

Povezanost polimorfizama gena nasljedne trombofilije s pojavom spontanog pobačaja u žena

Milićević, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:123414>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lucija Milićević

**Povezanost polimorfizama gena nasljedne
trombofilije s pojavom spontanog pobačaja u
žena**

Diplomski rad

Zagreb, 2022

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu medicinu na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Mostaru, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivanke Mikulić te komentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Ivanki Mikulić na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada te ukazanom povjerenju.

Želim se zahvaliti komentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na ljubaznosti, pomoći, susretljivosti i strpljivosti za sva moja pitanja.

Također se zahvaljujem mag. foren. chem. mol. biol. Ani Ćuk na izdvojenom vremenu i pomoći pri izradi diplomskog rada.

Posebno se želim zahvaliti mojim roditeljima te sestri i bratu na neizmjernoj podršci pruženoj tijekom studiranja, povjerenju, razumijevanju. Hvala vam, sve moje probleme i nedoumice tijekom studiranja činili ste lakšim i izdržljivim.

Hvala mojim prijateljima te kolegama koji su mi bili potpora tijekom ovog putovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Povezanost polimorfizama gena nasljedne trombofilije s pojavom spontanog pobačaja u žena

Lucija Milićević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Spontani pobačaj je neizazvana smrt embrija ili fetusa ili izbacivanje produkta začeća prije 20. tjedna trudnoće. Najčešći čimbenici spontanih pobačaja su kromosomske aberacije, endokrinološke, infektivne i imunološke bolesti, anatomske abnormalnosti maternice ili hiperkoagulabilna stanja. Postoji povezanost između nasljedne i stečene trombofilije i brojnih komplikacija u trudnoći, uključujući intrauterini zastoj rasta ploda, spontani pobačaj, preeklampsiju i abrupciju posteljice. Cilj ovog rada bio je istražiti povezanost genskih polimorfizama faktora *V Leiden FVQ506*, faktora *II Protrombin G20210A*, *metilentetrahidrofolat-reduktaza (MTHFR) C677T*, *inhibitora aktivatora plazminogena (PAI-1-) -5675 4G/5G* i faktora *FXIII G103T* kod žena koje su imale spontani pobačaj te ih usporediti s genima žena koje nisu imale spontani pobačaj. Također uspoređene su kombinirane alelne varijante ispitivanih genskih polimorfizama između ispitivane i kontrolne skupine. Prema dobivenim rezultatima nije moguće tvrditi da prisutnost nekog od haplotipova značajno povećava izgled, odnosno vjerojatnost za spontani pobačaj.

Ključne riječi: habitualni pobačaj, nasljedna trombofilija i polimorfizmi
(stranica 48, slika 6, tablica 7, literaturnih navoda 42, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivanka Mikulić

Komentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Izv. prof. dr. sc. Renata Šoštarić

Rad prihvaćen: 08. 09. 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

The association of polymorphisms of hereditary thrombophilia genes with appearance of spontaneous abortion in women

Lucija Milićević

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Spontaneous abortion is the unprovoked death of an embryo or fetus or the expulsion of the product of conception before the 20th week of pregnancy. The most common causes of spontaneous abortions are chromosomal aberrations, endocrinological, infections and immunological diseases, anatomical abnormalities of the uterus or hypercoagulable conditions. There is connection between hereditary and acquired thrombophilia and numerous preeclampsia and placental abruption. The aim of this work was to investigate the association of gene polymorphisms of factor-V *Leiden FVQ506*, factor II *Protrombin G20210A*, *methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T*, *plasminogen activator inhibitor (PAI-1-) -5675 4G/5G* and factor *FXIII G103T* in women who had spontaneous miscarriage and compare them with alleles of the same genes of women who did not have a miscarriage. The combined allelic variants of the tested gene polymorphisms between the tested and control groups were compared as well. According to the obtained results, it is not possible to claim that the presence of any haplotypes significantly increase the probability of spontaneous abortion.

Keywords: habitual abortion, hereditary thrombophilia and polymorphisms
(pages 48, figures 6, tables 7, references 42, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: izv. prof. dr. dc. Ivanka Mikulić

Co-mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Reviewers:

PhD, Full Prof. Nada Oršolić, Assoc.

Prof. Jasna Lajtner, Assoc.

Prof. Renata Šoštarić

Thesis accepted: 08. 09. 2022.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. DIJAGNOSTICIRANJE I LIJEČENJE SPONTANOG POBAČAJA	1
1.2. UČESTALOST SPONTANOG POBAČAJA	2
1.2.1. <i>Uzroci i obrada spontanog pobačaja</i>	3
1.2.2. <i>Anomalije zametka</i>	3
1.2.3. <i>Imunološki uzroci</i>	4
1.2.4. <i>Anomalije maternice</i>	5
1.2.5. <i>Trombofilije</i>	7
1.2.6. <i>Endokrinološki uzroci</i>	8
1.2.7. <i>Okolišni čimbenici</i>	8
1.2.8. <i>Obrada spontanog pobačaja</i>	9
2. TROMBOFILIJA	11
2.1. STEČENA TROMBOFILIJA	12
2.2. NASLJEDNA TROMBOFILIJA	14
2.3. KASKADA ZGRUŠAVANJA KRVI	16
2.2.1. <i>Faktor V Leiden</i>	18
2.2.2. <i>Faktor Protromin II</i>	20
2.2.3. <i>Metilentetrahidrofolat-reduktaza (MTHFR)</i>	20
2.2.4. <i>Inhibitor aktivatora plazimongen PAI-1</i>	22
2.2.5. <i>Stabilizacijski faktor fibrina (faktor XIII)</i>	23
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	24
4. MATERIJALI I METODE	25
4.1. ISPITANICI	25
4.1.1. <i>Materijali</i>	25
4.2. METODE	27
4.2.1. <i>Izolacija genomske DNA</i>	27
4.3. GENOTIPIZACIJA MUTACIJA FAKTOR V LEIDEN, FAKTOR II PROTROMBIN, METILENTETRAHIDROFOLAT-REDUKTAZE, FAKTOR XIII I PAI POMOĆU METODE REAL-TIME (RT-PCR) – LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU	29
4.3.1. <i>Alelna diskriminacija</i>	30
4.3.2. <i>Reagensi za izvođenje Real-time PCR metode</i>	31
4.3.3. <i>Postupak pripreme Real-time PCR reakcijske smjese</i>	32
4.3.4. <i>Uvjeti Real-time PCR reakcije</i>	33
4.3.5. <i>Statistička obrada podataka</i>	34
5. REZULTATI	35
5.1. RASPODJELA ISPITANICA PREMA ISPITIVANOJ I KONTROLNOJ SKUPINI	35
5.2. RASPODJELA ISPITANICA PREMA DOBI	35
5.3. RASPODJELA ISPITANICA PREMA ZASTUPLJENOSTI GENOTIPOVA	36
5.4. ANALIZA POVEZANOSTI HAPLOTIPOVA I GENOTIPOVA IZMEĐU ISPITIVANE I KONTROLNE SKUPINE	37
6. RASPRAVA	40

7. ZAKLJUČAK.....	43
8. LITERATURA.....	44
9. ŽIVOTOPIS.....	48

POPIS KRATICA

β -hCG - humani korionski gonadotropin (engl. *human chorionic gonadotropin*)

FISH - fluorescentna in situ hibridizacija (engl. *fluorescence in situ hybridisation*)

PCR - polimerazna lančana reakcija (engl. *polymerase chain reaction*)

NSG - sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*)

NK stanice - prirodno ubilačke stanice (engl. *natural killer cells*)

uNK - uterine prirodno ubilačke stanice (engl. *uterine natural killer cells*)

