	
TT	GT	2050	vs TT + TT	0,025
TT	GG	2080	vs TT + TT	0,030
CT	TT	2205	vs TT + TT	0,040
CT	GT	2230	vs TT + TT	0,055
CT	GG	2250	vs TT + TT	0,060
CC	TT	2300	vs TT + TT	0,015
CC	GT	2330	vs TT + TT	0,020
CC	GG	2350	vs TT + TT	0,035

P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: post-hoc test za multiple usporedbe unutar dvofaktorske ANOVA

Analizom nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova i alela FokI rs2228570, Cdx2 rs11568820, ApaI rs7975232 polimorfizma *VDR* gena između ispitanica koje su u anamnezi imale prisutan obiteljski PP i onih koje ga nisu imale. Također, nije utvrđena statistički značajna razlika između pacijentica koje su tijekom trudnoće konzumirale duhanske proizvode u odnosu na one koje nisu činile (Tablice 21 i 22).

Tablica 21. Učestalost genotipova i alela FokI rs2228570, ApaI rs7975232 i Cdx2 rs11568820 polimorfizma VDR gena u ispitanica sa sporadičnim (N = 110) i obiteljskim prijevremenim porodom (N = 44)

			Sporadični PP N (%)	Obiteljski PP N (%)	χ^2	P
FokI rs2228570	Genotip	CC	37 (33,64)	19 (43,18)	1,24	0,538
		CT	55 (50,00)	19 (43,18)		
		TT	18 (16,36)	6 (13,64)		
	Alel	C	129 (58,64)	57 (64,77)	0,99	0,319
		T	91 (41,36)	31 (35,23)		
ApaI rs7975232	Genotip	GG	28 (25,45)	10 (22,73)	0,13	0,939
		TG	58 (52,73)	24 (54,55)		
		TT	24 (21,82)	10 (22,73)		
	Alel	G	114 (51,82)	44 (50,00)	0,08	0,773
		T	106 (48,18)	44 (50,00)		
Cdx2 rs11568820	Genotip	AA	7 (6,36)	3 (6,82)	0,09	0,958
		AG	30 (27,27)	11 (25,00)		
		GG	73 (66,36)	30 (68,18)		
	Alel	A	44 (20,00)	17 (19,32)	0,014	0,904
		G	176 (80,00)	71 (80,68)		

PP - prijevremeni porod, χ^2 - hi-kvadrat test (engl; *Chi-square test*), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test

Tablica 22. Učestalost genotipova i alela FokI rs2228570, ApaI rs7975232 i Cdx2 rs11568820 polimorfozma VDR gena u ispitanica prema statusu konzumacije duhanskih proizvoda, konzumirale su duhanske proizvode (N = 43), nisu konzumirale duhanske proizvode (N = 114)

			Nisu konzumirale duhanske proizvode N (%)	Konzumirale su duhanske proizvode N (%)	χ^2	P
FokI rs2228570	Genotip	CC	40 (35,09)	16 (37,21)	3,00	0,223
		CT	59 (51,75)	17 (39,53)		
		TT	15 (13,16)	10 (23,26)		
	Alel	C	139 (60,96)	49 (56,98)	0,43	0,511
		T	89 (39,04)	37 (43,02)		
ApaI rs7975232	Genotip	GG	30 (26,32)	8 (18,16)	1,22	0,544
		TG	59 (51,75)	26 (60,47)		
		TT	25 (21,93)	9 (20,93)		
	Alel	G	119 (52,19)	42 (48,84)	0,29	0,590
		T	109 (47,81)	44 (51,16)		
Cdx2 rs11568820	Genotip	AA	7 (6,14)	3 (6,98)	1,84	0,399
		AG	28 (24,56)	15 (34,88)		
		GG	79 (69,30)	25 (58,14)		
	Alel	A	42 (18,42)	21 (24,42)	1,41	0,235
		G	186 (81,58)	65 (75,58)		

χ^2 - hi-kvadrat test (engl; *Chi-square test*), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test

4.4. Biokemijska analiza serumskih koncentracija 25-hidroksivitamina D3

4.4.1. Analiza serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D3

U skupini hrvatskih sudionica, majke s ISPP-om (N = 44) i njihove prijevremeno rođene djece (N = 44) te majke s terminskim porodom (N = 44) i njihove terminske novorođenčadi (N = 44), određivana je i serumska koncentracija 25-hidroksivitamin D3. Veličina uzorka za biokemijsku analizu odabrana je i usklađena prema prethodno objavljenoj literaturi o istraživanju uloge serumskih koncentracija vitamina D u PP-u [129-134].

Tablica 23 prikazuje serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D3 u skupinama ispitanica s ISPP-om i kontrola. Nije bilo statistički značajnih razlika srednjih vrijednosti između ispitanica s ISPP-om i kontrolne skupine, niti između prijevremeno rođene i terminski rođene djece, iako su koncentracije 25-hidroksivitamina D3 kod prijevremeno rođenih bile niže nego kod terminske novorođenčadi (P = 0,383; P = 0,221).

Tablica 23. Koncentracije 25-hidroksivitamina D3 u serumu u skupini ispitanika i kontrolnoj skupini.

	Ispitanici (N = 44) (AS ± SD)	Kontrole (N = 44) (AS ± SD)	P
Majke	90,38 ± 41,75	82,36 ± 43,92	0,383
Djeca	48,31 ± 24,82	55,59 ± 30,32	0,221

ISPP - idiopatski spontani prijevremeni porod, AS - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: Studentov t-test za nezavisne uzorke

Kako bi se detaljnije procijenio status vitamina D, skupine majki i djeca su podijeljene u tri podskupine prema vrijednostima 25-hidroksivitamina D3; optimalne, odnosno zadovoljavajuće koncentracije ≥ 50 nmol/L (≥ 20 ng/mL), insuficijencija vitamina D kao koncentracija između 30 - 50 nmol/L (12 - 20 ng/mL), te deficijencija ili manjak vitamina D kao koncentracija < 30 nmol/L (< 12 ng/mL) (Tablice 24 i 25). Analiza distribucije majki i novorođenčadi u ovim kategorijama pokazala je da, unatoč različitim udjelima u pojedinim podskupinama, niti tada nije utvrđena statistički značajna razlika između majki s ISPP-om i

kontrolne skupine, kao ni između prijevremeno rođene i donošene novorođenčadi ($\chi^2 = 0,78$, $P = 0,676$, odnosno $\chi^2 = 2,86$, $P = 0,239$).

Tablica 24. Insuficijencija, deficijencija te optimalne vrijednosti 25-hidroksivitamina D3 u serumu u skupini ispitanica s ISPP-om (N = 44) i kontrolnoj skupini (N = 44)

Koncentracija 25-hidroksivitamina D3	Ispitanice s ISPP-om N (%)	Kontrole N (%)	χ^2	P
≥ 50 nmol/L	21 (47,7)	21 (47,7)	0,78	0,676
30 - 50 nmol/L	10 (22,7)	13 (29,6)		
< 30 nmol/L	13 (29,6)	10 (22,7)		

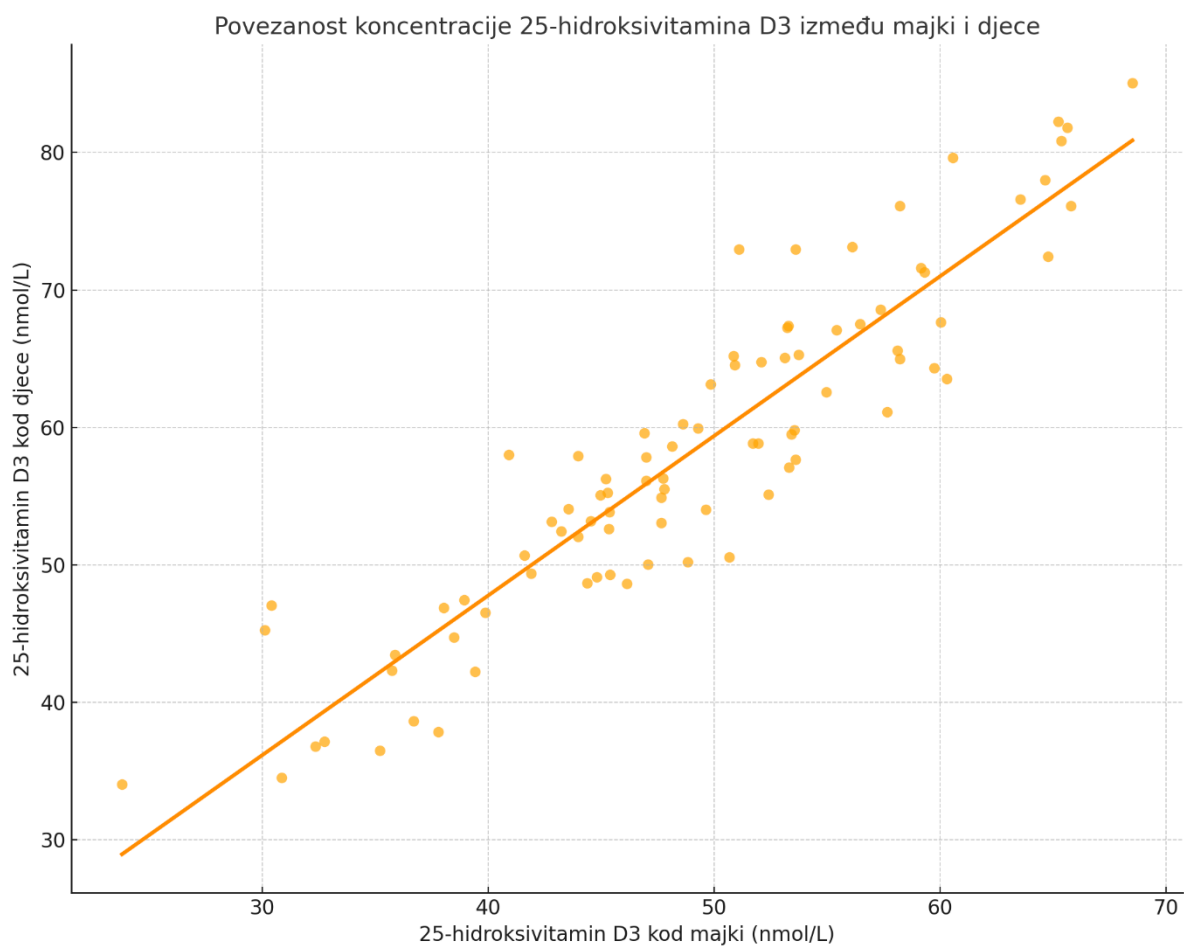
ISPP - idiopatski spontani prijevremeni porod, χ^2 - hi-kvadrat test (engl; *Chi-square test*), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test

Tablica 25. Insuficijencija, deficijencija te optimalne vrijednosti 25-hidroksivitamina D3 u serumu u skupini prijevremeno rođene djece (N = 44) i kontrolnoj skupini (N = 44)

Koncentracija 25-hidroksivitamina D3	Prijevremeno rođena djeca N (%)	Kontrole N (%)	χ^2	P
≥ 50 nmol/L	37 (84,1)	31 (70,5)	2,86	0,239
30 - 50 nmol/L	5 (11,4)	7 (15,9)		
< 30 nmol/L	2 (4,5)	6 (13,6)		

χ^2 - hi-kvadrat test (engl; *Chi-square test*), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test

Nadalje, dokazana je statistički značajna pozitivna korelacija koncentracija 25-hidroksivitamina D3 između majki i djece kako u skupini ispitanica s ISPP-om tako i u kontrolnoj skupini ($b = 0,771$, $P < 0,001$). Statičkom analizom te korištenim testom Pearsonove korelacije utvrđeno je kako su majke s višim koncentracijama serumskog 25-hidroksivitamina D3 rađale djecu s višim koncentracijama, dok su majke s nižim koncentracijama rađale djecu s nižim koncentracijama. Utvrđena korelacija je statistički značajna ($R^2 = 0,589$, $P < 0,001$) (Slika 5).



Slika 5. Povezanost koncentracija 25-hidroksivitamina D3 između majki i njihove novorođene djece

Korištena statistička analiza: Pearsonova korelacija ($R^2 = 0,589$, $P < 0,001$)

4.5. Povezanost polimorfizma VDR gena sa serumskim koncentracijama 25-hidroksivitamina D3

Analiza serumskih koncentracija 25-hidroksivitamina D3 prema genotipovima FokI (rs2228570), ApaI (rs7975232) i Cdx2 (rs11568820) polimorfizama VDR gena nije dokazala statistički značajnu povezanost navedenih polimorfizama VDR gena i serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D3 u ispitanica s ISPP-om. (FokI: $F = 0,19$, $P = 0,828$; ApaI: $F = 0,99$, $P = 0,381$; Cdx2: $F = 1,71$, $P = 0,193$). U kontrolnoj skupini majki s terminskim porodom značajna povezanost zabilježena je za Cdx2 (rs11568820) genotip ($F = 7,64$, $P = 0,001$) (Tablica 26).

Tablica 26. Usporedba serumskih koncentracija 25-hidroksivitamina D3 s FokI rs2228570, ApaI rs7975232 i Cdx2 rs11568820 polimorfizmima VDR gena kod ispitanica s ISPP-om (N=44) i kontrolne skupine (N=44)

VDR polimorfizmi	Skupina	F	P
FokI rs2228570	Ispitanice s ISPP-om	0,19	0,828
	Kontrole	1,25	0,298
ApaI rs7975232	Ispitanice s ISPP-om	0,99	0,381
	Kontrole	1,32	0,277
Cdx2 rs11568820	Ispitanice s ISPP-om	1,71	0,193
	Kontrole	7,64	0,001

F - F-statistika iz ANOVA testa, P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: jednosmjerna analiza varijance (one-way ANOVA)

Analiza serumskih koncentracija 25-hidroksivitamina D3 prema genotipovima FokI (rs2228570), ApaI (rs7975232) i Cdx2 (rs11568820) polimorfizama VDR gena kod djece nije dokazala statistički značajan povezanost ispitivanih polimorfizama s razinom 25-hidroksivitamina D3 (FokI: $\chi^2 = 0,776$, $P = 0,678$; ApaI: $\chi^2 = 1,448$, $P = 0,485$; Cdx2: $\chi^2 = 0,225$,

P = 0,636). U kontrolnoj skupini terminskih novorođenčadi značajna povezanost je zabilježena za Cdx2 (rs11568820) genotip ($\chi^2 = 7,097$, P = 0,029) (Tablica 27).

Tablica 27. Usporedba serumskih koncentracija 25-hidroksivitamina D3 s FokI rs2228570, ApaI rs7975232 i Cdx2 rs11568820 polimorfizmima VDR gena kod prijevremeno rođene djece (N=44) i kontrolne skupine (N=44)

VDR polimorfizmi	Skupina	χ^2	P
FokI rs2228570	Prijevremeno rođena djeca	0,776	0,678
	Kontrole	2,122	0,346
ApaI rs7975232	Prijevremeno rođena djeca	1,448	0,485
	Kontrole	1,276	0,528
Cdx2 rs11568820	Prijevremeno rođena djeca	0,225	0,636
	Kontrole	7,097	0,029

χ^2 - hi-kvadrat test (engl; *Chi-square test*), P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*),

Korištena statistička analiza: Pearsonov hi-kvadrat test

Analiza serumskih koncentracija 25-hidroksivitamina D3 i polimorfizama VDR gena nije dokazala statistički značajnu povezanost u skupini ispitanica s ISPP-om (F = 1,713; P = 0,193), dok je u kontrolnoj skupini majki AA genotip Cdx2 polimorfizam VDR gena bio povezan sa značajno višim koncentracijama 25-hidroksivitamina D3 (F = 7,639; P = 0,001) (Tablica 28).

U skupini prijevremeno rođene djece također nije dokazana statistički značajna razlika (F = 0,982; P = 0,327), dok je terminska novorođenčad s AA genotip Cdx2 imala značajno više koncentracije 25-hidroksivitamina D3 (F=4,200; P=0,022) (Tablica 29).

Tablica 28. Korelacija AA genotipa Cdx2 VDR gena sa serumskim koncentracijama 25-hidroksivitamina D3 u ispitanica s ISPP-om i kontrolnoj skupini

AA genotip Cdx2	F	P
Ispitanice s ISPP-om	1,713	0,193
Kontrole	7,639	0,001

F - F-statistika iz ANOVA testa, P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: jednosmjerna analiza varijance (one-way ANOVA)

Tablica 29. Korelacija AA genotipa Cdx2 VDR gena sa serumskim koncentracijama 25-hidroksivitamina D3 u prijevremeno rođene djece i kontrolnoj skupini

AA genotip Cdx2	F	P
Prijevremeno rođena djeca	0,982	0,327
Kontrole	4,200	0,022

F - F-statistika iz ANOVA testa, P - p-vrijednost statističke značajnosti (engl; *P-value*), Korištena statistička analiza: jednosmjerna analiza varijance (one-way ANOVA)

5. RASPRAVA

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi jesu li polimorfizmi gena za *VDR*, neadekvatna serumska koncentracija 25-hidroksivitamina D3 te pridruženi čimbenici (starosna dob, konzumacija duhanskih proizvoda, BMI, prethodni i/ili obiteljski PP, suplementacija D vitaminom) u majki i njihove novorođene djece, samostalno ili u kombinaciji, čimbenici predispozicije za ISPP.

Ovim istraživanjem prvi puta ispitan je utjecaj polimorfizama gena za *VDR* u majki i njihove novorođene djece unutar europske populacije, s ciljem utvrđivanja njihove moguće uloge u regulaciji ekspresije *VDR* gena i posljedično koncentracije vitamina D u serumu. Istraživanje je provedeno na dvije strogo odabrane skupine ispitanica: skupini majki s prijevremenim porodom nepoznatog uzroka te kontrolnoj skupini majki koje su rodile u terminu, prirodnim putem, nakon fiziološke trudnoće. Kao što je prethodno naglašeno, skupine su uparene radi smanjenja međusobne varijabilnosti na najmanju moguću mjeru.

Provedenim istraživanjem dobiveni su sljedeći glavni rezultati: u skupini prijevremeno rođene djece zabilježena je statistički značajno veća učestalost GG genotipa i G alela *Cdx2* (rs11568820) polimorfizma *VDR* gena. Nadalje, homozigotni TT genotipovi polimorfizama *VDR* gena, *FokI* i *ApaI*, u majki bili su statistički značajno povezani s porođajnom masom novorođenčadi. Također je utvrđena statistički značajna pozitivna korelacija koncentracija 25-hidroksivitamina D3 između majki i njihove novorođenčadi, dok je prisutnost GG genotipa *VDR* *Cdx2* polimorfizma bila povezana s nižim koncentracijama 25-hidroksivitamina D3 u kontrolnoj skupini, kako u majki tako i u djece.

5.1. Epidemiološke značajke ispitanica i kontrola

Dob majki nije se statistički značajno razlikovala između skupina. Ipak, najveća razlika uočena je u podskupini sudionica mlađih od 25 godina, pri čemu je u skupini ispitanica s ISPP-om iznosila 12,08 %, a u kontrolnoj skupini 6,48 %. Mlađe trudnice u pravilu imaju slabiju antenatalnu skrb zbog kombinacije individualnih i društveno - ekonomskih čimbenika [135]. U ovoj dobnoj skupini češće se radi o nekontroliranim trudnoćama, pri čemu je broj obavljenih pregleda u trudnoći često ispod preporučenog. Osim toga, mlađa dob majke povezana je s nepovoljnim socioekonomskim okolnostima, uključujući nižu razinu obrazovanja. Kombinacija ovih čimbenika rezultira smanjenom kvalitetom antenatalne skrbi i povećanim rizikom od komplikacija, uključujući prijevremeni porod.

Utvrđena je statistički značajna razlika u konzumaciji duhanskih proizvoda između skupine ispitanica s ISPP-om i kontrolne skupine ($P = 0,018$), pri čemu su žene koje su pušile imale 2,11 puta veće izgleda za SPP. Žene koje puše tijekom trudnoće imaju veću incidenciju SPP-a jer nikotin i toksične tvari iz duhanskog dima uzrokuju smanjen uteroplacentarni protok krvi i time ograničavaju opskrbu fetusa kisikom i hranjivim tvarima [136]. Pušenje također povećava oksidativni stres i upalni odgovor, što može potaknuti prijevremeno sazrijevanje cerviksa i kontrakcije maternice. Uz to, negativno utječe na funkciju posteljice i hormonalnu regulaciju poroda, čime dodatno povećava rizik od prijevremenog poroda. Prema gestacijskoj dobi raspodjela PP-a je bila je u skladu s prethodno objavljenim podacima odnosno kasni prijevremeni porod bio je zastupljen s najvećom udjelom (83,2 %). Ispitanice s ISPP-om imale su statistički značajno veću učestalost prijevremenog poroda u osobnoj anamnezi, kao i u obiteljskoj anamnezi (majka, sestra) ($P < 0,001$; $P < 0,001$), što je u skladu s ranijim istraživanjima koja potvrđuju genetičku predispoziciju kao važan čimbenik rizika za SPP [137]. Prijevremeno rođena novorođenčad imala su statistički značajno nižu porođajnu masu, manju porođajnu dužinu te niže vrijednosti Apgar indeksa u usporedbi s novorođenčadi iz kontrolne skupine, što je u skladu s očekivanim rezultatima, s obzirom na poznati utjecaj kraćeg trajanja trudnoće na rast i fiziološku prilagodbu novorođenčeta. Između skupine ispitanica s ISPP-om i kontrolne skupine utvrđena je statistički značajna razlika u BMI-ju ($P = 0,048$), pri čemu je svako povećanje BMI za 1 jedinicu povezano s 13,7 % višom vjerojatnošću za nastanak spontanog prijevremenog poroda. Nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitanica s ISPP-om i kontrolne skupine u razini obrazovanja, konzumaciji alkohola, suplementaciji vitaminom D, paritetu niti u broju antenatalnih pregleda.

5.2. Analiza polimorfizama VDR gena

Polimorfizmi ApaI (rs7975232), FokI (rs2228570), Cdx2 (rs11568820), BsmI (rs1544410) i TaqI (rs731236) VDR gena uključeni su u ovo istraživanje zbog njihove uloge u regulaciji ekspresije i funkcionalnosti VDR-a, čime mogu neizravno utjecati na ključne biološke procese povezane s trudnoćom. Polimorfizam FokI (rs2228570) smješten je na početku kodirajuće regije VDR gena i dovodi do promjene start kodona, rezultirajući kraćom ili duljom varijantom VDR proteina. Kraća varijanta ima pojačanu transkripcijsku aktivnost, što može utjecati na imunološke i protuupalne mehanizme važne u prevenciji prijevremenog poroda [138]. ApaI (rs7975232) smješten je se u intronu blizu 3' kraja i, iako ne mijenja strukturu proteina, može modulirati stabilnost mRNA te posljedično ekspresiju VDR-a, s

moogućim utjecajem na funkciju placente i maternice [121]. Cdx2 (rs11568820) lokaliziran je u promotorskoj regiji i utječe na vezanje transkripcijskog faktora CDX2, čime regulira ekspresiju VDR-a u posteljici i reproduktivnim tkivima. Njegova aktivnost može oblikovati lokalni odgovor na vitamin D, važan za implantaciju, imunosnu toleranciju i održavanje trudnoće. BsmI (rs1544410) nalazi se u intronu blizu 3' kraja VDR gena i ne mijenja sekvencu kodiranog proteina, ali može utjecati na stabilnost mRNA, čime modulira ekspresiju receptora za vitamin D. Smanjena ekspresija VDR-a može dovesti do poremećaja u imunološkoj regulaciji i protuupalnom djelovanju vitamina D, što može povećati rizik za prijevremeno otvaranje cerviksa i upalne procese u posteljici [139]. TaqI (rs731236) također je smješten u 3' regiji VDR gena i predstavlja tihi (silent) polimorfizam, koji ne mijenja aminokiselinski slijed proteina, ali može utjecati na posttranskripcijske procese i funkcionalnu dostupnost receptora. Ove promjene mogu narušiti signalizaciju vitamina D u decidui i miometriju, što se povezuje s povećanom osjetljivošću na upalne podražaje i potencijalnim razvojem spontanog prijevremenog poroda [140]. Ispitivanje navedenih polimorfizama omogućuje bolji uvid u moguću genetičku predispoziciju za ISPP te njihovu potencijalnu ulogu u njegovoj patogenezi.

U ovom istraživanju je po prvi puta analizirana učestalost genotipova i alela ApaI (rs7975232), FokI (rs2228570), Cdx2 (rs11568820), BsmI (rs1544410) i TaqI (rs731236) VDR gena, pojedinačno i u kombinacijama, u ispitanica s ISPP-om i njima pridruženim kontrolama u europskoj populaciji.

5.2.1. Pojedinačni polimorfizmi

Analizom učestalosti genotipova ApaI (rs7975232), FokI (rs2228570), Cdx2 (rs11568820), BsmI (rs1544410) i TaqI (rs731236) VDR gena nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova i alela između ispitanica s ISPP-om i kontrolne skupine. Za slovensku populaciju analizirano je svih pet polimorfizama, dok su za hrvatsku populaciju analizirani ApaI (rs7975232), FokI (rs2228570), Cdx2 (rs11568820) polimorfizmi. Nalaz je bio konzistentan i kada su populacije promatrane zajedno, kao i kada su analizirane odvojeno unutar hrvatske i slovenske podskupine, pri čemu ni u jednoj populaciji nije uočena statistički značajna razlika.

Također, nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova i alela ApaI (rs7975232), FokI (rs2228570) VDR gena između prijevremeno rođene djece i kontrolne skupine.

Međutim, zabilježena je statistički značajna razlika u učestalosti *VDR* Cdx2 genotipova i alela između prijevremeno rođene djece i kontrolne skupine. Konkretno, genotip GG i alel G za Cdx2 (rs11568820) bili su značajno učestaliji u skupini prijevremeno rođene djece ($P < 0,001$), što ukazuje na moguću genetsku predispoziciju za ISPP u hrvatskoj populaciji. Prisutnost G alela povezana je s 3,63 puta većim rizikom za ISPP (OR = 3,63, 95 % CI = 1,88 - 7,01, $P < 0,001$).

Cdx2 polimorfizam *VDR* gena istraživao je u brojnim bolestima, no rezultati različitih studija bili su nedosljedni [141,142]. U istraživanju provedenom na oboljelima od psorijaze, učestalost GG genotipa i G alela bila je značajno veća u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, što upućuje na moguću ulogu ovih genetskih varijanti u patogenezi autoimunih poremećaja [143]. Nadalje, rezultati meta-analiza i istraživanja u različitim populacijama sugeriraju višu zastupljenost GG genotipa i G alela među oboljelima od više vrsta karcinoma, uključujući karcinom želuca, rektuma, debelog crijeva, multipli mijelom i premenopauzalni karcinom dojke, iako statistička značajnost nije dosljedno potvrđena [144,145]. Ovi nalazi upućuju na to da GG genotip i G alel Cdx2 polimorfizma *VDR* gena mogu predstavljati zajednički genetski čimbenik rizika za prijevremeni porod te niz autoimunih, infektivnih i malignih bolesti.

Prethodna istraživanja sugeriraju da Cdx2 polimorfizam u *VDR* genu može biti povezan s reproduktivnim poremećajima. Studije su pokazale povećan rizik od neplodnosti, sindroma policističnih jajnika (PCOS; engl. Polycystic Ovary Syndrome) i spontanog pobačaja kod ispitanica s AA genotipom Cdx2 polimorfizma, koji je povezan s povećanom transkripcijskom aktivnošću *VDR* proteina [146].

Polimorfizam Cdx2 u promotorskoj regiji *VDR* gena može modulirati vezivanje transkripcijskih faktora i time utjecati na ekspresiju *VDR* receptora u tkivima ključnim za trudnoću, poput endometrija i posteljice. Smanjena ekspresija *VDR*-a može dovesti do oslabljene signalizacije vitamina D, što negativno utječe na imunološku regulaciju i upalne procese unutar maternice. Poremećaji imunološke homeostaze i povećana upala mogu potaknuti prerano sazrijevanje cerviksa i aktivaciju kontrakcija maternice. Time Cdx2 polimorfizam može indirektno povećati rizik od spontanog prijevremenog poroda. Osim toga, smanjena funkcija *VDR*-a može poremetiti transport hranjivih tvari i hormona kroz placentu, što dodatno ugrožava uspješan ishod trudnoće. Zbog toga nositeljice određenih Cdx2 genotipova mogu imati veću predispoziciju za reproduktivne komplikacije, uključujući prijevremeni porod.