HLA - sustav humanog leukocitnog antigena (engl. *human leukocyte associated antigen*)

HLA G - antigen histokompatibilnosti klasa I (engl. *human leukocyte antigen-G class I*)

HLA DR1 - serotip HLA-DR koji prepoznaje proizvode gena DRB1*01 (engl. *HLA-DR1 serotype*)

HLA DR3 - sastoji se od HLA-DR17 i HLA-DR18 podijeljenih antigenskih serotipova (engl. *HLA DR3 alleles*)

PCO - sindrom policističnih jajnika (engl. *polycystic ovary syndrome*)

LH - luteinizirajući hormon (engl. *luteinising hormone*)

FSH - folikularno stimulirajući hormon (engl. *follicle-stimulating hormone*)

HSG - histerosalpingografija (engl. *hysterosalpingography*)

Sono HSG - ultrazvučna histerosalpingografija (engl. *sonohysterography*)

MR - magnetska rezonanca (engl. *magnetic resonance*)

CT - kompjuterizirana tomografija (engl. *computerized tomography*)

DVT - duboka venska tromboza (engl. *deep vein thrombosis*)

VTE - venska tromboembolija (engl. *venous thromboembolism*)

HIV – virus ljudske imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*)

aCL – antikardiolipinska protutijla (engl. *anticardiolipin antibodies*)

LA - lupus antikoagulans antitijela (engl. *lupus anticoagulant antibodies*)

GP - anti- beta2- glikoprotein (engl. *anti-beta2-glycoprotein*)

APC - stanice za predočavanje antigena (engl. *antigen presenting cells*)

tPA - tkivni aktivator plazimnogen (engl. *antigen presenting cells*)

NMH - niskomolekularni heparin (engl. *low molecular weight heparin*)

NFH - niskofrakcionirani heparin (engl. *unfractionated heparin*)

SLE - sistemni eritematozni lupus (engl. *systemic lupus erythematosus*)

HELLP sindrom - razgradnja crvenih krvnih stanic, povišeni jetreni enzimi smanjen broj trombocita (engl. *haemolysis elevated liver enzymes low plateletes*)

UFH - nefrakcionirani klasični heparin (engl. *unfractionated heparin*)

LMWH - heparin male molekularne mase (engl. *low-molecular-weight heparin*)

1. UVOD

Spontani pobačaj je neizazvana smrt embrija ili fetusa ili izbacivanje produkta začeća prije 20. tjedna trudnoće. Krvarenje u trudnoći predstavlja stanje čija se etiologija tek treba ispitati. Neki od uzroka krvarenja su lokalna upala, trauma, rak te varikozitet (proširene površne vene u nogama). Zapravo, krvarenje je najčešće najraniji znak prijetjećeg pobačaja, jednog od tipova spontanog pobačaja. Prijeteći pobačaj (lat. *ab. imminens*) karakteriziraju grčevi u trbuhu s vaginalnim krvarenjem te predstavljaju opasnost spontanog pobačaja. Spontani pobačaj ima nekoliko tipova. Jedan od njih je započeti pobačaj (lat. *ab. incipiens*) prilikom kojeg se materični vrat skraćuje i otvara. Zatim, pobačaj u tijeku (lat. *ab. in tractu*) gdje u cervikalnom kanalu nalazimo otvoren materični vrat, plod ili dijelove ploda. Nepotpuni pobačaj (lat. *ab. incompletus*) karakterizira stanje otvorenog materičnog vrata u materištu te zaostali dijelovi ploda ili posteljice. Također, jedan od tipova spontanog pobačaja je potpuni pobačaj (lat. *ab. comepleteus*) gdje se uočava zatvoren materični vrat te prazno materišće. Habitualni pobačaj je pobačaj (lat. *ab. habituale*) uslijed kojeg dolazi do ponavljajućih gubitaka dvije ili više trudnoća. Habitualni spontani pobačaj može biti primarni ili sekundarni. Trudnoću koju nije moguće iznijeti do trenutka kada je plod podoban za preživljavanje nazivamo primarni habitualni pobačaj. Sekundarni habitualni pobačaj podrazumijeva spontane pobačaje koji se periodično pojavljuju s trudnoćama u kojima se može iznijeti plod do vremena kada je on podoban za preživljavanje (Đelmiš i sur. 2014).

1.1. Dijagnosticiranje i liječenje spontanog pobačaja

Žene koje se susreću s komplikacijama u ranoj trudnoći podvrgnute su transvaginalnom ultrazvuku. On se temelji isključivo na morfološkim izgledima trudnoće ne uključujući nalaz cerviksa ili količinu vaginalnog krvarenja. Biokemijski biljezi koriste se za potvrdu dijagnoze ranog neuspjeha trudnoće kod pacijentica kod kojih ultrazvučni nalazi nisu odgovarajući. Jedan od njih je humani korionski gonadotropin β -hCG (engl. *human chorionic gonadotrophin*) čija koncentracija se udvostručuje u periodu od prvog do 35. dana trudnoće. Nije moguće upotrijebiti apsolutne koncentracije hormona za razlučivanje živih od neodrživih trudnoća. Kod prijetjećeg pobačaja ultrazvučni nalaz je uredan skupa s β -hCG vrijednostima ako je plod živ. Tijekom započetog pobačaja vrijednosti β -hCG te ultrazvučni nalaz su uredni ali samo u slučaju živog ploda. Za pobačaj u tijeku karakteristične su niže vrijednosti β -hCG a, dijelovi ploda u maternici

ultrazvučnim pregledom se mogu, ali i ne moraju vidjeti. Vrijednosti β -hCG su niže nego inače za vrijeme nepotpunog pobačaja. Specifičnost potpunog pobačaja jest nemogućnost uočavanja ploda u materištu ultrazvučnim pregledom te niža vrijednost β -hCG. Trudnoću s prijetećim pobačajem skupa s trudnoćom s započetim pobačajem moguće je zadržati u slučaju ako je plod živ. Postupak liječenja takvih trudnoća temelji se na primjeni gestagenskih preparata¹ koji opuštaju maternicu uz mirovanje. Za ostale tipove pobačaja specifična je primjena lijekova te kirurške metode. Za trudnoće do 12. tjedna potrebna je primjena lijekova ili kiretaža. Najčešće korišten lijek je analog prostaglandina misoprostol koji uzrokuje trudove te potiče odstranjivanje tkiva ploda iz maternice. Može se primjenjivati u jednoj ili više doza. Može se koristiti oralno, vaginalno, sublingvalno ili rektalno. Lijekovi djeluju na način da sprječavaju djelovanje progesterona koji ima važnu ulogu u održavanju te razvoju trudnoće. Također se smatra da mifepriston, koji predstavlja postkoitalni kontraceptiv pojačava učinke prostaglandina. Međutim ispitivanja su pokazala da mifepriston nije toliko uspješan u usporedbi s misoprostolom. Drugi postupak je kiretaža. Prvi korak kiretaže zahtjeva proširenje vrata maternice. Taj se postupak vrši Hegarovim štapićima, nakon toga se kliještima odstrani umrli plod i posteljica te se zatim kiretom provjeri je li materišta prazno (Jurkovic i sur. 2013).

1.2. Učestalost spontanog pobačaja

Procjenjuje se da otprilike 13% trudnoća u periodu do predviđenog termina poroda završavaju gubitkom fetusa, odnosno spontanom pobačajem. Eksperimentalni dokazi doveli su do spoznaje da promijenjeni endometrij zapravo djeluje kao biosenzor kvalitete embrija te prilikom narušavanja kvalitete dolazi do umetanja embrija podobnog za pobačaj (Larsen i sur. 2013). Fetalne kromosomske abnormalnosti smatraju se jednim od glavnih uzroka gubitka trudnoće tijekom prvog tromjesečja. Dugoročnost embrija može se narušiti stanicama s nedovoljnim brojem kromosomskih kopija te strukturnim preuređenjem kromosoma. Za veliki postotak pobačaja i malformacijskih poremećaja odgovorne su kromosomske disfunkcije (Viotti 2020). Što je vremenski period trudnoće kraći veća je mogućnost gubitka trudnoće spontanom pobačajem. Pretpostavlja se da su najveći gubitci trudnoće u periodu predimplantacijskog embrija i u ranoj fazi implantacije. Predklinički implantirane trudnoće imaju gubitke oko 19%, dok kliničke trudnoće imaju gubitak

¹ Gestageni su umjetno proizvedene inačice progesterona hormona druge faze menstruacijskog ciklusa.

oko 12%. Jedno od objašnjenja čovjekove niže fertilne mogućnosti jest velika učestalost spontanih pobačaja. Vjerojatnost pobačaja u narednoj trudnoći kod žene koja već ima djecu, a u bližoj prošlosti je namjerno pobačivala te je uz to imala jedan spontani pobačaj je 4-6%. Vjerojatnost pobačaja u sljedećoj trudnoći kod žene koja je imala jedan spontani pobačaj, a nema djecu ili je zadnja trudnoća rezultirala spontanim pobačajem je 19-46%. Žene koje u svojoj anamnezi imaju tri ili više neuspjelih trudnoća rizik od ponovne neuspjele trudnoće iznosi oko 30-40%. Na primjeru tih žena šansa za dobitak živog djeteta jest 60-70% (Đelmiš i sur. 2014).

1.2.1. Uzroci i obrada spontanog pobačaja

Razlozi zbog kojih dolazi do spontanog pobačaja su brojni, a najvažniji su:

- anomalije zametka
- imunološki uzroci
- anomalije maternice
- trombofilije
- endokrinološki uzroci
- okolišni čimbenici

1.2.2. Anomalije zametka

Malformacije fetusa uočene su u 85% slučajeva s ranim kliničkim pobačajem. Pretpostavlja se da oko 75% fetusa posjeduje abnormalni kariotip. Također česta pojava su fetalne kromosomske aneuploidije koje su rezultat nenasljednih događaja. Nedavna istraživanja su uz pomoć komparativne genomske hibridizacije došla do zaključka da više od 90% kromosomskog kompleta svih blastomera u ljudskim embrijima ima barem jednu kromosomsku abnormalnost u jednoj ili više stanica prije implantacije. Uz to, otkriveno je da neke aneuploidije mogu biti sposobne preživjeti do termina, ali će većina fetusa s poremećenim razvojnim nedostacima umrijeti u maternici (Larsen i sur. 2013). Anomalije i oštećenja zametka česta su kod parova s habitualnim pobačajima kromosomskih aberiranih plodova. Susreću se s manjkom jednog X-kromosoma, poliploidijom te autosomnom trisomnijom. Metode poput *in situ* hibridizacije FISH (engl. *fluorescence in situ hybridisation*) te PCR (engl. *polymerase chain reaction*) imaju mogućnost otkrivanja anomalija pojedinih gena ili pogreške mejoze, koju kariotipizacija ne može otkriti.

Blastocista je odgovorna za izražavanje kromosomskih anomalija zbog svoje nepravilne diferencijacije. Zapravo dolazi do nemogućnosti razvijanja embrioblasta, za razliku od trofoblasta čije razvijanje u početku teče normalno. Uz pomoć ultrazvuka moguće je prijevremeno prepoznavanje takvih trudnoća (Đelmiš i sur. 2014). S napretkom tehnologije, danas se može izolirati cirkulirajuća DNA već od 7. tjedna gestacije. Objavljena su brojna istraživanja u kojima korištene tehnike sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*) NSG omogućuju otkrivanje fetalnih aneuploidija u fetalnoj DNA. Buduća istraživanja pridonijet će novim saznanjima kromosomskih abnormalnosti te pojedinačnih genskih poremećaja kao uzroka habitualnih spontanih pobačaja (Larsen i sur. 2013).

1.2.3. Imunološki uzroci

Plod nosi dio očevih transplantacijskih antigena koji su strani majci. Tijekom 9. mjeseci fetus živi u majci, dok majka presatke fetusa ili tikvo oca odbaci za nekoliko tjedana. Također majka je senzibilirana na fetusne antigene i fetus izražava sve antigene odrasle osobe i majke. Zaštitini ili imunoregulacijski čimbenici koji štite fetus, odgovorni su za neodbacivanje fetusa. Posljedica imunoreakcije majke na fetus kod nekih žena može biti razlog učestalih spontanih pobačaja. Dugo vremena postavljalo se pitanje zašto dolazi do imunološkog odbacivanja usađenog embrija u maternici bez obzira što nosi proteine kodirane očevim genima. Dva su mehanizma zbog kojih dolazi do imunološkog odbacivanja ploda. Prvi predstavlja prodor majčinih limfocita u fetalnu cirkulaciju te njihovo izravno djelovanje na fetus. Drugi predstavlja djelovanje majčinih efektor na fetalni trofoblast te za posljedicu ima disfunkciju i smrt fetusa. Fetoplacentarna prepreka ne propušta majčine limfocite u cirkulaciju fetusa stoga čini glavnu ulogu u obrani protiv prvog mehanizma. U slučaju minimalnog broja majčinih limfocita ili njihove potisnute reaktivnosti pomoću fetalnih nespecifičnih supresijskih stanica, u normalnoj trudnoći moguć je njihov prolazak u fetalnu cirkulaciju i obratno. Navedeni mehanizmi onemogućuju djelovanje limfocita T. Zaštitu od djelovanja NK stanica (engl. *natural killer cells*) i limfocita T pripisuje se imunoregulacijskim (supresijskim) limfocitima. Nalaze se na placentarno-fetusnoj granici i imaju slično djelovanje kao periferne imunoregulacijske stanice. Također uterine NK-stanica uNK (engl. *uterine natural killer cells*) koje nalazimo u decidui u prva dva trimestra trudnoće čine više od 30% svih limfocita. Njihovu citotoksičnu aktivnost obuzdavaju neklasične molekule HLA-sistem leukocitnih antigena

(engl. *human leukocyte associated antigen*) odnosno molekule HLA-G (engl. *human leukocyte antigen-G class I*) aktivirajući inhibicijske receptore uNK. Međutim dokazano je da uNK-stanice imaju važnu ulogu u angiogenezi i rastu trofoblata i posteljice. Posljedica čestih pobačaja u preeklampsiji pripisuje se smanjenom djelovanju uNK-stanica. Dva su glavna razloga zbog kojih se fetus tolerira: položaj odnosno imunoprivilegirano mjesto gdje mu zaštitu pruža slabo imunogenična preprjeka i potiče lokalnu imunoregulacijsku reakciju majke (Andreis i sur. 1998). Brojna istraživanja objasnila su da povećane koncentracije proupalnih ili T pomoćnih stanica tipa I citokina mogu se pronaći kod žena s euplođinim sporadičnim pobačajem kao i kod žena s habitualnim spontanim pobačajem. Postoje dokazi da NK-stanice maternice imaju ulogu u implantaciji i ranoj trudnoći zbog njihove kontrole angiogeneze u endometriju žene koja nije trudna. Unatoč tome nije otkrivena aktivnost NK-stanica periferne krvi ili maternice kod pacijentica s habitualnim spontanim pobačajem (Larsen i sur. 2013) Postoje različiti uzroci imunoloških poremećaja pri prepoznavanju i toleranciji antigena stranog fetalnog tkiva. Neki od njih su povezani s majčinim imunološkim sustavom u trudnoći koji nije sposoban za normalnu prilagodbu tj. dolazi do nenormalnog imunološkog odgovora na fetalne antigene. Normalna ekspresija HLA-G antigena na stanicama citotrofoblata i sinciotrofoblata nije prisutna u trudnoći. Također u trudnoći imunosna zaštita sijalomucinom je u izostanku. Žene sa specifičnim HLA haplotipom skupine II u koju spadaju HLA DR1 (engl. *HLA-DR1 serotype*) i HLA DR3 (engl. *HLA DR3 alleles*) nemaju mogućnost implantacije embrija. Implantacije je onemogućena zbog aktivacije decidualnih T-pomoćnih stanica. Zadaća tog haplotipa je stvaranje inhibitora rasta trofoblata u koje ubrajamo interleukin 2 i interferon γ . Zapravo inhibitori rasta trofoblata onemogućuju implantaciju embrija. Više od 80% neobjašnjivih primjera habitualnih spontanih pobačaja veže se za imunološke uzročne čimbenike. Dva najpoznatija primjera koji objašnjavaju nastanak imunogenih habitualnih pobačaja su autoimunosni i aloimunosni čimbenici (Đelmiš i sur. 2014).