5.2.2. Kombinacije polimorfizama

Broj studija koje su ispitivale povezanost polimorfizama *VDR* gena s prijevremenim porodom je ograničen. Rezultati su često kontradiktorni i variraju ovisno o populaciji, veličini uzorka te analiziranim SNP-ovima. Najčešće su proučavani FokI (rs2228570), ApaI (rs7975232), Cdx2 (rs11568820), BsmI (rs1544410) i TaqI (rs731236) polimorfizmi *VDR* gena no rezultati se razlikuju između različitih populacija i studija.

U istraživanju koje je obuhvatilo 33 majke s prijevremenim porodom i njihovu prijevremeno rođenu djecu, utvrđeno je da je C alel FokI SNP-a značajno češći, dok je T alel TaqI SNP-a rjeđi među majkama s prijevremenim porodom u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nije uočena razlika u učestalosti ovih polimorfizama u uzorcima djece. Na temelju ovih nalaza, autori zaključuju da FokI polimorfizam može predstavljati rizični čimbenik za PP [120].

U studiji provedenoj na europskoj populaciji nije uočena statistički značajna razlika u raspodjeli pojedinačnih genotipova ili alela (ApaI, TaqI, BsmI) između žena s prijevremenim porodom i kontrolne skupine. Međutim, određene kombinacije genotipova BsmI-ApaI-TaqI bile su značajno češće kod žena s prijevremenim porodom u odnosu na kontrole, što upućuje na to da kombinacija više polimorfizama može imati veći utjecaj na rizik od prijevremenog poroda nego pojedinačni SNP-ovi [122].

Suprotno tome, Rosenfield i suradnici pokazali su da majke homozigoti za *VDR* ApaI (AA) genotip imaju dvostruko veći rizik za prijevremeni porod u odnosu na heterozigote. Također, kod novorođenčadi je genotip Cdx2 pokazao značajnu razliku između prijevremeno rođene djece i kontrolne skupine [124].

U istraživanju provedenom na brazilskoj populaciji ispitivala se povezanost polimorfizama FokI (rs2228570 A>G) i Cdx-2 (rs11568820 T>C) u *VDR* genu s rizikom od SPP-a. T alel i TT genotip FokI polimorfizma bili su značajno češći u skupini žena s prijevremenim porodom u odnosu na kontrolnu skupinu. Osim toga, TT genotip bio je povezan i s GDM te korioamnionitisom. S druge strane, A alel i AA genotip Cdx2 polimorfizma bili su značajno češći u skupini s prijevremenim porodom. Oba polimorfizma ukazuju na povećan rizik za SPP [123].

U istraživanju provedenom na 187 parova majki i njihove prijevremeno rođene djece europskog podrijetla, utvrđeno je da je AA genotip FokI SNP-a u majki povezan s povećanim rizikom od prijevremenog poroda [121].

Razlike između našeg i drugih istraživanja za svih pet istraživanih SNP-ova mogu se pripisati nekoliko čimbenika. Prvo, populacije uključene u različita istraživanja razlikuju se po etničkoj i genetskoj pozadini, što može utjecati na učestalost alela i genotipova. Drugo, kriteriji selekcije sudionika u našem istraživanju bili su stroži, pri čemu su bile isključene trudnice s poznatim čimbenicima rizika i komorbiditetima, dok su druga istraživanja često obuhvaćala heterogenu populaciju. Treće, veličina uzorka i raspodjela ispitanika po skupinama također mogu utjecati na statističku značajnost rezultata. Sve ove razlike zajedno mogu objasniti odstupanja u rezultatima između našeg i prethodnih istraživanja.

5.3. Povezanost polimorfizama VDR gena s kliničkim značajkama ispitanica

Povezanost polimorfizama VDR gena s kliničkim značajkama ispitanica s ISPP-om i kontrolne skupine ispitana je za porođajnu masu novorođenčeta, konzumaciju duhanskih proizvoda te sporadični i obiteljski PP.

U ovoj studiji, u skupini ispitanica s ISPP-om, utvrđeno je da su homozigotni TT genotipovi FokI i ApaI polimorfizama VDR gena povezani s nižom porođajnom masom novorođenčadi.

Kompleksne molekularne i biološke interakcije između majke i fetusa nisu u potpunosti razjašnjene. Iako na porođajnu masu novorođenčeta utječu brojni čimbenici kao što su majčin nutritivni status, tjelesna masa prije trudnoće, pušenje, placentarna funkcija, kronične bolesti majke, najjači utjecaj imaju genetički čimbenici [147]. Vitaminska aktivnost vitamina D, koja ovisi o njegovom statusu u trudnoći i funkcionalnosti VDR receptora, ima ključnu ulogu u regulaciji fetalnog rasta. Iako je uloga vitamina D u ljudskom rastu i sazrijevanju kostiju dobro poznata, vitamin D ima i mnoge druge funkcije tijekom trudnoće, kao što su utjecaj na implantaciju, održavanje normalne trudnoće, potpora fetalnom rastu putem prijenosa kalcija, lučenje brojnih hormona posteljice te smanjenje proizvodnje proinflammatoryh citokina. VDR je medijator pleiotropnih učinaka vitamina D, a njegova smanjena ekspresija u posteljici povezana je s razvojem komplikacija tijekom trudnoće. [148,149]. Ekspresija VDR-a u

ljudskoj posteljici upućuje na to da vitamin D može lokalno utjecati na razvoj posteljice i fetusa, rast i diferencijaciju stanica, kao i na signalizaciju na spoju majke i fetusa [150].

Iako je utjecaj VDR SNP-ova na funkciju VDR proteina i signalizaciju još uvijek uglavnom nejasan, neki polimorfizmi utječu na razine vitamina D u krvi i njegovu biološku aktivnost [151]. Istraživanja sugeriraju da VDR genotip utječe na optimalnu koncentraciju vitamina D i smanjuje učestalost nepovoljnih perinatalnih ishoda [152,153].

FokI SNP smatra se neovisnim markerom u *VDR* genu jer ne pokazuje povezanost s drugim polimorfizmima unutar gena. To je T-C SNP s dvije varijante proteina: dugom (T alel) i kratkom formom VDR proteina (C alel). Varijacije u sekvenci proteina značajno utječu na funkciju proteina. Korištenjem stanične linije ljudskih fibroblasta pokazano je da FokI "f" izoforma (T alel) pokazuje manje aktivnu formu endogenog VDR [154]. T alel FokI polimorfizma kodira dužu, manje funkcionalnu formu VDR proteina. Kao posljedica smanjene funkcionalnosti receptora, vezanje vitamina D na ovaj receptor je slabije ili manje učinkovito, što može rezultirati oslabljenim prijenosom signala potrebnog za pravilno djelovanje vitamina D. Budući da vitamin D ima važnu ulogu u regulaciji fetalnog rasta, uključujući metabolizam kalcija i razvoj kostiju, smanjena aktivnost VDR-a može ograničiti njegove povoljne učinke. To može doprinijeti manjoj porođajnoj masi djece kod majki koje nose TT genotip (T alel) FokI polimorfizma. Budući da je u ovoj studiji TT genotip bio povezan s nižom porođajnom masom novorođenčeta, pretpostavljamo da je to genetska varijanta odgovorna za nižu porođajnu masu prijevremeno rođene djece.

Nekoliko studija istraživalo je povezanost majčinog FokI polimorfizma *VDR* gena i porođajne mase novorođenčadi. Suprotno našim rezultatima, u istraživanju Barchitta i sur. FokI A alel povezan s nižom porođajnom težinom [121]. Pretpostavljamo da razlike među ovim studijama mogu biti posljedica odabira pacijenata i kontrolne skupine, veličine uzorka, etničke pripadnosti, izloženosti Suncu i majčina životnog stila.

U studiji Karras i suradnika, FokI polimorfizma FF genotip bio povezan s većom duljinom trupa dok je neonatalni opseg abdomena bio je veći kod novorođenčadi s TT genotipom TaqI polimorfizma *VDR* gena i niskim serumskim koncentracijama vitamina D (< 50 nmol/L). Studija također potvrđuje da niže razine vitamina D u trudnoći dodatno negativno utječu na neonatalni rast, osobito u kombinaciji s određenim *VDR* genotipovima [152].

Iako Ustun i suradnici nisu izravno ispitivali porođajnu masu, njihove su studije pokazale da VDR polimorfizmi mogu utjecati na perinatalni razvoj, što može imati implikacije i na rast fetusa [155].

Ovi nalazi naglašavaju važnost genetske varijabilnosti u VDR genuna važnost genetske varijabilnosti u VDR genu, posebno FokI polimorfizma, u modulaciji utjecaja vitamina D tijekom trudnoće te posljedično na porođajnu masu djeteta.

Nadalje, neki autori primijetili su zanimljiv učinak fetalnog VDR genotipa kod trudnica s nižom koncentracijom vitamina D na antropometrijske mjere pri rođenju. Morley i suradnici su primijetili da su varijante sekvence u VDR genu novorođenčadi modificirale učinak majčine nedostatnosti vitamina D na veličinu novorođenčeta pri rođenju [156]. Niske koncentracije vitamina D bile su povezane s nižom težinom novorođenčeta samo među novorođenčadi homozigotnih za FokI glavni alel ili među heterozigotima.

Dosadašnja istraživanja pokazuju da ApaI polimorfizam VDR gena može biti povezan s povećanim rizikom od prijevremenog poroda, ali malo je podataka o njegovom izravnom utjecaju na porođajnu masu novorođenčadi kod žena s ISPP-om [124]. Nekoliko studija je analiziralo različite VDR polimorfizme, uključujući ApaI, u kontekstu prijevremenog poroda i neonatalnih karakteristika, ali nisu pronađene značajne razlike u porođajnoj masi povezane s ApaI varijantom.

Iako su neki radovi povezali ApaI polimorfizam s povećanim rizikom od prijevremenog poroda i komplikacija kod prijevremeno rođene djece, poput bronhopulmonalne displazije i nekrotizirajućeg enterokolitisa [157], nije utvrđena izravna veza između ApaI polimorfizma i porođajne mase. Polimorfizam ApaI VDR gena mogao bi imati značajan utjecaj na porođajnu masu novorođenčadi kod pacijentica s ISPP-om. Homozigotni TT genotip ApaI polimorfizma mogao bi dovesti do smanjene ekspresije vitamina D receptora u placenti, čime se ograničava dostupnost vitamina D za plod.

Funkcija drugih VDR SNP-ova – BsmI, TaqI i Cdx2 – manje je jasna. Javorski i suradnici su uočili povezanost između Cdx2 SNP-a i porođajne mase novorođenčadi [123]. Djeca majki heterozigota za ApaI također su imala nižu porođajnu težinu [158]. Swamy i suradnici su dokazali povezanost između nekih drugih SNP-ova u majčinom VDR genu i niže porođajne težine novorođenčadi kod ne-hispaničkih crnkinja [159]. Razlike između naših i

drugih studija za svih pet istraživanih SNP-ova mogle bi se pripisati razlikama u populaciji, kriterijima odabira sudionika i veličini uzorka.

Buduće studije trebale bi uzeti u obzir i čimbenike okoliša povezane s niskom porođajnom težinom, uključujući pušenje. Prethodna istraživanja su ukazala da dim cigarete smanjuje proizvodnju vitamina D, što bi moglo utjecati na razinu ekspresije VDR-a [160,161].

5.4. Analiza serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D3 i povezanost polimorfizma VDR gena sa serumskom koncentracijom 25-hidroksivitamina D3

Analizom serumske koncentracije 25-hidroksivitamina D3 nije potvrđena statistički značajna razlika ni između skupina majki ($P = 0,383$), ni između skupina novorođenčadi ($P = 0,221$). U našem istraživanju koncentracija 25-hidroksivitamina D3 kod prijevremeno rođene djece bila je niža u usporedbi s kontrolnom skupinom, iako ta razlika nije bila statistički značajna. Ipak, zabilježena je statistički značajna pozitivna korelacija u koncentracijama 25-hidroksivitamina D3 između majki i njihove djece ($b=0,771$, $P < 0,001$). Ovaj nalaz potvrđuje rezultate prethodnih istraživanja koja su također pokazala da serumskih koncentracije 25-hidroksivitamina D3 kod majke direktno odražavaju razine kod novorođenčadi [162]. Slična povezanost između majke i djeteta u koncentracijama 25-hidroksivitamina D3 dokumentirana je u različitim populacijama.

U našem istraživanju analizirali smo povezanost koncentracija 25-hidroksivitamina D3 u serumu i varijanti gena za VDR s rizikom od ISPP-a u hrvatskoj populaciji.

Prisustvo GG genotipa Cdx2 polimorfizma VDR gena dovodi do značajno nižih koncentracija 25-hidroksivitamina D3 u kontrolnim skupinama kako u žena, tako i u djece ($P=0,001$, odnosno $P=0,022$), no ne i u skupinama ispitanika s ISPP-om.

Uloga 25-hidroksivitamina D3 u ishodima trudnoće intenzivno se proučava tijekom posljednja dva desetljeća, osobito zbog njegove važne imunomodulatorne i antimikrobne uloge u interakciji između majke i fetusa. [29–31]. Koncentracija aktivnog oblika 25-hidroksivitamina D3 u cirkulaciji postupno se povećava tijekom trudnoće, dosežući pri porodu dvostruke do trostruke vrijednosti u usporedbi sa ženama koje nisu trudne. Koncentracija 25-hidroksivitamina D3 u fetusu u potpunosti ovisi o statusu majčine cirkulirajuće razine 25-hidroksivitamina D3, a nedostatne koncentracije kod trudnica mogu utjecati na ishode trudnoće

i zdravlje novorođenčeta [163]. Osim toga, cirkulirajuće razine 25-hidroksivitamina D₃ mogu biti pod utjecajem prisutnosti određenih varijanti *VDR* gena. *VDR* pripada superobitelji nuklearnih receptora i, kao transkripcijski faktor, važan je posrednik u metaboličkom putu 25-hidroksivitamina D₃. *VDR* potiče transkripciju ciljnih gena čiji proizvodi povećavaju apsorpciju kalcija, lučenje hormona, migraciju stanica, diferencijaciju i proliferaciju [33,34].

Utjecaj polimorfizama *VDR* gena na razine 25-hidroksivitamina D₃ u serumu još uvijek je predmet istraživanja, no brojna su istraživanja u drugim poremećajima pokazala da genetska struktura *VDR* gena utječe na koncentracije 25-hidroksivitamina D₃ u serumu [125,126]. Povezanost između polimorfizama *VDR* gena i koncentracija 25-hidroksivitamina D₃ u serumu proučavana je u različitim patološkim stanjima, uključujući vitiligo, degeneraciju lumbalnog diska i autizam. [164,165].