1.2.4. Anomalije maternice

Stечene i urođene anatomske abnormalnosti maternice također su odgovorne za spontane pobačaje. Karakteristike maternice povezane sa gubitkom trudnoće u prvom i drugom tromjesečju uključuju prijevremeni porođaj te povećanu stopu porođaja carskim rezom. Maternica s pregradom (lat. *uterus septus*) jedna je od abnormalnosti maternice koje povezujemo s habitualnim spontanim

pobačajem. Nastaje zbog neuspjele resorpcije tkiva koje povezuje dva Mullerova kanala. Mullerovi kanali se spajaju, ali na mjestu spajanja ostaje pregrada koja djelomično ili potpuno dijeli šupljinu maternice na dvije polovice. Sedlasta maternica (lat. *uterus arcuatus*) u obliku luka najblaži je oblik nepotpune resorpcije. Djelomično pregrađena maternica proteže se od vrha endometrijske šupljine prema cerviksu i dovodi do djelomične podjele šupljine maternice. Za razliku od djelomičnog septuma kod potpunog septuma dolazi do unutarnjeg cervikalnog zrna koji dijeli šupljinu maternice na dva dijela. Fibromuskularno tkivo čini septum. Do septuma dolaze manje količine krvi što rezultira lošom implantacijom te za posljedicu ima gubitak trudnoće. U kasnijim stadijima trudnoće septum može smanjiti raspoloživi prostor za rast i uzrokovati pobačaj ili prijevremeni porod. Dvoroga maternica (lat. *uterus bicornis*) također je jedna od anomalija koja dovodi do spontanog pobačaja. Nastaje kao posljedica nepotpune fuzije Mullerovih kanala te maternica ima dvije šupljine odnosno dva roga. Prisutan je samo jedan vrat maternice i jedna rodnica. Žene s dvorogom maternicom imaju veće izgleda za gubitak trudnoće u prvom i drugom tromjesečju. Jednoroga maternica (lat. *uterus unicornis*) nastaje kao posljedica formiranja samo jednog Mullerovog kanala. Uz to, jednoroga maternica manja je od normalne maternice te ima samo jedan jajovod. Rjeđa je anomalija, također povezana s lošim ishodom trudnoće. Loše ishode trudnoće te porođajne komplikacije najviše vežemo uz septiranu i dvorogu maternicu. Miomi maternice, polipi endometrija i intrauterine adhezije smatraju se stečenim malformacijama te pridonose habitualnim spontanim pobačajima. Submukozni miomi povezuju se sa smanjenom plodnošću te njihovo uklanjanje poboljšava stope trudnoće. Intramuralni miomi dovode do deformacije stijenke maternice, veći su od 5 cm, imaju negativan učinak na koncepciju i ostvarivanje trudnoće te povećavaju rizik od spontanog pobačaja. Subserozni miomi nemaju negativan utjecaj na plodnost niti na reproduktivni potencijal žena. U konačnici miomi dovode do smanjene mogućnosti implantacije zametka u maternici, uzrokuju upalu endometrija, povećavaju kontraktilnost maternice te deformiraju stijenku maternice. Polipi endometrija pronađeni su kod žena s ponavljajućim spontanim pobačajem, no međutim nema jasnih dokaza povezanosti s gubitkom trudnoće. Zbog nedovoljnog endometrija za potporu fetoplacentarnog rasta intrauterine adhezije dovode do gubitka trudnoće. One mogu biti posljedica intrauterine operacije kao što su dilatacija i kiretaža, histeroskopija ili miomektomija kao posljedica ulaska u šupljinu maternice. Zapravo dolazi do poremećaja bazalnog sloja endometrija koje za posljedicu stvara granulacijsko tkivo. Granulacijsko tkivo stvara guste adhezije na suprotnim stijenkama maternice. Stijenke maternice sraštavaju,

šupljina se zatvara te dolazi do menstrualnih nepravilnosti, cikličke boli u zdjelici, neplodnosti i habitualnih spontanog pobačaja. U dijagnostičiranju prirodnih ili stečenih anomalija maternice najvažniju ulogu ima ultrazvuk. Razlikujemo dvodimenzionalni 2D ultrazvuk koji daje uvid u stanje maternice te 3D ginekološki ultrazvuk koji nam osigurava trodimenzionalni prikaz maternice i pripadajućih organa omogućujući otkrivanje prirodnih ili stečenih malformacija maternice (Turocy i Rackow 2019).

1.2.5. Trombofilije

Cirkulacija koja predstavlja protok krvi kroz krvožilni sustav važna je za održavanje nepromijenjenog stanja krvožilnog sustava, osiguravanje krvi u tekućem stanju te protok krvi u odgovarajućem smjeru. U slučaju narušavanja vitaliteta krvožilnog sustava krv će curiti u tekućem obliku i nestati iz cirkulacije. Kako bi se to zaustavilo doći će do složenog sustava koagulacije koji će formirati krvni ugrušak s ciljem sprječavanja curenja krvi iz krvožilnog sustava. Mehanizam koagulacije ne smije se aktivirati unutar netaknutog krvožilnog sustava kako bi se spriječio ili ograničio sustav koagulacije. Hiperkoagulabilno stanje koje ima veću tendenciju sklonosti ka zgrušavanju krvi predstavlja trombofiliju. Trombofilija je naziv za različitu skupinu nasljednih i stečenih poremećaja zgrušavanja krvi koji su povezani sa sklonošću trombozi. Stanja poput habitualnog spontanog pobačaja, gubitak fetusa, abrupcija posteljice, intrauterino ograničenje rasta i preeklampsija predstavljaju manifestacije trombofilije. Čimbenici koji imaju važnu ulogu u stvaranju tromboze kod žena uključuju oralnu kontracepciju, hormonsku nadomjesnu terapiju, trudnoću i puerperij (lat. *puerperium*, postporođajno ili postnatalno razdoblje) (Blickstein 2006). Pretpostavlja se da uzrok placentalne insuficijencije tj. smanjena opskrba majke krvlju ima uporište upravo u trombofiliji, koja uzrokuje trombozu krvnih žila posteljice te dolazi do usporavanja transformacije spiralnih arterija u uteroplacentne krvne žile. Do pobačaja, umiranja djece unutar maternice dolazi zbog stečenih protutijela poput lupusnog antikoagulansa i antifosfolipidnog protutijela koja dovode do trombofilije i ranije spomenutih neželjenih posljedica. Također, nasljedna trombofilija može dovesti do poremećaja zgrušavanja krvi i posljedično spontanog pobačaja u drugom tromjesečju zbog mutacije gena faktora *V Leiden*, prirodene otpornosti prema aktiviranom čimbeniku C, manjka antitrombina III, proteina S ili proteina C (Đelmiš i sur. 2014).