Cdx2 G alel je prethodno povezan s 30 % manjom transkripcijskom aktivnošću u usporedbi s A alelom [41], a naša studija dodatno je potvrdila da je Cdx2 GG genotip povezan s nižim koncentracijama 25-hidroksivitamina D₃ u kontrolnim skupinama i majki i djece, ali ne i u skupinama ispitanika. Slično našoj studiji, Gwenzi i suradnici ispitali su status 25-hidroksivitamina D₃ i Cdx2 genotip u karcinomu debelog crijeva [42]. Čak 65 % pacijenata imalo je GG genotip za Cdx2, a u njihovoj studiji razine seruma 25-hidroksivitamina D₃ nisu se razlikovale prema Cdx2 genotipu. Osim toga, kao i u našem istraživanju, Gwenzi i kolege nisu potvrdili da su AA i AG genotipovi za Cdx2 povezani s boljim preživljavanjem kod karcinoma debelog crijeva. Stoga su potrebna daljnja istraživanja o povezanosti između varijante gena *VDR* Cdx2, koncentracija 25-hidroksivitamina D₃ i SPP-a, osobito u većim uzorcima.

GG genotip i G alel Cdx2 (rs11568820) bili su značajno učestaliji kod prijevremeno rođene djece, što upućuje na moguću ulogu ove varijante u predispoziciji za spontani prijevremeni porod. GG genotip *VDR* Cdx2 SNP-a povezan je sa značajno nižim koncentracijama 25-hidroksivitamina D₃ u kontrolnim skupinama, kako kod žena, tako i kod njihove djece. Ovi nalazi upućuju da Cdx2 polimorfizam može utjecati i na rizik od prijevremenog poroda i na metabolizam vitamina D, pri čemu se fenotipski učinci razlikuju: u populaciji s ISPP-om varijanta je povezana s rizikom od prijevremenog poroda, dok u zdravim kontrolama utječe na razine vitamina D bez povećanja rizika za prijevremeni porod.

Prema našim saznanjima, povezanost SNP-ova u *VDR* genu i razina 25-hidroksivitamina D3 u serumu kod prijevremenog poroda dosad je ispitivana samo u brazilskoj populaciji u istraživanju koje su proveli Dutra i suradnici [153]. Razlika između našeg istraživanja i onog koje su proveli Dutra i suradnici jest u tome što su naše ispitanice bile pažljivo odabrane ispitanice s ISPP-om, dok su u Dutrinom istraživanju isključeni samo novorođenčad sa značajnim malformacijama, genetskim sindromima ili teškom neonatalnom anoksijom, kao i slučajevi u kojima nije bilo moguće izmjeriti razinu 25-hidroksivitamina D3. U njihovoj istraživačkoj skupini čak 45 % ispitanica imalo je hipertenzivne bolesti u trudnoći, 5 % gestacijski dijabetes, a 22,5 % infekciju mokraćnog sustava. U našoj skupini, sva su ova stanja bila isključujući kriteriji.

U studiji Dutra i suradnici, pokazano je da su određeni *Taq* i *BsmI* genotipovi u majki, kao i specifične haplotipske kombinacije, bili češći među majkama s prijevremenim porodom, te da su neki *Taq*, *Apa* i *Fok* genotipovi rezultirali nižim razinama 25-hidroksivitamina D3. Određeni genotipovi *BsmI* i *ApaI* povezani su s deficitom 25-hidroksivitamina D3 i višim rizikom za prijevremeni porod. Među prijevremeno rođenom djecom, također su bili češće prisutni određeni genotipovi i haplotipske kombinacije *BsmI*, *Apa* i *Fok*, pri čemu su djeca s određenim *FokI* genotipovima imala niže razine 25-hidroksivitamina D3.

Prednost našeg istraživanja su strogi kriteriji isključenja, budući da su naši ispitanici slučajevi idiopatskog spontanog prijevremenog poroda (ISPP), što znači da su svi poznati uzroci prijevremenog poroda bili isključeni. Također, u našem istraživanju korištena je HPLC metoda, koja predstavlja zlatni standard za analizu 25-hidroksivitamina D3, dok su u Dutrinom istraživanju razine 25-hidroksivitamina D3 u serumu određivane pomoću elektrokemiluminiscencije.

5.5. Prednosti i nedostaci istraživanja

Rezultati ovog istraživanja doprinose boljem razumijevanju povezanosti polimorfizama *VDR* gena, serumskih koncentracija 25-hidroksivitamina D3 i povezanih čimbenika s ISPP-om te obogaćuju postojeća znanja o genetičkim mehanizmima uključenima u fiziološku i patološku trudnoću. Posebno je važna činjenica da su analizirani podaci koji dosad nisu bili dostupni za hrvatsku populaciju, a koji su važni za globalno sagledavanje patogeneze ISPP-a.

Jedna od glavnih prednosti ovog istraživanja jest uključivanje majčino-fetalnog para, čime se pruža cjelovitiji uvid u genetske odnose među sudionicima prijevremenog poroda. Za razliku od prethodnih studija, koje su uglavnom bile usmjerene isključivo na majke ili novorođenčad, ovdje su istovremeno analizirani parovi majki i njihove novorođene djece.

Dodatna prednost istraživanja proizlazi iz rigoroznog probira ispitanica sa spontanim prijevremenim porodom, pri čemu su nakon detaljne dijagnostičke obrade isključeni svi poznati uzroci prijevremenog poroda. Kontrolna skupina pažljivo je uparena s ispitanicama s ISPP-om prema dobi, paritetu, socioekonomskom i demografskom statusu, mjestu stanovanja, razini antenatalne skrbi te vremenu poroda, koje je odgovaralo istom godišnjem razdoblju kao kod ispitanica s ISPP-om, čime je značajno smanjena vjerojatnost da varijacije u populacijskim parametrima utječu na ishode istraživanja. Svi sudionici pripadali su europskoj populaciji. Također, istraživanje je imalo dostatnu statističku snagu za provedene analize.

Analiza koncentracija 25-hidroksivitamina D3 provedena je HPLC metodom, zlatnim standardom u ovoj vrsti mjerenja. Dobivene spoznaje o povezanosti genetskih varijanti *VDR* gena i serumskih koncentracija 25-hidroksivitamina D3 upućuju na moguću važnost praćenja statusa vitamina D tijekom trudnoće. Identifikacija trudnica s niskim koncentracijama vitamina D, osobito onih s genetskom predispozicijom za njegovu smanjenu bioraspoloživost, mogla bi poslužiti kao temelj za izradu ciljanih smjernica o suplementaciji vitaminom D. Pravovremena i individualizirana nadoknada vitamina D potencijalno bi mogla smanjiti incidenciju ISPP-a, osobito u populacijama s većim rizikom.

Moguće ograničenje studije proizlazi iz relativno malog uzorka, što je posljedica visoke razine perinatalne skrbi i niske stope prijevremenih poroda u Republici Hrvatskoj, kao i dodatno strogih uključnih i isključnih kriterija. Povećanje veličine uzorka omogućilo bi veću statističku snagu i pouzdanost nalaza. Nadalje, ponavljanje istraživanja u različitim etničkim skupinama i geografskim područjima moglo bi pridonijeti potvrđivanju dobivenih rezultata i utvrđivanju jesu li specifični za ovu populaciju ili imaju širu primjenjivost.

Ovo istraživanje pridonijelo je proširenju spoznaja o ulozi serumskih koncentracija 25-hidroksivitamina D3 u predispoziciji za ISPP, kao i o povezanosti pojedinačnih polimorfizama unutar *VDR* gena s rizikom za ISPP. Također, rezultati ukazuju na povezanost između varijanti *VDR* gena i koncentracija 25-hidroksivitamina D, čime se dodatno pojašnjava kompleksna interakcija između genetičkih i metaboličkih čimbenika u etiopatogenezi ISPP-a.

Za potvrdu ovih nalaza potrebna su daljnja istraživanja na većim uzorcima. U budućnosti bi bilo vrijedno provesti dodatna ispitivanja genetske povezanosti koja uključuju i reproduktivnog partnera, kao i proširiti istraživanje na druge populacije, kako bi se sveobuhvatnije razmotrila složena problematika genetske predispozicije za ISPP. Osim toga, epigenetske promjene, uključujući metilaciju promotorskih regija *VDR* gena, mogu modulirati ekspresiju receptora i time utjecati na osjetljivost na 25-hidroksivitamin D3. Promjene u metilaciji *VDR* gena povezane su s regulacijom imunoloških i reproduktivnih procesa, što sugerira da epigenetski mehanizmi mogu dodatno doprinijeti riziku od ISPP. Daljnja istraživanja u području epigenetike mogla bi pomoći u rasvjetljavanju kako interakcija između genetskih varijanti i epigenetskih modifikacija utječe na patofiziologiju PP-a.

6. ZAKLJUČCI

Dobiveni rezultati potvrđuju osnovnu pretpostavku ovog istraživanja te omogućuju donošenje sljedećih zaključaka.

1. Statistički značajno veća učestalost GG genotipa i G alela Cdx2 rs11568820 polimorfizma *VDR* gena u skupini prijevremeno rođene djece u usporedbi s kontrolama upućuje da isti predstavljaju potencijalne čimbenike predispozicije za ISPP.
2. Statistički značajna povezanost TT genotipa FokI te TT genotipa ApaI polimorfizma *VDR* gena u žena s porođajnom masom novorođenčadi, upućuje na njihovu potencijalnu ulogu u regulaciji fetalnog rasta.
3. Statistički značajna pozitivna korelacija koncentracija 25-hidroksivitamina D3 između majki i njihove novorođenčadi upućuje na to da majke s višim serumskim koncentracijama 25-hidroksivitamina D3 rađaju djecu s višim serumskim koncentracijama 25-hidroksivitamina D3, a majke s nižim razinama djecu s nižim koncentracijama.
4. GG genotipa Cdx2 polimorfizma *VDR* gena dovodi do nižih koncentracija 25-hidroksivitamina D3 u kontrolnoj skupini, kako kod majki, tako i kod njihove djece upućuje na mogući utjecaj polimorfizma *VDR* gena na gensku ekspresiju te, posljedično, koncentracije vitamina D.

7. LITERATURA

- [1] Quinn JA, Munoz FM, Gonik B, Frau L, Cutland C, Mallett-Moore T i sur. Preterm birth: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunisation safety data. *Vaccine* 2016;34(49):6047-6056.
- [2] Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH i sur. The worldwide incidence of preterm birth: A systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ* 2009;88(1):31-8.
- [3] Vogel JP, Chawanpaiboon S, Moller AB, Watananirun K, Bonet M, Lumbiganon P. The global epidemiology of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2018;52:3-12.
- [4] Shapiro-Mendoza CK, Lackritz EM. Epidemiology of late and moderate preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012;17(3):120-5.
- [5] Ohuma EO, Moller AB, Bradley E, Chakwera S, Hussain-Alkhateeb L, Lewin A i sur. National, regional, and global estimates of preterm birth in 2020, with trends from 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2023;402(10409):1261-1271.
- [6] Delnord M, Hindori-Mohangoo AD, Smith LK, Szamotulska K, Richards JL, Deb-Rinker P i sur. Variations in very preterm birth rates in 30 high-income countries: are valid international comparisons possible using routine data? *BJOG* 2016;124(5):785-794.
- [7] Menon R. Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: Etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008;87(6):590-600.
- [8] Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008;371(9606):75-84.
- [9] Moutquin JM. Classification and heterogeneity of preterm birth. *BJOG* 2003;110 Suppl 20:30-3.
- [10] Khandre V, Potdar J, Keerti A. Preterm Birth: An Overview. *Cureus* 2022;14(12):e33006.
- [11] Costello JM, Takasuka H, Roger J, Yin O, Tang A, Oskotsky T i sur.. Pre-conception clinical risk factors differ between spontaneous and indicated preterm birth in a densely phenotyped EHR cohort. *BMC Pregnancy Childbirth* 2025;25(1):149.

- [12] Ananth CV, Vintzileos AM. Maternal-fetal conditions necessitating a medical intervention resulting in preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195(6):1557-63.
- [13] Menon R, Behnia F, Poletti J, Richardson LS. Novel pathways of inflammation in human fetal membranes associated with preterm birth and preterm pre-labor rupture of the membranes. *Semin Immunopathol* 2020;42(4):431-450.
- [14] Rich-Edwards JW, Stuart JJ, Becene IA, Largier LF, Rexrode KM, Cantonwine DE i sur. Validation of parental recall questionnaire to classify preterm delivery subtypes: Spontaneous preterm labour, preterm premature rupture of membranes and clinician-initiated preterm delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2023;37(8):710-718.
- [15] Green ES, Arck PC. Pathogenesis of preterm birth: bidirectional inflammation in mother and fetus. *Semin Immunopathol* 2020;42(4):413-429.
- [16] Passini R, Cecatti JG, Lajos GJ, Tedesco RP, Nomura ML, Dias TZ i sur. Brazilian multicentre study on preterm birth (EMIP): Prevalence and factors associated with spontaneous preterm birth. *PLoS One* 2014;9(10):e109069.
- [17] Shynlova O, Nadeem L, Zhang J, Dunk C, Lye S. Myometrial activation: Novel concepts underlying labor. *Placenta* 2020;92:28-36
- [18] De Berti M, Le Gouge A, Monmousseau F, Gallot D, Sentilhes L, Winer N i sur. Oxytocin versus prostaglandins for labour Induction of women with an unfavourable cervix after 24 hours of cervical ripening (OPIC): Protocol for an open multicentre randomised non-inferiority trial. *BMJ Open* 2023;13(4):e058282.
- [19] Uvnäs-Moberg K. The physiology and pharmacology of oxytocin in labor and in the peripartum period. *Am J Obstet Gynecol* 2023;230(3S):S740-S758.
- [20] Khodke KS, Vijay N. Artificial Rupture of Membranes and Spontaneous Rupture of Membranes: A Systematic Review of Feto-Maternal Outcomes. *Cureus* 2025;17(1):e77760 Cu
- [21] 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.
- [22] Ansari A, Bose S, You Y, Park S, Kim Y. Molecular mechanism of microbiota metabolites in preterm birth: Pathological and therapeutic insights. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15):8145.

- [23] Habelrih T, Augustin TL, Mauffette-Whyte F, Ferri B, Sawaya K, Côté F i sur. Inflammatory mechanisms of preterm labor and emerging anti-inflammatory interventions. *Cytokine Growth Factor Rev* 2024;78:50-63.
- [24] Gomez-Lopez N, Galaz J, Miller D, Farias-Jofre M, Liu Z, Arenas-Hernandez M i sur. The immunobiology of preterm labor and birth: intra-amniotic inflammation or breakdown of maternal–fetal homeostasis. *Reproduction* 2022;164(2):R11-R45.
- [25] Sfakianaki AK, Norwitz ER. Mechanisms of progesterone action in inhibiting prematurity. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006;19(12):763-72.
- [26] Uvnäs-Moberg K. The physiology and pharmacology of oxytocin in labor and in the peripartum period. *Am J Obstet Gynecol* 2023;230(3S):S740-S758.
- [27] Renthall NE, Williams KC, Montalbano AP, Chen CC, Gao L, Mendelson CR. Molecular regulation of parturition: A myometrial perspective. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;5(11):a023069.
- [28] Bonney RC, Franks S. The endocrinology of implantation and early pregnancy. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1990;4(2):207-31
- [29] Stjernholm Y, Sahlin L, Akerberg S, Elinder A, Eriksson HA, Malmström A i sur. Cervical ripening in humans: potential roles of estrogen, progesterone, and insulin-like growth factor-I. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174(3):1065-71.
- [30] Socha MW, Flis W, Pietrus M, Wartęga M, Stankiewicz M. Signaling Pathways Regulating Human Cervical Ripening in Preterm and Term Delivery. *Cells* 2022;11(22):3690.
- [31] Sennströ MB, Ekman G, Westergren-Thorsson G, Malmströ A, Byströ B, Endré Sen U, et al. Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines. *Mol Hum Reprod* 2000;6(4):375-81.
- [32] Pique-Regi R, Romero R, Garcia-Flores V, Peyvandipour A, Tarca AL, Pusod E, et al. A single-cell atlas of the myometrium in human parturition. *JCI Insight* 2022;7(5):e153921.
- [33] Benedetto C, Petraglia F, Marozio L, Chiarolini L, Florio P, Genazzani AR i sur. Corticotropin-releasing hormone increases prostaglandin F2 α activity on human myometrium in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171(1):126-31.

- [34] Hillhouse EW, Grammatopoulos D, Milton NG, Quartero HW. The Identification of a Human Myometrial Corticotropin-Releasing Hormone Receptor That Increases in Affinity during Pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76(3):736-41.
- [35] Clifton VL, Telfer JF, Thompson AJ, Cameron IT, Teoh TG, Lye SJ i sur. Corticotropin-Releasing Hormone and Proopiomelanocortin-Derived Peptides Are Present in Human Myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(10):3716-21.
- [36] Arrowsmith S. Oxytocin and vasopressin signalling and myometrial contraction. *Curr Opin Physiol* 2020;13:62–70.
- [37] Welsh T, Johnson M, Yi L, Tan H, Rahman R, Merlino A i sur. Estrogen receptor (ER) expression and function in the pregnant human myometrium: Estradiol via ER α activates ERK1/2 signaling in term myometrium. *J Endocrinol* 2011;212(2):227-38.
- [38] Zangeneh FZ, Hantoushzadeh S. The physiological basis with uterine myometrium contractions from electro-mechanical/hormonal myofibril function to the term and preterm labor. *Heliyon* 2023;9(11):e22259.
- [39] Hirst JJ, Teixeira FJ, Zakar T, Olson DM. Prostaglandin Endoperoxide-H Synthase-I and-2 Messenger Ribonucleic Acid Levels in Human Amnion with Spontaneous Labor Onset. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(2):517-23.
- [40] Teixeira FJ, Zakar T, Hirst JJ, Guo F, Sadowsky DW, Machin G i sur. Prostaglandin Endoperoxide-H Synthase (PGHS) Activity and Immunoreactive PGHS-1 and PGHS-2 Levels in Human Amnion throughout Gestation, at Term, and during Labor. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(6):1396-402.
- [41] Greenland KJ, Jantke I, Jenatschke S, Bracken KE, Vinson C, Gellersen B. The Human NAD-Dependent 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase Gene Promoter Is Controlled by Ets and Activating Protein-1 Transcription Factors and Progesterone. *Endocrinology* 2000;141(2):581-97.
- [42] Molnár M, Romero R, Hertelendy F. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate arachidonic acid release and phospholipid metabolism in human myometrial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169(4):825-9.

- [43] Bakker R, Pierce S, Myers D. The role of prostaglandins E1 and E2, dinoprostone, and misoprostol in cervical ripening and the induction of labor: a mechanistic approach. *Arch Gynecol Obstet* 2017;296(2):167-179.
- [44] Masuzawa Y, Yaeko K. Uterine activity during the two hours after placental delivery among low-risk pregnancies: an observational study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;30(20):2446-2451.
- [45] Gimenez LG, Krupitzki HB, Momany AM, Gili JA, Poletta FA, Campaña H i sur. Maternal and neonatal epidemiological features in clinical subtypes of preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2015;29(19):3153-61.
- [46] Leal MD, Esteves-Pereira AP, Nakamura-Pereira M, Torres JA, Theme-Filha M, Domingues RM i sur. Prevalence and risk factors related to preterm birth in Brazil. *Reprod Health* 2016;13. *Reprod Health*;13(Suppl 3):127.
- [47] Mitrogiannis I, Evangelou E, Efthymiou A, Kanavos T, Birbas E, Makrydimas G i sur Risk factors for preterm birth: an umbrella review of meta-analyses of observational studies. *BMC Med* 2023;21(1):494.
- [48] Tang ID, Mallia D, Yan Q, Pe'er I, Raja A, Salieb-Aouissi A i sur. A Scoping Review of Preterm Birth Risk Factors. *Am J Perinatol* 2023;41(S 01):e2804-e2817.
- [49] Cappelletti M, Della Bella S, Ferrazzi E, Mavilio D, Divanovic S. Inflammation and preterm birth. *J Leukoc Biol* 2015;99(1):67-78.
- [50] Daskalakis G, Psarris A, Koutras A, Fasoulakis Z, Prokopakis I, Varthaliti A i sur. Maternal Infection and Preterm Birth: From Molecular Basis to Clinical Implications. *Children. Children (Basel)* 2023;10(5):907.
- [51] Nadeau HC, Subramaniam A, Andrews WW. Infection and preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med* 2016;21(2):100-5.
- [52] Nguyen QHV, Le HN, Nu VAT, Nguyen ND, Le MT. Lower genital tract infections in preterm premature rupture of membranes and preterm labor: A case-control study from Vietnam. *J Infect Dev Ctries* 2021;15(6):805-811.

- [53] Qin J, Wang H, Sheng X, Liang D, Tan H, Xia J. Pregnancy-related complications and adverse pregnancy outcomes in multiple pregnancies resulting from assisted reproductive technology: A meta-analysis of cohort studies. *Fertil Steril* 2015;103(6):1492-508.e1-7.
- [54] Sanders JN, Simonsen SE, Porucznik CA, Hammoud AO, Smith KR, Stanford JB. Fertility treatments and the risk of preterm birth among women with subfertility: a linked-data retrospective cohort study. *Reprod Health* 2022;19(1):83.
- [55] Joo EH, Kim YR, Kim N, Jung JE, Han SH, Cho HY. Effect of endogenic and exogenic oxidative stress triggers on adverse pregnancy outcomes: Preeclampsia, fetal growth restriction, gestational diabetes mellitus and preterm birth. *Int J Mol Sci* 2021;22(18):10122.
- [56] Athanasiou A, Veroniki AA, Efthimiou O, Kalliala I, Naci H, Bowden S, et al. Comparative effectiveness and risk of preterm birth of local treatments for cervical intraepithelial neoplasia and stage IA1 cervical cancer: a systematic review and network meta-analysis. *BMJ Open* 2019;9(10):e028009.
- [57] Lee SM, Jun JK. Prediction and prevention of preterm birth after cervical conization. *J Gynecol Oncol* 2010;21:207–8.
- [58] Batra K, Pharr J, Olawepo JO, Cruz P. Understanding the multidimensional trajectory of psychosocial maternal risk factors causing preterm birth: A systematic review. *Asian J Psychiatr* 2020;54:102436.
- [59] McHale P, Maudsley G, Pennington A, Schlüter DK, Barr B, Paranjothy S i sur.. Mediators of socioeconomic inequalities in preterm birth: a systematic review. *BMC Public Health* 2022;22(1):1134.
- [60] Reijnders IF, Mulders AGMGJ, Van Der Windt M, Steegers EAP, Steegers-Theunissen RDSPM. The impact of periconceptional maternal lifestyle on clinical features and biomarkers of placental development and function: A systematic review. *Hum Reprod Update* 2019;25:72–94.
- [61] Pintican D, Poienar AA, Strilciuc S, Miha D. Effects of maternal smoking on human placental vascularization: A systematic review. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2019;58(4):454–459.

- [62] Ohira S, Motoki N, Shibazaki T, Misawa Y, Inaba Y, Kanai M, et al. Alcohol Consumption During Pregnancy and Risk of Placental Abnormality: The Japan Environment and Children's Study, *Sci Rep* 2019;9:10259.
- [63] Esposito G, Mauri PA, Cipriani S, Franchi M, Corrao G, Parazzini F. The role of maternal age on the risk of preterm birth among singletons and multiples: a retrospective cohort study in Lombardy, Norther Italy. *BMC Pregnancy Childbirth* 2022;22(1):234.
- [64] Anum EA, Springel EH, Shriver MD, Strauss JF. Genetic contributions to disparities in preterm birth. *Pediatr Res* 2009;65(1):1-9.
- [65] Crider KS, Whitehead N, Buus RM. Genetic variation associated with preterm birth: A HuGE review. *Genet Med* 2005;7(9):593-604.
- [66] Esplin MS. Overview of Spontaneous Preterm Birth: A Complex and Multifactorial Phenotype. *Clin Obstet Gynecol*. 2014;57(3):518-30.
- [67] Porter TF, Fraser AM, Hunter CY, Ward RH, Varner MW. The Risk of Preterm Birth Across Generations. *Obstet Gynecol* 1997;90(1):63-7.
- [68] Koire A, Chu DM, Aagaard K. Family history is a predictor of current preterm birth. *Am J Obstet Gynecol MFM*. 2020;3(1):100277
- [69] Winkvist A, Mogren I, H6gberg U. Familial patterns in birth characteristics: impact on individual and population risks. *Int J Epidemiol* 1998;27(2):248-54.
- [70] Clausson B, Fellow S, Lichtenstein P, Cnattingius T. Genetic influence on birthweight and gestational length determined by studies in offspring of twins. *BJOG* 2000;107(3):375-81.
- [71] Varner M. The obstetric history: Personal and family. *BJOG* 2014;121:1209.
- [72] Ward K. Genetic factors in preterm birth. *BJOG*. 2003;110 Suppl 20:117.
- [73] 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 Jan;12(1):1003.

- [74] Vafapour M, Talebi H, Danaei M, Yeganegi M, Azizi S, Dastgheib SA i sur. Global and population-specific association of MTHFR polymorphisms with preterm birth risk: a consolidated analysis of 44 studies. *BMC Pregnancy Childbirth* 2025;25(1):230.
- [75] Phan L, Zhang H, Wang Q, Villamarin R, Hefferon T, Ramanathan A i sur. The evolution of dbSNP: 25 years of impact in genomic research. *Nucleic Acids Res* 2025;53(D1):D925-D931
- [76] Pennell CE, Jacobsson B, Williams SM, Buus RM, Muglia LJ, Dolan SM i sur. Genetic epidemiologic studies of preterm birth: guidelines for research. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196(2):107-18.
- [77] Akçeşme B, Hekimoğlu H, Chirasani VR, İş Ş, Atmaca HN, Waldern JM, et al. Identification of deleterious non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the mRNA decay activator ZFP36L2. *RNA Biol* 2024;22(1):1-15.
- [78] van Arensbergen J, Pagie L, FitzPatrick VD, de Haas M, Baltissen MP, Comoglio F i sur.. High-throughput identification of human SNPs affecting regulatory element activity. *Nat Genet* 2019;51(7):1160-1169.
- [79] Degtyareva AO, Antontseva E V., Merkulova TI. Regulatory snps: Altered transcription factor binding sites implicated in complex traits and diseases. *Int J Mol Sci* 2021;22(12):6454.
- [80] Barišić A, Dević Pavlić S, Ostojić S, Perez 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.
- [81] Perez N, Pleša I, Peterlin A, Jan Ž, Tul N, Kapović M, et al. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinases 1 and 9 genes in women with spontaneous preterm birth. *Dis Markers* 2014;2014:171036.
- [82] Saponaro F, Saba A, Zucchi R. An update on vitamin d metabolism. *Int J Mol Sci* 2020;21(18):6573.
- [83] Young AR, Morgan KA, Harrison GI, Lawrence KP, Petersen B, Wulf HC i sur. A revised action spectrum for vitamin D synthesis by suberythemal UV radiation exposure in humans in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021;118(40):e2015867118.
- [84] Benedik E. Sources of vitamin D for humans. *Int J Vitam Nutr Res* 2021;92(2):118-125.

- [85] Bouillon R, Schuit F, Antonio L, Rastinejad F. Vitamin D Binding Protein: A Historic Overview. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;10:910.
- [86] Bland R, Walker EA, Hughes S V, Stewart PM, Hewison M. Constitutive Expression of 25-Hydroxyvitamin D 3-1-Hydroxylase in a Transformed Human Proximal Tubule Cell Line: Evidence for Direct Regulation of Vitamin D Metabolism by Calcium. *Endocrinology* 1999;140(5):2027-34.
- [87] Md Isa Z, Amsah N, Ahmad N. The Impact of Vitamin D Deficiency and Insufficiency on the Outcome of Type 2 Diabetes Mellitus Patients: A Systematic Review. *Nutrients*. 2023;15(10):2310.
- [88] Knabl J, Vattai A, Ye Y, Jueckstock J, Hutter S, Kainer F, et al. Role of placental VDR expression and function in common late pregnancy disorders. *Int J Mol Sci* 2017;18(11):2340.
- [89] DeLuca HF. The vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism. *Nutr Rev* 1979;37(6):161-93
- [90] Gil Á, Plaza-Diaz J, Mesa MD. Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Ann Nutr Metab* 2018;72(2):87-95.
- [91] Voltan G, Cannito M, Ferrarese M, Ceccato F, Camozzi V. Vitamin D: An Overview of Gene Regulation, Ranging from Metabolism to Genomic Effects. *Genes (Basel)* 2023;14(9):1691.
- [92] Cyprian F, Lefkou E, Varoudi K, Girardi G. Immunomodulatory Effects of Vitamin D in Pregnancy and Beyond. *Front Immunol* 2019;10:2739.
- [93] Barrera D, Díaz L, Noyola-Martínez N, Halhali A. Vitamin D and inflammatory cytokines in healthy and preeclamptic pregnancies. *Nutrients* 2015;7(8):6465-90.
- [94] Wang H, Chen W, Li D, Yin X, Zhang X, Olsen N i sur. Vitamin D and chronic diseases. *Aging Dis* 2017;8(3):346-353.
- [95] Salle BL, Delvin EE, Lapillonne A, Bishop NJ, Glorieux FH. Perinatal metabolism of vitamin D. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(5 Suppl):1317S-24S.
- [96] Liu NQ, Hewison M. Vitamin D, the placenta and pregnancy. *Arch Biochem Biophys* 2011;523(1):37-47.