1.2.6. Endokrinološki uzroci

Nakon oplodnje očuvanje trudnoće ovisi o endokrinološkim faktorima koji utječu na pravilan rast i razvoj fetusa. Prema procjeni 8 do 12% gubitaka trudnoće rezultat su endokrinoloških čimbenika. Maternica prolazi kroz brojne promjene tijekom trudnoće zbog stimulacije estrogenom te progesteronom u ranoj fazi tj. tijekom predimplantacijskog razdoblja. Uspješna implantacija te normalan tijek trudnoće kontroliran je progesteronom. Manjak žutog tijela (lat. *corpus luteum*) može se pripisati neadekvantom lučenju progesterona koji u konačnici utječe na ishod trudnoće stvarajući hiperprolaktinemiju, sindrom policističnih jajnika PCO (engl. *polycystic ovary syndrome*) te nedostatak lutealne faze. Žuto tijelo sintetizira progesteron, no nakon 7. tjedna trudnoće njegova sposobnost sinteze progesterona je znatno manja nego na početku. Do pobačaja će doći ako se žuto tijelo ukloni prije 8. tjedna trudnoće. Stres, gubitak težine, hiperprolaktinemija, menstrualni ciklusi neki su od razloga nedostatka lutealne faze. Visoke količine prolaktina mogu ometati funkcije žutog tijela. Za normalan rast i razvoj fetusa u ranoj trudnoći važnu ulogu imaju normalne razine prolaktina. Pretpostavlja se da uzroci habitualnih pobačaja kod pacijentica sa sindromom policističnih jajnika imaju nekoliko povezanih čimbenika koji uključuju pretilost, hiperinzulinemiju, inzulinsku rezistenciju, slabu receptivnost endometrija te povišene koncentracije luteinizirajućeg hormona LH (engl. *luteinising hormone*) i androgena. Upravo povišene koncentracije LH kod pacijentica s policističnim jajnicima mogu utjecati na reproduktivni ishod kod ranih trudnoća. Prekomjerna proizvodnja hormona štitnjače obično nije povezana s nepolodnošću i sa spontanim pobačajima. Također jedan od razloga koji pridonosi nastanku spontanog pobačaja može imati uporište u kvaliteti i količini oocita kod žena (Arredondo i Noble 2006). Za gubitak trudnoće uz manjak tj. insuficijenciju žutog tijela također su odgovorne visoke vrijednosti LH, niže vrijednosti folikularno stimulirajućeg hormona FSH (engl. *follicle-stimulating hormone*) kada dolazi do nepravilne folikularne faze te povišena koncentracija androgenih hormona u serumu tzv. hiperandrogenemija. Kao posljedica imamo manje vrijednu oocitu koja može dovesti do manje vrijednog ploda (Đelmiš i sur. 2014).

1.2.7. Okolišni čimbenici

Okolišni čimbenici (kemijski i fizički) mogu narušiti hormonalnu i fiziološku ravnotežu u trudnoći. Otrovne tvari iz okoliša nakupljaju se u masnom tkivu i kao posljedica dolazi do promjene ravnoteže. Ionizirajuće zračenje, antineoplastični lijekovi te veća izloženost teškim metalima,

posebice živi, utječu na spontani pobačaj. Također utjecaj okolišnih čimbenika djeluje na hormone neophodne za održavanje trudnoće tj. na progesteron i estrogen, no međutim potrebna su daljnja ispitivanja kako bi se znanje o tome moglo proširiti i pružiti konkretne dokaze (Weselak i sur. 2008).

1.2.8. Obrada spontanog pobačaja

U slučaju habitualnog pobačaja kod osoba mlađe životne dobi preporučuje se prekonceptijska obrada te obrada tijekom prvog trimestra iduće trudnoće nakon dviju trudnoća. Žene koje imaju iznad 35. godina sa spontanim pobačajem, nužna je prekonceptijska obrada nakon jednog spontanog pobačaja. Potrebno je pregledati anamnezu pacijentice uz detaljan ginekološki pregled. Preporučuje se testiranje ostalih članova obitelji u slučaju da postoji dijete s kromosomskim abnormalnostima. Važno je preispitati je li bilo prijašnjih kiretaža koje su dovele do stvaranja priraslica odnosno sinehija, je li došlo do pojave mliječnog iscjedka iz dojke odnosno galaktoreje, te endokrinopatije odnosno sindroma policističnih jajnika s posljedicom nepravilnosti menstrualnog ciklusa. Potrebno je provjeriti postoji li pozitivna obiteljska anamneza smrtnih slučajeva od venskih ili arterijskih tromboza. Važnije pretrage uključuju kariogram supružnika, pregled genoma oocita i spermija, obradu maternice te određivanje učinkovitosti štitnjače. Obrada maternice uključuje ispitivanje prohodnosti jajovoda histerosalpingografijom HSG (engl. *hysterosalpingography*) ili ultrazvučnom histerosalpingografijom sono HSG (engl. *sonohysterography*) dijagnostičkom metodom. Također obrada maternice podrazumijeva laparoskopiju (engl. *laparoscopy*) koja predstavlja operativni zahvat te zahtjeva opću anesteziju. Laparoskopija se preporučuje kod žena u kojih postoji sumnja na endometriozu. Histeroskopija je još jedan od načina obrade maternice koji pruža detaljan pregled unutrašnjosti maternice. Ultrazvuk je glavna metoda pregleda i probira pacijentica i patoloških trudnoća. Međutim u slučaju nejasnoća ili potrebe za boljim prikazom pojedinih struktura pacijentica se upućuje u radiološku ordinaciju na pregled magnetskom rezonancom MR (engl. *magnetic resonance*) ili kompjuteriziranom tomografijom CT (engl. *computerized tomography*). Također se preporučuje određivanje lupusnog antikoagulansa i antikardiolipinskih antitijela. Lupusni antikoagulans je test koji služi za detekciju antitijela koja povećavaju rizik od nastajanja tromba. Antikardiolipinska antitijela određuju se skupa s parametrima stečene trombofilije kao pomoć u dijagnostici tromba. Nakon navedenih pretraga te urednog kariograma supružnika, mogućnost trudnoće nakon habitualnih spontanih

pobačaja dalje ovisi o životnoj dobi žene, broju neuspjelih prijašnjih trudnoća te sprječavanja, prepoznavanja i liječenja svih bolesti i patoloških stanja koji mogu ugroziti trudnoću. Upravo dob trudnice ima bitniju ulogu te se pretpostavlja da su starije trudnice sklonije pobacivanju zdravog i bolesnog ploda. Razlog toga je slabija kvaliteta oocita te su oocite starije. Uz to slabija je prijemljivost odnosno receptivnost endometrija te sustav žlijezda s unutarnjim izlučivanjem tj. endokrini sustav (Đelmiš i sur. 2014).