- [97] Møller UK, Streym S, Mosekilde L, Heickendorff L, Flyvbjerg A, Frystyk J i sur. Changes in calcitropic hormones, bone markers and insulin-like growth factor i (IGF-I) during pregnancy and postpartum: A controlled cohort study. *Osteoporos Int* 2012;24(4):1307-20.
- [98] Mansur JL, Oliveri B, Giacoia E, Fusaro D, Costanzo PR. Vitamin D: Before, during and after Pregnancy: Effect on Neonates and Children. *Nutrients* 2022;14(9):1900.
- [99] Schröder-Heurich B, Springer CJP, von Versen-Höynck F. Vitamin d effects on the immune system from periconception through pregnancy. *Nutrients* 2020;12(5):1432.
- [100] Gerovasili E, Sarantaki A, Bothou A, Deltsidou A, Dimitrakopoulou A, Diamanti A. The role of vitamin D deficiency in placental dysfunction: A systematic review. *Metabol Open* 2025;25:100350.
- [101] Kiely M, Hemmingway A, O’Callaghan KM. Vitamin D in pregnancy: current perspectives and future directions. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2017;9(6):145-154.
- [102] Hollis BW, Wagner CL. Vitamin D and pregnancy: Skeletal effects, nonskeletal effects, and birth outcomes. *Calcif Tissue Int* 2012;92(2):128-39.
- [103] Palacios C, De-Regil LM, Lombardo LK, Peña-Rosas JP. Vitamin D supplementation during pregnancy: Updated meta-analysis on maternal outcomes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2016;164:148-155.
- [104] Ross AC, Manson JAE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: What clinicians need to know. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010;96(1):53-8.
- [105] Liu X, Baylin A, Levy PD. Vitamin D deficiency and insufficiency among US adults: Prevalence, predictors and clinical implications. *British Journal of Nutrition* 2018;119(8):928-936.
- [106] Pilz S, Zittermann A, Obeid R, Hahn A, Pludowski P, Trummer C i sur. The Role of Vitamin D in Fertility and during Pregnancy and Lactation: A Review of Clinical Data. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(10):2241.
- [107] Palacios C, De-Regil LM, Lombardo LK, Peña-Rosas JP. Vitamin D supplementation during pregnancy: Updated meta-analysis on maternal outcomes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2016;164:148-155.

- [108] Dror DK. Vitamin D status during pregnancy: Maternal, fetal, and postnatal outcomes. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2011;23(6):422-6.
- [109] Mulligan ML, Felton SK, Riek AE, Bernal-Mizrachi C. Implications of vitamin D deficiency in pregnancy and lactation. *Am J Obstet Gynecol* 2009;202(5):429.e1-9.
- [110] Saraf R, Morton SMB, Camargo CA, Grant CC. Global summary of maternal and newborn vitamin D status – a systematic review. *Matern Child Nutr* 2015;12(4):647-68.
- [111] Hollis BW, Wagner CL. Vitamin D and pregnancy: Skeletal effects, nonskeletal effects, and birth outcomes. *Calcif Tissue Int* 2012;92(2):128-39.
- [112] Kassai MS, Cafeo FR, Affonso-Kaufman FA, Suano-Souza FI, Sarni ROS. Vitamin D plasma concentrations in pregnant women and their preterm newborns. *BMC Pregnancy Childbirth* 2018;18(1):412.
- [113] Qin LL, Lu FG, Yang SH, Xu HL, Luo BA. Does maternal Vitamin D deficiency increase the risk of preterm birth: A meta-analysis of observational studies. *Nutrients* 2016;8(5):301.
- [114] Zhou SS, Tao YH, Huang K, Zhu BB, Tao FB. Vitamin D and risk of preterm birth: Up-to-date meta-analysis of randomized controlled trials and observational studies. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2017;43(2):247-256.
- [115] Amegah AK, Klevor MK, Wagner CL. Maternal Vitamin D insufficiency and risk of adverse pregnancy and birth outcomes: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *PLoS One* 2017;12(3):e0173605.
- [116] Bodnar LM, Klebanoff MA, Gernand AD, Platt RW, Parks WT, Catov JM i sur. Maternal vitamin D status and spontaneous preterm birth by placental histology in the US collaborative perinatal project. *Am J Epidemiol* 2013;179(2):168-76.
- [117] Nguyen TPH, Yong HEJ, Chollangi T, Borg AJ, Brennecke SP, Murthi P. Placental vitamin D receptor expression is decreased in human idiopathic fetal growth restriction. *J Mol Med (Berl)* 2015;93(7):795-805.
- [118] Murthi P, Yong HEJ, Ngyuen TPH, Ellery S, Singh H, Rahman R i sur. Role of the placental Vitamin D receptor in modulating feto-placental growth in fetal growth restriction and preeclampsia-affected pregnancies. *Front Physiol* 2016;7:43.

- [119] Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JBJ, Pols HAP, Van Leeuwen JPTM. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004 Sep 1;338(2):143-56.
- [120] Manzon L, Altarescu G, Tevet A, Schimmel MS, Elstein D, Samueloff A i sur. 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.
- [121] Barchitta M, Maugeri A, La Rosa MC, Lio RMS, Favara G, Panella M i sur. Single nucleotide polymorphisms in vitamin D receptor gene affect birth weight and the risk of preterm birth: Results from the “mamma & bambino” cohort and a meta-analysis. *Nutrients* 2018;10(9):1172.
- [122] Baczyńska-Strzecha M, Kalinka J. Influence of Apa1 (rs7975232), Taq1 (rs731236) and Bsm1 (rs154410) polymorphisms of vitamin D receptor on preterm birth risk in the Polish population. *Ginekol Pol* 2016;87(11):763-768.
- [123] 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* 2017;642:58-63.
- [124] 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(2):215-222.
- [125] Karpiński M, Galicka A, Milewski R, Popko J, Badmaev V, Stohs SJ. Association between Vitamin D Receptor Polymorphism and Serum Vitamin D Levels in Children with Low-Energy Fractures. *J Am Coll Nutr* 2017;36(1):64-71.
- [126] Li K, Shi Q, Yang L, Li X, Liu L, Wang L i sur. The association of vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D levels with generalized vitiligo. *Br J Dermatol* 2012;167(4):815-21.
- [127] Hajj A, Chedid R, Chouery E, Megarbané A, Gannagé-Yared MH. Relationship between Vitamin D receptor gene polymorphisms, cardiovascular risk factors and adiponectin in a healthy young population. *Pharmacogenomics* 2016;17(15):1675-1686
- [128] Krpina MG, 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(4):338-345.

- [129] Yang L, Pan S, Zhou Y, Wang X, Qin A, Huang Y i sur.. The correlation between serum vitamin D deficiency and preterm birth. *Med Sci Monit* 2016;22:4401-4405.
- [130] Bhupornvivat N, Phupong V. Serum 25-hydroxyvitamin D in pregnant women during preterm labor. *Asia Pac J Clin Nutr* 2017;26(2):287-290.
- [131] Akkar OB, Sancakdar E, Karakus S, Yildiz C, Akkar I, Arslan M i sur. Evaluation of maternal serum 25-hydroxyvitamin D, paraoxonase 1 levels, and neutrophil-to-lymphocyte ratio in spontaneous preterm birth. *Med Sci Monit*, 2016;22:1238-43.
- [132] Dawodu A, Nath R. High prevalence of moderately severe vitamin D deficiency in preterm infants. *Pediatr Int* 2011;53(2):207-10.
- [133] Baczyńska-Strzecha M, Kalinka J. Assessment of correlation between vitamin D level and prevalence of preterm births in the population of pregnant women in Poland. *Int J Occup Med Environ Health* 2017;30(6):933-941.
- [134] Thota C, Menon R, Fortunato SJ, Brou L, Lee JE, Al-Hendy A. 1,25-Dihydroxyvitamin D deficiency is associated with preterm birth in African American and Caucasian women. *Reprod Sci* 2013;21(2):244-50.
- [135] Shee AW, Frawley N, Robertson C, McKenzie AM, Lodge J, Versace V i sur l. Accessing and engaging with antenatal care: an interview study of teenage women. *BMC Pregnancy Childbirth* 2021;21(1):693.
- [136] Liu B, Xu G, Sun Y, Qiu X, Ryckman KK, Yu Y, et al. Maternal cigarette smoking before and during pregnancy and the risk of preterm birth: A dose–response analysis of 25 million mother–infant pairs. *PLoS Med* 2020;17(8):e1003158.
- [137] Zhang G, Feenstra B, Bacelis J, Liu X, Muglia LM, Juodakis J i sur. Genetic Associations with Gestational Duration and Spontaneous Preterm Birth. *N Engl J Med* 2017;377(12):1156-1167.
- [138] El-Husseney M, Ismail ElS A, Eldeeb SM, Taha HS, A. Omar A. Impact of Maternal Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms on Spontaneous Preterm Birth (Egyptian Case-Control Study). *Journal of Medical Sciences* 2021;21:9–16.
- [139] Turesheva A. Evaluation of the association of polymorphisms of the vitamin D receptor gene (VDR) with idiopathic recurrent pregnancy loss among women in Kazakhstan. *Middle East Fertil Soc J* 2024;29.

- [140] Moradkhani A, Azami M, Assadi S, Ghaderi M, Azarnezhad A, Moradi Y. Association of vitamin D receptor genetic polymorphisms with the risk of infertility: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth* 2024;24(1):398.
- [141] Gasperini B, Visconti VV, Ciccacci C, Falvino A, Gasbarra E, Iundusi R i sur. Role of the Vitamin D Receptor (VDR) in the Pathogenesis of Osteoporosis: A Genetic, Epigenetic and Molecular Pilot Study. *Genes (Basel)* 2023;14(3):542.
- [142] Slattery ML, Herrick J, Wolff RK, Caan BJ, Potter JD, Sweeney C. CDX2 VDR polymorphism and colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(12):2752-5.
- [143] Lesiak A, Wódz K, Ciazynska M, Skibinska M, Waszczykowski M, Ciazynski K i sur. Taai/cdx-2 aa variant of vdr defines the response to phototherapy amongst patients with psoriasis. *Life (Basel)* 2021;11(6):567.
- [144] Rehman M, Mahboob T, Shahid SM. Possible association of Vitamin D receptor, caudal-related homeobox 2 polymorphism with the risk of cancer. *Int J Health Sci (Qassim)* 2021;15(2):9–13.
- [145] Iqbal MUN, Khan TA, Maqbool SA. Vitamin D receptor Cdx-2 polymorphism and premenopausal breast cancer risk in Southern Pakistani patients. *PLoS One* 2015;10(3):e0122657.
- [146] Gupta K, Thakur R, Sharma P, Kamra P, Khetarpal P. Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) and its association with VDR gene variants Cdx2 (rs11568820) and ApaI (rs7975232): Systematic Review, Meta-analysis and In silico analysis. *Hum Gene.* 2024;40:201293.
- [147] Warrington NM, Beaumont RN, Horikoshi M, Day FR, Helgeland Ø, Laurin C i sur. Maternal and fetal genetic effects on birth weight and their relevance to cardio-metabolic risk factors. *Nat Genet* 2019;51(5):804-814.
- [148] Varshney S, Adela R, Kachhawa G, Dada R, Kulshreshtha V, Kumari R i sur. Disrupted placental vitamin D metabolism and calcium signaling in gestational diabetes and pre-eclampsia patients. *Endocrine* 2022;80(1):191-200.
- [149] Magiełda-Stola J, Kurzawińska G, Ożarowski M, Bogacz A, Wolski H, Drews K i sur. Placental mrna and protein expression of vdr, cyp27b1 and cyp2r1 genes related to vitamin d metabolism in preeclamptic women. *Appl Sci (Switz).* 2021;11(13):5922.

- [150] Ashley B, Simner C, Manousopoulou A, Jenkinson C, Hey F, Frost JM, et al. Placental uptake and metabolism of 25(OH)vitamin D determine its activity within the fetoplacental unit. *Elife* 2022;11:e71094.
- [151] McGrath JJ, Saha S, Burne THJ, Eyles DW. A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121(1-2):471-7.
- [152] Karras SN, Dursun E, Alaylıoğlu M, Gezen-Ak D, Annweiler C, Skoutas D i sur. Diverse effects of combinations of maternal-neonatal vdr polymorphisms and 25-hydroxyvitamin d concentrations on neonatal birth anthropometry: Functional phenocopy variability dependence, highlights the need for targeted maternal 25-hydroxyvitamin d cut-offs during pregnancy. *Nutrients* 2021;13(2):443.
- [153] Dutra LV, Affonso-Kaufman FA, Cafeo FR, Kassai MS, Barbosa CP, Santos Figueiredo FW, et al. Association between vitamin D plasma concentrations and VDR gene variants and the risk of premature birth. *BMC Pregnancy Childbirth* 2019;20(1):3.
- [154] Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, Zitzer H, Oza AK, Dang HTL i sur. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 2001;177(1-2):145-59
- [155] Ustun N, Eyerci N, Karadag N, Yesilyurt A, Zenciroglu A, Okumus N. Association of vitamin D receptor gene FokI and TaqI polymorphisms and risk of RDS. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2019;33(21):3640-3646.
- [156] Morley R, Carlin JB, Pasco JA, Wark JD, Ponsonby AL. Maternal 25-hydroxyvitamin D concentration and offspring birth size: Effect modification by infant VDR genotype. *Eur J Clin Nutr* 2008;63(6):802-4.
- [157] Kosik K, Szpecht D, Al-Saad SR, Karbowski LM, Kurzawińska G, Szymankiewicz M i sur. Single nucleotide vitamin D receptor polymorphisms (FokI, BsmI, ApaI, and TaqI) in the pathogenesis of prematurity complications. *Sci Rep* 2020;10(1):21098.
- [158] Pereira-Santos M, Carvalho GQ, Louro ID, dos Santos DB, Oliveira AM. Polymorphism in the vitamin D receptor gene is associated with maternal vitamin D concentration and neonatal outcomes: A Brazilian cohort study. *Am J Hum Biol* 2019;31(4):e23250.