2. TROMBOFILIJA

Trombofilija je poremećaj koagulacije krvi sa povećanom sklonosti zgrušavanju. Razlikujemo nasljednu i stečenu trombofiliju. Rizici trombofilije su duboka venska tromboza DVT (engl. *deep vein thrombosis*) te venska tromboembolija VTE (engl. *venous thromboembolism*). Nastaje krvni ugrušak tj. tromb u veni koji dovodi do njenog začepljenja. Rizik za trombozu znatno je povećan kod pozitivne anamneze prethodnog VTE-a ili preboljelog VTE-a u bliskih srodnika ispod 50. godina (Dautaj i sur. 2019). Trombofilija predstavlja učestalu pojavu kod trudnica. Trudnoća je hiperkoagulabilno stanje zbog promjena koje se događaju u sustavu koagulacije krvi, zbog čega ona postaje sklona zgrušavanju. Dolazi do povećanja koncentracije faktora zgrušavanja, trombina i fibrinogena ali se u krvi smanjuje koncentracija čimbenika koji inhibiraju koagulaciju. Stoga se trombofilija može ispoljiti prvi put tijekom trudnoće (Blickstein 2006). Opasnost za VTE u trudnoći veća je oko 6. puta u odnosu na žene koje nisu trudne. Također predstavlja važan uzrok mortaliteta kod žena tijekom trudnoće i postporođajnog razdoblja odnosno puerperija. Intrauterini zastoj rasta, abrupcija posteljice, preeklampsija te rani i kasni spontani pobačaj posljedice su stečene i nasljedne trombofilije. (Sanchez Carpio i sur. 2004). Nasljednoj trombofiliji pripisujemo mutacije gena faktora *V Leiden*, nedostatak antitrombina III, nedostatak proteina C ili S, nedostatak glikoproteina bogatog histidinom te mutacije gena faktora *II Protrombin* te homozigotna mutacija *C677T* za gen *metilentetrahidrofolat- reduktazu (MTHFR)* koji uzrokuje hiperhomocistinemiju. To je stanje za koje je karakteristična povišena vrijednost homocisteina u krvi. U stečenu trombofiliju ubrajamo sindrom antifosfolipidnih antitijela, trombocitopeniju induciranu heparinom, zloćudne tumore, operacije posebice ortopedske, zatajenje srca, lijekove, traumu, trudnoću, hormonsku nadomjesnu terapiju, upotrebu oralnih kontraceptiva, pretilost i pušenje (Đelmiš i sur. 2014). Tromb se može pojaviti na neobičnim mjestima kao što su splahnhičke vene, cerebralne vene te vene retine. Tromboza može biti asimptomatska do odrasle dobi te rekurentna odnosno tromboza koja će se pojaviti u periodima do 30. godine života (Dautaj i sur. 2019). Potvrđena je poveznica između kasnog gubitka novorođenčadi i trombofilije. Štetan učinak na embironalni razvoj tijekom ranih faza trudnoće može se pripisati smanjenoj oksigenaciji. Za vrijeme unutarmateričnog razvoja urezivanje trofoblata u intervilozne prostore posteljice dolazi do smanjene opskrbe kisika smanjujući uteroplacentnu cirkulaciju. Također, na smanjenu opskrbu kisika i uteroplacentnu cirkulaciju negativno djeluje i majčina trombofilija. (Đelmiš i sur. 2014). Za otkrivanja nasljedne trombofilije testovi primarne prevencije uključuju ispitivanje mutacije gena faktora *V Leiden*,

faktora *II Protrombin*, antitrombina III, proteina C i proteina S. Najčešće promjene koje imaju i najveću kliničku vrijednost smatraju se mutacije gena faktora *V Leiden* te faktora *II Protrombin*. Te su mutacije opažene u oko 50-60% slučajeva (Đelmiš i sur 2014). Žene s mutacijom gena faktora *V Leiden* imaju povećan postotak rizika od unutarmaterične smrti ploda ili poroda mrtvog fetusa. Međutim evidentirano je da habitualnih pobačaji nisu izravno povezani s mutacijom (Yamada i sur. 2001). Istraživanja su pronašla povezanost između 17% trudnica kod kojih je identificirana VTE i mutacije gena faktora *II Protrombina* (McNamee i sur. 2012). U znatno manjem postotku pronalazimo poremećaje na razini proteina S proteina C i antitrombina III. Sve su navedene promjene odgovorne za oko 50% VTE-a u trudnica. Česta promjena koja dovodi do porasta koncentracije homocisteina jest homozigot polimorfizma za gen *MTHFR*. Naime navedena promjena ne povećava rizik za VTE ni u trudnica ni u ostaloj populaciji pa se ne preporučuje testiranje polimorfizma gena *MTHFR-a*. Polimorfizam za gen *inhibitora aktivatora plazminogena PAI-1* nema veliku kliničku važnost, usprkos većoj prevalenciji čak oko 50%. Poremećaji u trudnoći te preeklampsija za sad nemaju uzroke u spomenutim genotipovima. Ne postoje retrospektivna ni klinička istraživanja koje bi sa sigurnošću mogle potvrditi povezanost između nasljednih trombofilija i spontanih pobačaja, ili mrtvorodenog fetusa (Đelmiš i sur. 2014).

2.1. Stečena trombofilija

Glavni stečeni poremećaji povezani s trombofilijom uključuju sindrom antifosfolipidnih protutijela koji je najčešće povezan s venskim i arterijskim trombozama, trajno ili prolazno povišene razine prokoagulantnih faktora, niže razine prirodnih antikoagulansa. Virus ljudske imunodeficijencije HIV (engl. *human immunodeficiency virus*) također je jedan od oblika stečene trombofilije. Testiranje kod stečene trombofilije pogoduje na način da pomaže u određivanju trajanja antikoagulacijske terapije nakon tromboze (Stevens i sur. 2016). Najčešći oblik stečene trombofilije je antifosfolipidni sindrom koji predstavlja stečeni autoimuni poremećaj manifestiran trombotičkim ili opstetričkim događajima. Trombotički antifosfolipidni sindrom karakteriziran je venskom i arterijskom trombozom, dok je opstetrički antifosfolipidni sindrom karakteriziran gubitkom ploda u trudnoći nakon 10. tjedna gestacije, ranim habitualnim pobačajima, intrauterinim ograničenjem rasta te teškom preeklampsijom. Karakteristika ove bolesti je povišena razina specifičnih antifosfolipidnih protutijela u krvi (antikardiolipinskih protutijela –aCL, engl.

anticardiolipin antibodies), lupus antikoagulans antitijela -LA (engl. *lupus anticoagulant antibodies*) anti-beta2-glikoprotein -GP (engl. *anti-beta2-glycoprotein*) (Campello i sur. 2019). Dijagnoza antifosfolipidnog sindroma postavlja se ako postoji barem jedan od laboratorijskih protutijela identificirano u dva ili više navrata. Antifosfolipidna protutijela usmjerena su protiv fosfolipida, tj. molekula od kojih su izgrađene membrane naših stanica i koje se normalno nalaze u krvi. Pojačana regulacija ekspresije protrombotičke adhezije molekula na površini stanice dovest će do narušavanja aktivnosti APC-a (engl. *antigen presenting cells*) i hipofibrinolize. Za posljedicu imamo smanjenu aktivnosti tkivnog aktivatora plazminogena-tPA (engl. *tissue plasminogen activator*) te aktivaciju komplemenata. Razine antikoagulantnih čimbenika kontrolirane su genetski, iako mogu biti pod utjecajem dobi i stečenih čimbenika rizika. Stečeni čimbenici rizika za trombozu među kojima ubrajamo trudnoću, hormonsku terapiju, rak, nefrotski sindrom povezani su sa smanjenom razinom antikoagulantnih čimbenika. Uočena je hiperkoagulabilnost u trudnoći zbog povećane razine fibrinogena, faktora VII, VIII, X. Kao glavni uzroci hiperkoagulabilnosti navode se endotelna disfunkcija, leukocitoza, aktivacija vaskularnih stanica, visoka razina trombocita, stvaranje trombina, te povišena viskoznost plazme. Niskomolekularni heparin NMH (engl. *low molecular weight heparin*) i aspirin kao preventivna mjera primjenjuju se u trudnica s antifosfolipidnim sindromom. Danas je primjena NMH-a terapija izbora. Međutim primjena NMH-a sa sobom nosi niz problema u koje ubrajamo cijenu liječenja, neugodnost i neprikladnost liječenja, trombocitopeniju, opasnost od krvarenja te kožne reakcije. Također se u liječenju antifosfolipidnog sindroma u trudnica primjenjuje i nefrakcionirani heparin NFH (engl. *unfractionated heparin*) Zbog njegove učinkovitosti te sigurnosti za fetus smatra se dobrom terapijom. Tijekom trudnoće ne preporučuje se uporaba varfarina. Naime on prolazi kroz posteljicu te za posljedicu uzrokuje oštećenje i krvarenje ploda. Antikoagulantna terapija se prekida za vrijeme porođaja i trudova odnosno između 36. i 37. tjedna trudnoće. Izuzetak su trudnice s jako velikim rizikom. Nakon porođaja, antikoagulantnu terapiju potrebno je nastaviti najmanje nakon 6. tjedana. Kod antifosfolipidnog sindroma zahvaćeni mogu biti i razni organi u tijelu, zbog čega se bolest naziva multisustavnom. Može biti primarna kada se javlja kao zasebni poremećaj, ili sekundarni sindrom koji prati druge bolesti poput sistemnog eritematoznog lupusa SLE (engl. *systemic lupus erythematosus*) i drugih reumatskih poremećaja (Campello i sur. 2019).