- [159] Swamy GK, Garrett ME, Miranda ML, Ashley-Koch AE. Maternal vitamin D receptor genetic variation contributes to infant birthweight among black mothers. *Am J Med Genet A* 2011;155A(6):1264-71.
- [160] Banihosseini SZ, Baheiraei A, Shirzad N, Heshmat R, Mohsenifar A. The effect of cigarette smoke exposure on vitamin D level and biochemical parameters of mothers and neonates. *J Diabetes Metab Disord* 2013;12(1):19.
- [161] Mulligan JK, Nagel W, O'Connell BP, Wentzel J, Atkinson C, Schlosser RJ. Cigarette smoke exposure is associated with vitamin D3 deficiencies in patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134(2):342-9.
- [162] Razaghi M, Gharibeh N, Vanstone CA, Sotunde OF, Wei SQ, McNally D i sur. Maternal excess adiposity and serum 25-hydroxyvitamin D < 50 nmol/L are associated with elevated whole body fat mass in healthy breastfed neonates. *BMC Pregnancy Childbirth* 2022;22(1):83
- [163] Aghajafari F, Nagulesapillai T, Ronksley PE, Tough SC, O'Beirne M, Rabi DM. Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: Systematic review and meta-analysis of observational Studies. *BMJ* 2013;346:f1169.
- [164] Divanoglou N, Komninou D, Stea EA, Argiriou A, Papatzikas G, Tsakalof A i sur. Association of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms with Serum Vitamin D Levels in a Greek Rural Population (Velesino Study). *Lifestyle Genom* 2021;14(3):81-90
- [165] Abouzid M, Kruszyna M, Burchardt P, Kruszyna Ł, Głowska FK, Karaźniewicz-Łada M. Vitamin d receptor gene polymorphism and vitamin d status in population of patients with cardiovascular disease—a preliminary study. *Nutrients* 2021;13(9):3117.

POPIS POKRATA

PP	prijevremeni porod (engl. <i>preterm birth</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)
MIPP	medicinski induciran prijevremeni porod (engl. <i>medically indicated preterm birth</i>)
SPP	spontani prijevremeni porod (engl. <i>spontaneous preterm birth</i>)
PPROM	prijevremeno prerano prsnuća plodovih ovoja (engl. <i>preterm premature rupture of membranes</i>)
ISPP	idiopatski spontani prijevremeni porod (engl. <i>idiopathic spontaneous preterm birth</i>)
HPA	hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (engl. <i>hypothalamic–pituitary–adrenal</i>)
CRH	kortikotropin otpuštajući hormon (engl. <i>corticotropin-releasing hormone</i>)
PGHS	prostaglandin H-sintaze (engl. <i>prostaglandin H synthase</i>)
PGDH	hidroksiprostaglandin dehidrogenaza (engl. <i>hydroxyprostaglandin dehydrogenase</i>)
IL-1	interleukin 1 (engl. <i>Interleukin-1</i>)
TNF α	tumorski nekrotizirajući faktor alfa (engl. <i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
LLETZ	engl. <i>Large Loop Excision of the Transformation Zone</i>
SNP-s	polimorfizmi jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphisms</i>)
IL-4	interleukin 4 (engl. <i>Interleukin-4</i>)
IL-6	interleukin 6 (engl. <i>Interleukin-6</i>)
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (engl. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
MMP1	matriks metaloproteinaza 1 (engl. <i>Matrix metalloproteinase 1</i>)
MMP9	matriks metaloproteinaza 9 (engl. <i>Matrix metalloproteinase 9</i>)
TLR4	toll-slični receptor 4 (engl. <i>Toll-like receptor 4</i>)
VDR	vitamin D receptor (engl. <i>Vitamin D receptor</i>)
UVB	UVB zrake (engl. <i>Ultraviolet B</i>)
VDBP	vitamin D vezni protein (engl. <i>Vitamin D Binding protein</i>)
PTH	paratiroidni hormon (engl. <i>Parathyroid hormone</i>)
FRG23	fibroblastni faktor rasta 23 (engl. <i>Fibroblast Growth Factor 23</i>)
IOM	Institut za medicinu (engl. <i>Institute of Medicine</i>)

ACOG	Američki kolegij opstetričara i ginekologa (engl. <i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>)
RCOG	Kraljevski kolegij opstetričara i ginekologa (engl. <i>Royal College of Obstetricians and Gynaecologists</i>)
DBD	DNA-vezna domena (engl. <i>DNA-binding domain</i>)
VDRE	elementi odgovora vitamina D (engl. <i>Vitamin D response elements</i>)
LBD	ligandom - vezna domena (engl. <i>Ligand-binding domain</i>)
RXR	retinoidni X receptor (engl. <i>Retinoid X receptor</i>)
UTR	nekodirajuća regija (engl. <i>untranslated region</i>)
Cdx2 faktor	transkripcijski faktor caudal-type homeobox 2 (engl. <i>Caudal-type homeobox transcription factor 2</i>)
ak.	aminokiseline
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
GDM	gestacijski dijabetes melitus (engl. <i>gestational diabetes mellitus</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
RFLP	polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (engl. <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
μL	mikrolitar
bp	bazni par (engl. <i>base pair</i>)
°C	stupnjeva Celzija
min	minuta
sec	sekunda
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
nmol/L	nanomol po litri
ng/mL	nanogram po mililitru
χ^2	hi kvadrat test (engl. <i>chi square</i>)
OR	omjer izgleda (engl. <i>Odds Ratio</i>)
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>Confidence interval</i>)

P	p-vrijednost statističke značajnosti (engl. <i>P-value</i>)
IKR	interkvartilni raspon
AS	aritmetička sredina
SD	standardna devijacija
g	grami
PCOS	sindrom policističnih jajnika (engl. Polycystic Ovary Syndrome)

ILUSTRACIJE

Popis slika

Slika 1. Metabolizam vitamina D.	8
Slika 2. Struktura gena za vitamin D receptor.	13
Slika 3. Shematski prikaz skupine ispitanika i primjenjenih istraživanja.	19
Slika 4. Shematski prikaz kontrolne skupine i primjenjenih istraživanja.	20
Slika 5. Povezanost koncentracija 25-hidroksivitamina D3 između majki i njihove novorođene djece.	52

Popis tablica

Tablica 1. Utjecaj polimorfizama FokI (rs2228570), ApaI (rs7975232), Cdx2 (rs11568820), BsmI (rs1544410), TaqI (rs731236) <i>VDR</i> gena na gensku ekspresiju.....	12
Tablica 2. Slijedovi nukleotida specifičnih početnica i veličine PCR produkata korištenih za analizu polimorfizama <i>VDR</i> gena.....	22
Tablica 3. Uvjeti PCR reakcija korištenih za analizu polimorfizama <i>VDR</i> gena.....	23
Tablica 4. Vrste restrikcijskih enzima, uvjeti restrikcije i veličine restrikcijskih fragmenata korištenih za analizu polimorfizama <i>VDR</i> gena [127].....	23
Tablica 5. Odabrane epidemiološke značajke ispitanika (N = 162) i kontrola (N = 163) slovenske i hrvatske populacije.....	29
Tablica 6. Odabrane epidemiološke značajke ispitanika (N = 44) i kontrola (N = 44) hrvatske populacije.....	31
Tablica 7. Učestalost genotipova i alela FokI rs2228570, ApaI rs7975232, Cdx2 rs1156882 polimorfizama <i>VDR</i> gena u ispitanica s ISPP-om (N = 162) i kontrola (N = 163) hrvatske i slovenske populacije.....	34
Tablica 8. Učestalost genotipova i alela FokI rs2228570, ApaI rs7975232, Cdx2 rs1156882 polimorfizama <i>VDR</i> gena u ispitanica s ISPP-om (N = 118) i kontrola (N = 119) slovenske populacije.....	35
Tablica 9. Učestalost genotipova i alela BsmI rs1544410 i Taq rs731236 polimorfizama <i>VDR</i> gena u ispitanica s ISPP-om (N= 118) i kontrola (N = 119) slovenske populacije.....	36
Tablica 10. Učestalost genotipova i alela FokI rs2228570, ApaI rs7975232, Cdx2 rs1156882 polimorfizama <i>VDR</i> gena u ispitanica s ISPP-om (N = 44) i kontrola (N = 44) hrvatske populacije.....	37

Tablica 11. Učestalost genotipova i alela FokI rs2228570, ApaI rs7975232, Cdx2 rs1156882 polimorfizama <i>VDR</i> gena u prijevremeno rođene djece (N = 44) i kontrola (N = 44) hrvatske populacije.....	39
Tablica 12. Učestalost kombinacija genotipova FokI rs2228570 i ApaI rs7975232 polimorfizama <i>VDR</i> gena u ispitanica s ISPP-om (N = 162) i kontrola (N = 163)....	40
Tablica 13. Učestalost kombinacija genotipova Cdx2 rs1156882 i ApaI rs7975232 polimorfizama <i>VDR</i> gena u ispitanica s ISPP-om (N = 162) i kontrola (N = 163).....	41
Tablica 14. Učestalost kombinacija genotipova FokI rs2228570 i Cdx2 rs1156882 polimorfizama <i>VDR</i> gena u ispitanica s ISPP-om (N = 162) i kontrola (N = 163).....	42
Tablica 15. Učestalost kombinacija genotipova FokI rs2228570 i ApaI rs7975232 polimorfizama <i>VDR</i> gena u prijevremeno rođene djece (N = 44) i kontrola (N = 44).....	43
Tablica 16. Učestalost kombinacija genotipova ApaI rs7975232 i Cdx2 rs1156882 polimorfizama <i>VDR</i> gena u prijevremeno rođene djece (N = 44) kontrola (N = 44).....	44
Tablica 17. Učestalost kombinacija genotipova Cdx2 rs1156882 i FokI rs2228570 polimorfizama <i>VDR</i> gena u prijevremeno rođene djece (N = 44) i kontrola (N = 44).....	45
Tablica 18. Povezanost FokI rs2228570, ApaI rs7975232 i Cdx2 rs1156882 polimorfizama <i>VDR</i> gena i porođajne mase novorođenčadi u skupini ispitanica s ISPP-om i kontrolnoj skupini slovenske i hrvatske populacije	46
Tablica 19. Povezanost FokI rs2228570 i ApaI rs7975232 polimorfizama <i>VDR</i> gena i porođajne mase novorođenčadi u skupini ispitanica s ISPP-om i kontrolnoj skupini.....	46
Tablica 20. Post-hoc analiza kombinacije FokI rs2228570 i ApaI rs7975232 genotipova na porođajnu masu novorođenčadi u skupini ispitanica s ISPP -om.....	47
Tablica 21. Učestalost genotipova i alela FokI rs2228570, ApaI rs7975232 i Cdx2 rs11568820 polimorfizma <i>VDR</i> gena u ispitanica sa sporadičnim (N = 110) i obiteljskim prijevremenim porodom (N = 44).....	48
Tablica 22. Učestalost genotipova i alela FokI rs2228570, ApaI rs7975232 i Cdx2 rs11568820 polimorfozma <i>VDR</i> gena u ispitanica prema statusu konzumacije duhanskih proizvoda,	

konzumirale su duhanske proizvode (N =43), nisu konzumirale duhanske proizvode (N = 114).....	49
Tablica 23. Koncentracije 25-hidroksivitamina D3 u serumu u skupini ispitanika i kontrolnoj skupini	50
Tablica 24. Insuficijencija, deficijencija te optimalne vrijednosti 25-hidroksivitamina D3 u serumu u skupini ispitanica s ISPP-om (N = 44) i kontrolnoj skupini (N = 44).....	51
Tablica 25. Insuficijencija, deficijencija te optimalne vrijednosti 25-hidroksivitamina D3 u serumu u skupini prijevremeno rođene djece (N = 44) i kontrolnoj skupini (N = 44).....	51
Tablica 26. Usporedba serumskih koncentracija 25-hidroksivitamina D3 s FokI rs2228570, ApaI rs7975232 i Cdx2 rs11568820 polimorfizmima <i>VDR</i> gena kod ispitanica s ISPP-om (N= 44) i kontrolne skupine (N = 44).....	53
Tablica 27. Usporedba serumskih koncentracija 25-hidroksivitamina D3 s FokI rs2228570, ApaI rs7975232 i Cdx2 rs11568820 polimorfizmima <i>VDR</i> gena kod prijevremeno rođene djece (N = 44) i kontrolne skupine (N = 44).....	54
Tablica 28. Korelacija AA genotipa Cdx2 <i>VDR</i> gena sa serumskim koncentracijama 25-hidroksivitamina D3 u ispitanica s ISPP-om i kontrolnoj skupini.....	55
Tablica 29. Korelacija AA genotipa Cdx2 <i>VDR</i> gena sa serumskim koncentracijama 25-hidroksivitamina D3 u prijevremeno rođena djece i kontrolnoj skupini.....	55

PRILOZI

Prilog 1: Anketni upitnik (prijevremeni porod)

BAZA BANKE BIOUZORAKA U SKLOPU ISTRAŽIVANJA PRIJEVREMENIH PORODA (Prijevremeni porod)

I. MAJKA

OSNOVNI PODACI:

1. Ime i prezime: _____
2. ID broj Biobanke: _____
3. Datum uzimanja podataka i biouzoraka: _____
4. MBO: _____
5. OIB: _____
6. Datum i mjesto rođenja: _____
7. Adresa prebivališta: _____
8. 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. mrtvorođene djece: _____
5. Podaci o trudnoćama vezani za istog partnera:
a. DA b. NE (napomena: _____)

ANAMNEZA TRUDNOĆA KOJESU ZAVRŠILE PRIJEVREMENIM PORODOM:

	1. PRIJEVREMENI POROD	2. PRIJEVREMENI POROD	3. PRIJEVREMENI POROD
1. Krv iz pupkovine pohranjena u Biobanci	a. NE b. DA / ID biobanke:	a. NE b. DA / ID biobanke:	a. NE b. DA / ID biobanke:
2. Način začeća	a. prirodno b. asistirano / vrsta:	a. prirodno b. asistirano / vrsta:	a. prirodno b. asistirano / vrsta:
3. Tjedan poroda			
4. Redni broj / interval od zadnje trudnoće			
5. Medicinska indikacija za porod	a. NE b. DA / razlog:	a. NE b. DA / razlog:	a. NE b. DA / razlog:
6. Blizanačka trudnoća	a. NE b. DA	a. NE b. DA	a. NE b. DA
7. Mrtvorodstvo	a. NE b. DA	a. NE b. DA	a. NE b. DA
8. Početak prijevremenog poroda	a. RVP b. trudovi	a. RVP b. trudovi	a. RVP b. trudovi
9. Ginekološke kontrole	a. NE b. DA / broj:	a. NE b. DA / broj:	a. NE b. DA / broj:
10. Psihološki stres (npr. razvod, smrt...)	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:
11. 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:
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:
13. 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:
14. 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:
15. Komplikacije trudnoće (npr. hipertenzija, krvarenje...)	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:
16. Serklaža	a. NE b. DA	a. NE b. DA	a. NE b. DA
17. Infekcije porodnog kanala	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:

18. 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: _____

II. OTAC

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: _____

8. 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: _____

III. DIJETE

OSNOVNI PODACI:

1. Ime i prezime: _____
2. ID broj Biobanke (krv iz pupkovine): _____
3. ID broj Biobanke (tkivo posteljice): _____
4. Datum uzimanja podataka i biouzoraka: _____
5. ID broj majke i oca u Biobanci: _____
6. Datum rođenja: _____
7. Spol: M Ž

8. Porodna težina (g): _____
9. Porodna težina (cm): _____
10. API: _____

11. Prirođene anomalije:
a. NE b. DA / vrsta: _____

12. Infekcije:
a. NE b. DA / vrsta: _____

13. Patohistološki nalaz posteljice: NE/DA

Prilog 2: Anketni upitnik (terminski porod)

BAZA BANKE BIOUZORAKA U SKLOPU ISTRAŽIVANJA PRIJEVREMENIH PORODA (Terminski porod)

I. MAJKA

OSNOVNI PODACI:

1. Ime i prezime: _____
2. ID broj Biobanke: _____
3. Datum uzimanja podataka i biouzoraka: _____
4. MBO: _____
5. OIB: _____
6. Datum i mjesto rođenja: _____
7. Adresa prebivališta: _____
8. 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:

	1. POROD	2. POROD	3. POROD
1. Krv iz pupkovine pohranjena u Biobanci	a. NE b. DA / ID biobanke:	a. NE b. DA / ID biobanke:	a. NE b. DA / ID biobanke:
2. Način začeća	a. prirodno b. asistirano / vrsta:	a. prirodno b. asistirano / vrsta:	a. prirodno b. asistirano / vrsta:
3. Tjedan poroda			
4. Redni broj / interval od zadnje trudnoće			
5. Početak poroda	a. RVP b. trudovi	a. RVP b. trudovi	a. RVP b. trudovi
6. Ginekološke kontrole	a. NE b. DA / broj:	a. NE b. DA / broj:	a. NE b. DA / broj:
7. Psihološki stres <i>(npr. razvod, smrt...)</i>	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:
8. Uzimanje nadmjestaka prije / tijekom trudnoće <i>(npr. folna kiselina, željezo...)</i>	a. NE b. DA / vrsta i razdoblje uzimanja:	a. NE b. DA / vrsta i razdoblje uzimanja:	a. NE b. DA / vrsta i razdoblje uzimanja:
9. Korištenje lijekova <i>(npr. tokolitics, antibiotici...)</i>	a. NE b. DA / vrsta i razdoblje uzimanja:	a. NE b. DA / vrsta i razdoblje uzimanja:	a. NE b. DA / vrsta i razdoblje uzimanja:
10. 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:
11. 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:
12. Komplikacije trudnoće <i>(npr. hipertenzija, krvarenje...)</i>	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:
13. Serklaža	a. NE b. DA	a. NE b. DA	a. NE b. DA
14. Infekcije porodnog kanala	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:	a. NE b. DA / vrsta:

II. OTAC

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: _____

III. DIJETE

OSNOVNI PODACI:

1. Ime i prezime: _____
2. ID broj Biobanke (krv iz pupkovine): _____
3. ID broj Biobanke (tkivo posteljice): _____
4. Datum uzimanja podataka i biouzoraka: _____
5. ID broj majke i oca u Biobanci: _____
6. Datum rođenja: _____ 7. Spol: M Ž
8. Porodna težina (g): _____
9. Porodna težina (cm): _____
10. API: _____
11. Prirođene anomalije:
a. NE b. DA / vrsta: _____
12. Infekcije:
a. NE b. DA / vrsta: _____
13. Patohistološki nalaz posteljice: NE/DA

ŽIVOTOPIS

Ime: Milena
Prezime: Gašparović Krpina
Adresa: Rožmanići 29a, 51221 Kostrena
Tel: 091 563 67 91
E-mail: mlenenakrpina@gmail.com
Datum i mjesto rođenja: 06. srpnja 1979., Rijeka, Hrvatska

ZAPOSLENJE

2022. - Croatia poliklinika - specijalist ginekologije i opstetricije.
2005. - 2022. Klinika za ginekologiju i opstetriciju, Klinički bolnički centar Rijeka -
specijalizant ginekologije i opstetricije, specijalist ginekologije i opstetricije.

ŠKOLOVANJE

1985. - 1993. Osnovna škola "Fran Krsto Frankopan", Punat
1993. - 1997. Gimnazija "Hrvatski kralj Zvonimir" opći smjer, Krk
1997. - 2003. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka
2003. - 2004. Pripravnički staž, Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka
2004. Položeni stručni ispit
2007. - 2014. Specijalizacija iz ginekologije i opstetricije
2013. Poslijediplomski doktorski studij "Biomedicina" Medicinski fakultet Sveučilišta
u Rijeci, Rijeka
2013. Poslijediplomski specijalistički studij „Ginekologija i opstetricija“, Medicinski
fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

AKADEMSKI STUPNJEVI

18. srpnja 2003. doktor medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

ZNANSTVENI STUPNJEVI

2004. - 2007. godine znanstveni novak na Katedri za ginekologiju i opstetriciju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, u nastavnoj bazi Kliničkog bolničkog centra Rijeka
2007. – 2016. godine naslovni asistent na Katedri za ginekologiju i opstetriciju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, u nastavnoj bazi Kliničkog bolničkog centra Rijeka
2016. – 2022. godine asistent na Katedri za ginekologiju i opstetriciju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, u nastavnoj bazi Kliničkog bolničkog centra Rijeka

ZNANSTVENA DJELATNOST

Znanstveni radovi

Gašparović Krpina M, Dević Pavlić S, Mladenović T, Aralica M, Barišić A, Brnčić-Fischer A, Ostojić S, Pereza N. 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;31;25(21):11712.

Barišić A, Pereza N, Hodžić A, **Krpina MG**, Ostojić S, Peterlin B. Genetic variation in the maternal vitamin D receptor FokI gene as a risk factor for recurrent pregnancy loss. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2021;34(14):2221-2226.

Gašparović Krpina M, Barišić A, Peterlin A, Tul N, Ostojić S, Peterlin B, Pereza N. Vitamin D receptor polymorphisms in spontaneous preterm birth: a case-control study. *Croat Med J.* 2020; 31;61(4):338-345.

Barišić A, Kolak M, Peterlin A, Tul N, **Gašparović Krpina M**, Ostojić S, Peterlin B, Pereza N. DNMT3B rs1569686 and rs2424913 gene polymorphisms are associated with positive family history of preterm birth and smoking status. *Croat Med J.* 2020; 29;61(1):8-17.

Dragičević P, **Gašparović Krpina M**. Ektopična trudnoća u ožiljku carskog reza:prikaz slučaja, *Medicina Fluminensis.* 2018; 54(4):413-17.

Smiljan Severinski N, Tramišak Milaković T, Mamula O, **Gašparović Krpina M**. Serumski i folikularni LH, predviđanje trudnoće i asistirana reprodukcija. *Cent Eur J Med.* 2011;6: 691-95.

Marinović D, Žarković Palijan T, Marinović M, **Gašparović Krpina M**, Piglić I, Nikolić H. Obtaining the Child Testimony in the Criminal Proceedings, Coll Antropol. 2010;34(Suppl2): S253-56.

Stručni radovi

Klamidija trahomatis - prikrivena, ali opasna infekcija, Narodni zdravstveni list 2019, 714-715:15-17.

Primjena lijekova u trudnoći, Narodni zdravstveni list 2016, 680-681:15-17.

Placenta previja - predležća posteljica, Narodni znanstveni list 2009, 590-591: 12-13.

Izvanmaterična trudnoća, Narodni znanstveni list 2009, 590-591: 14-15.

Kongresna priopćenja

Barišić A, Kolak M, Peterlin A, Tul N, **Gašparović Krpina M**, Ostojić S, Peterlin B, Pereza N. Gene polymorphisms of DNA methyltransferase 3b in women with spontaneous preterm birth. 2019, 13th Balkan Congress of Human Genetics, April 17th-20th 2019; Edirne, Turkey.

Gašparović Krpina M, Peterlin A, Tul N, Peterlin B, Ostojić S, Pereza N. The FokI polymorphism in vitamin D receptor gene in women with spontaneous preterm birth influences new-born birth weight. Program and abstracts - 10th ISABS conference on forensic and anthropologic genetics and Mayo clinic lectures in individualized medicine. 19.-24.06.2017; Dubrovnik, Hrvatska.

Gašparović Krpina M, Gobić Matejčić J, Milanović M, Haller H. Konzervativno liječenje raka endometrija-prikaz slučaja. IX hrvatski kongres o ginekološkoj endokrinologiji, humanoj reprodukciji i menopauzi. 05.-08.09. 2013; Brijuni, Hrvatska.

Dadić-Hero E, Gašparović Babić S, Glibotić Kresina H, Ružić K, Janković S, **Gašparović Krpina M**, Kretanje anksioznih poremećaja (F40-F48) u desetogodišnjem periodu na području PGŽ u primarnoj zdravstvenoj zaštiti, Prvi hrvatski kongres o prevenciji i

rehabilitaciji u psihijatriji s međunarodnim sudjelovanjem. 04.-06.03. 2010; Sv. Martin na Muri, Hrvatska.

Ružić K, Dadić-Hero E, Glibotić Kresina H, Gasparović Babić S, Janković S, **Gašparović Krpina M**. Kretanje anksioznih poremećaja (F40-F48) u desetogodišnjem periodu na području PGŽ, Prvi hrvatski kongres o prevenciji i rehabilitaciji u psihijatriji s međunarodnim sudjelovanjem. 04.-06.03. 2010; Sv. Martin na Muri, Hrvatska.

Smiljan Severinski N, Mamula O, **Gašparović M**, Vrdoljak Mozetič D. Abnormal Cervical Citology in Infertile Women Eligible for IVF/ET. 14th World Congress on In Vitro Fertilization & 3th World Congress on In Vitro Maturation. September 15th-19th 2007; Montreal, Canada.

Veljković D, Laškarin G, Dupor J, Sršen Medancić S, Juretić Franković K, Mahmutefendić H, **Gašparović M**, Randić Lj, Saito S, Rukavina D, Granulysin expression in peripheral blood and deciduas of the first trimester pregnancy, Abstract book, 2005 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society September 29-October 2, 2005; Božava, Croatia.

Laškarin G, Sršen S, Čupurdija K, Štrbo N, Juretić K, Dupor J, **Gašparović M**, Veljković D, Mantovani A, Randić Lj, Rukavina D. Immunologic role of tumor assisted glycoprotein-72. 25th Anniversary meeting of American Society of Reproductive Immunology, Providence, Rhode Island, June 16-18, 2005, Am J Reprod Immunol 2005; 53:293

Sršen S, Laškarin G, Čupurdija K, Štrbo N, Dupor J, Bogović Crnčić T, **Gašparović M**, Veljković D, Randić LJ, Rukavina D, Tumor associated glycoprotein-72 (TAG-72) binds to mannose receptor on decidual macrophages and enables them to induce interleukin-4 production in naive T cells, Abstract book, P43, p.70. 2004 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, October 8-10, 2004; Opatija, Croatia.

PROJEKTI

Aktivno sudjelovanje u realizaciji znanstvenih projekata

"Varijabilnost gena uključenih u nadzor epigenetičkih modifikacija u idiopatskim ponavljajućim spontanim pobačajima i spontanom prijevremenom porodu" (br. 16.06.2.1.02; Sveučilište u Rijeci; voditeljica: doc. dr. sc. Nina Pereza

"Genska varijabilnost i epigenetički čimbenici u idiopatskim ponavljajućim spontanim pobačajima i spontanom prijevremenom porodu" (br. 17.07.2.1.04; Sveučilište u Rijeci; voditeljica: doc. dr. sc. Nina Pereza

"Imuno-endokrini mehanizmi na majčino-fetalnom spoju tijekom rane trudnoće" (br. 062-0620402-0379) glavnog istraživača prof. dr. sc. Hermana Hallera. Projekt financira Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske, 2007.

"EMBIC - The Control of Embryo Implantation": Studies of gene expression, protein profiles/functions at the uterus embryonic level: cellular and molecular developmental events at the feta/maternal interface - Network of Excellence, Contract number: 512040, LSHM-CT-2004-512040, 1. listopada 2004

"Fenotipske i funkcionalne karakteristike decidualnih limfocita u ektopičnim trudnoćama" (br. 0062080) glavnog istraživača prof. dr. sc. Ljiljane Randić. Projekt financira Ministarstvo znanosti i tehnologije Republike Hrvatske, 2004.

Znanstvene nagrade i priznanja

Priznanje za poster prezentiran na Godišnjem sastanku Hrvatskog imunološkog društva, 8.-10. listopada 2004., Opatija: Sršen S, Laškarin G, Čupurdija K, Štrbo N, Dupor J, Bogović Crnčić T, **Gašparović M**, Veljković D, Randić LJ, Rukavina D, Tumor associated glycoprotein-72 (TAG-72) binds to mannose receptor on decidual macrophages and enables

them to induce interleukin-4 production in naive T cells, 2004 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, October 8-10, 2004; Opatija, Croatia.

STRANI JEZICI

Engleski, njemački i talijanski

ZNANJA I VJEŠTINE

Microsoft Office