2.2. Nasljedna trombofilija

U nasljedne trombofilije najčešće ubrajamo mutacije gena faktora *V Leiden*, mutacije gena faktora *II Protrombin* manjak proteina C i S, manjak antitrombina III te nedostatak glikoproteina bogatog histidinom. Također u nasljedne oblike trombofilije možemo ubrojiti povišene razine faktora VIII i XI, hiperhomocisteinemiju i disfibrinogenemiju. Smatra se da otprilike 50% svih pacijenata s dubokom venskom trombozom i/ili plućnom embolijom ima neki oblik nasljedne trombofilije (Khan i Dickerman 2006). Testiranja na nasljednu trombofiliju preporučuje se radi poboljšanje ili unaprjeđenja liječenja (Stevens i sur.2016). Korisno je kod žena generativne dobi koje boluju od venske tromboze, te dodatnih faktora rizika kao što su fraktura femura, kirurški zahvat te produljena imobilizacija. Kod žena koje u obiteljskoj anamnezi imaju bliskog srodnika koji je u dobi manjoj od 50. godina prebolio vensku trombozu, testiranje je poželjno ako žena u skorije vrijeme planira trudnoću. Također ako netko od spomenutih bliskih srodnika bilo roditelji, brat ili sestra ima utvrđen poremećaj specifičan za nasljednu trombofiliju, predlaže se testiranje. Neophodno je kod žena koje su se suočile s jednokratnim ili višekratnim gubitkom fetusa nakon 10. tjedna trudnoće s histološkim nalazima ishemije placente odnosno suženja krvnih sudova i infrakcije te trombozama krvnih žila majke (Đelmiš i sur. 2014). Laboratorijskom ispitivanju na nasljednu trombofiliju trebalo bi podvrgnuti osobe oboljele od duboke venske tromboze dojnjih ekstremiteta, plućne embolije, upale površinskih vena (tromboflebitis). Idiopatske tromboze nepoznata uzroka, tromboze nakon neznatne provokacije, udružene arterijske i venske tromboze te tromboze na neuobičajnim mjestima također su dio testiranja na nasljednu trombofiliju. Korist laboratorijskog ispitivanja uključuje zadovoljstvo zbog identificiranja biološkog čimbenika rizika koji se nalazi u pozadini trombotičkog događaja te povećane zaštitne mjere za spriječavanje opasnosti uzrokovane zbog obiteljske anamneze (Stevens i sur. 2016). Također potrebno je obaviti testiranje 6. tjedana nakon pojave tromboze, dok nije nastupila trudnoća. Ne koristi se antikoagulantna ili hormonalna terapija. Razlog toga je što hormoni heparin i varfarin djeluju tako da heparin smanjuje antitrombin a varfarin smanjuje količinu proteina C i proteina S što otežava tumačenje nalaza. Za vrijeme trudnoće dolazi do promjene u parametrima sustava zgrušavanja ponajviše proteina S. Ljestvica za određivanje smanjene količina proteina S tijekom normalne trudnoće još uvijek nije poznata zbog toga što je količina slobodnog i ukupnog proteina S tijekom normalne trudnoće znatno smanjena (Đelmiš i sur. 2014). Nasljedna trombofilija nastaje kada nasljedni čimbenik kao što je nedostatak antitrombina ili proteina C, zahtjeva interakciju s

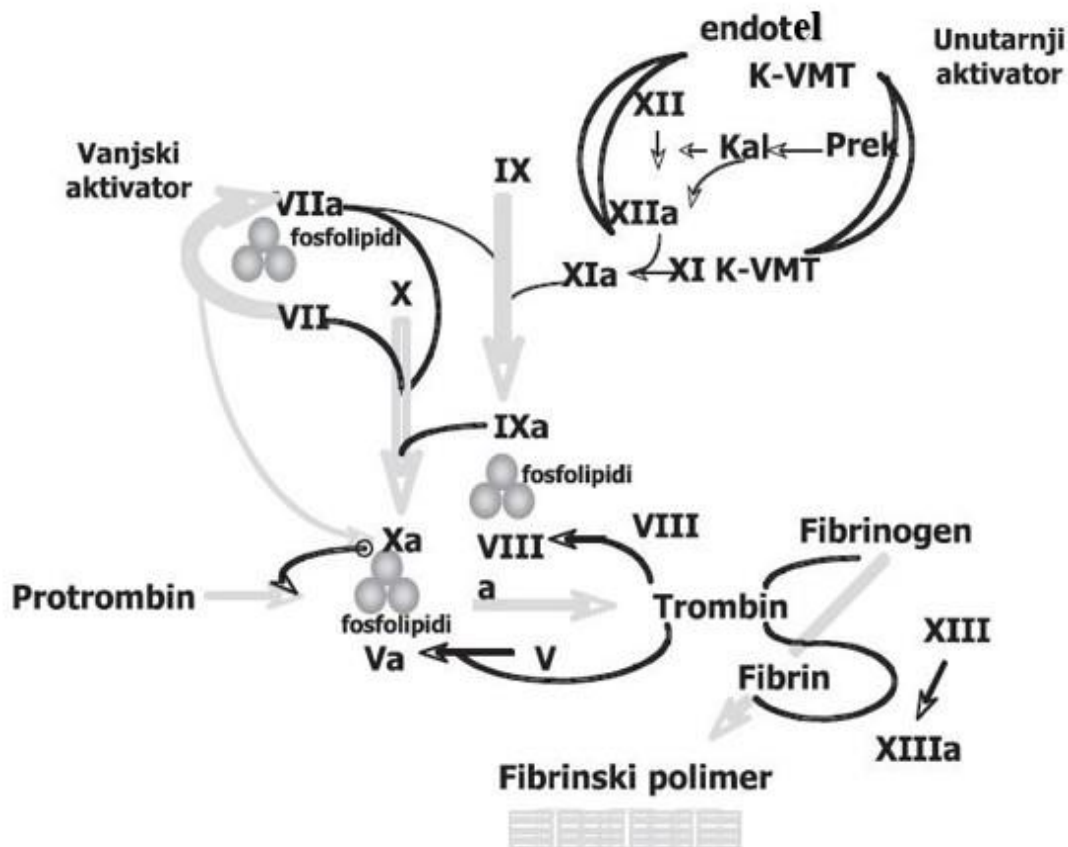
komponentama koje su nasljeđene ili stečene prije početka kliničkog poremećaja. Kombinacija dvaju ili više heterozigotnih abnormalnih čimbenika ili homozigotna abnormalnost može dovesti do kliničko tromboembolijskih poremećaja u ranoj dobi. Laboratorijskim ispitivanjima učestalije se otkrivaju blaža heterozigotna svojstva posebice kada su sama. Ne nose svi oblici nasljedne trombofilije jednak rizik za pojavu venske tromboembolije. Najveći rizik za pojavu venske tromboembolije predstavlja manjak antitrombina III te homozigotna mutacija gena faktora *V Leiden*, a najmanji rizik za trombofiliju uzrokuje manjak proteina C te heterozigotna mutacija gena faktora *V Leiden*. Faktor *V Leiden* ubrajamo kao najčešći oblik poremećaja nasljedne trombofilije. Kao posljedica javlja se povećana sklonost zgrušavanja krvi. Inaktivacija faktora *V Leiden* može se objasniti na način da aktivirani protein C u plazmi nije uspio produljiti aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme stoga je razvijen pojam aktivirana rezistencija na protein C. Ljudi koji imaju ovu vrstu trombofilije imaju jedan normalan alel na genu za faktor *V Leiden*, a drugi alel na genu nosi mutaciju te se takve osobe nazivaju heterozigotima za faktor *V Leiden*. Osobe koje na oba alela imaju mutaciju za faktor *V Leiden* nazivamo homozigotima. Velik broj istraživanja potvrđuje povezanost faktora *V Leiden* kao uzročnika duboke venske tromboze (DVT) među bijelom populacijom. Stoga su dvije najvažnije kliničke manifestacije ove genetske mutacije duboka venska tromboza i plućna embolija. Uz to mutacija gena faktora *V Leiden* može se povezati s 2-3 puta većim rizikom za ponavljajuće gubitke trudnoće te drugih komplikacija u trudnoći zbog tromboze placentalnih žila. Međutim, vjerojatnost uspješnog iznošenja trudnoće do kraja iznimno je visoka. Istraživanja su pokazala da je sveukupni rizik za tromboembolijski događaj 7. puta veći kod osoba koje su homozigoti. Osobe koje su homozigotni za mutaciju gena faktora *V Leiden* imaju 80% povećanja životnog rizika za razvoj tromba. Naknadno je potvrđeno da se kod homozigotnih pojedinaca očekuje da tijekom života razviju barem jedan venski tromboembolijski događaj. Doživotna vjerojatnost razvoja tromboze znatno je manja u heterozigota s mutacijom gena faktora *V Leiden*. Još jedan česti oblik nasljedne trombofilije je mutacija gena faktora *II Protrombin*. Faktor *II Protrombin* je prekursor trombina, krajnjeg produkta koagulacijske kaskade. Karakterizira ga prokoagulantno, antikoagulantno i antifibrinolitičko djelovanje. Mutacija gena faktora *II Protrombin* ima veći rizik za razvoj duboke venske tromboze, no u manjoj mjeri od faktora *V Leiden*. Ova mutacija slabije se pojavljuje kod crne i žute rase. U Europi se ova mutacija pojavljuje otprilike kod 1 do 50 osoba na 10 do 15% svjetskog stanovništva. Prekomjerna aktivacija gena protrombina te povećana proizvodnja protrombina i trombina posljedice su mutacije gena za

protrombin (Khan i Dickerman 2006). *Inhibitor aktivator plazimogen* PAI-1 smatra se glavnim inhibitorom fibrinolize te kada je fibrinolitička aktivnost smanjena povećan je rizik od arterijske i venske tromboze. Povezanost između povećane koncentracije PAI-1 u plazmi i povećanog rizika od tromboembolijskih vaskularnih bolesti uključujući ishemijsku bolest srca, infarkt miokarda i duboku vensku trombozu potvrdile su epidemiološka i populacijska istraživanja. Koncentracije PAI-1 u plazmi su pod utjecajem genetskih čimbenika. Čimbenikom rizika za arterijske bolesti, moždani udar i vensku trombozu smatraju se povećane koncentracije PAI-1 u plazmi. Zbog toga prisutnost 4G alela povezana je s povećanim rizikom od tromboze pogotovo kod onih bolesnika s drugim tromboembolijskim poremećajima. U žena s nepoznatim uzrokom ranog pobačaja pronađene su visoke koncentracije PAI-1. Posljedice su pripisane oslabljenoj fibrinolizi koja potiče taloženje fibrina u cirkulaciji. Ključni enzim folat/homocisteinskog puta jest MTHFR. Identificirane mutacije u genu *MTHFR* većinom su rijetke te su njihove kliničke posljedice izražene samo kod homozigota. Povećani rizik od arterijske bolesti i VTE posljedica su mutacija gena *MTHFR* (*C677T* i *A1298C*). Međutim njegova uloga faktora rizika za VTE i kardiovaskularne bolesti još uvijek nije razjašnjena (Miranda-Vilela 2012). Stabilizacijski faktor fibrina FXIII odnosno faktor zgrušavanja ima bitnu ulogu u razvijanju placente te regulaciji stanja hemostaze i koagulaciji krvi. Heterotetramerni oblik A2B2 faktora FXIII pronalazimo u krvi. Sastoji se od dvije podjedinice. Katalitičku aktivnost pripisujemo podjedinici A. Stoga se katalitičkoj aktivnosti pripisuje antifibrinolitički učinak tijekom ranog umrežavanja fibrina. Za razliku od podjedinice A, podjedinica B nema katalitičku aktivnost. U plazmi faktor FXIII ima važnu ulogu u umrežavanju fibrinskih monomera. Abnormalno zgrušavanje krvi te habitualni pobačaji posljedica su nedostatka faktora FXIII (Wu i sur. 2015).

2.3. Kaskada zgrušavanja krvi

Put koagulacije odnosno zgrušavanja krvi predstavlja događaje koji dovode do hemostaze. Uzrok krvarenja krvnih žila jesu oštećenja. Dvije metode koje su odgovorne za sprječavanje krvarenja jesu primarna hemostaza i sekundarna hemostaza. Primarna hemostaza podrazumijeva vazokonstrikciju trombocita koji tvore krvni čep na oštećenom mjestu endotelnih stanica. Stvaranje ugruška u krvi spada u sekundarnu hemostazu. Ugrušak unaprijed zaustavlja krvarenje. Zapravo unutarnji i vanjski put pripadaju sekundarnim procesima hemostaze. To su dva odvojena puta koja

dovode do stvaranja krvnog ugruška. Skupina proteina poznata kao faktori zgrušavanja omogućuje stvaranje ugruška. Kaskada zgrušavanja aktivira faktore zgrušavanja. Razlika između unutarnjeg i vanjskog puta zgrušavanja krvi je u tome što unutarnji put aktiviran traumom unutar vaskularnog sustava, dok je vanjski put aktiviran vanjskom traumom. Proteini koji u unutarnjem putu sudjeluju u stvaranju ugruška krvi poznati su kao faktori zgrušavanja. Tu spadaju faktori I (fibrinogen), II (protrombin), IX (Christmas faktor-antihemofilni faktor B, AHB), X (Stuart-Prowerov faktor), XI (Prethodnik tromboplastina-antihemofilni faktor C, AHC) i XII (Hegmanov faktor, kontakti faktor). Aktivacija unutarnjeg puta započinje vezanjem faktora XII na negativno nabijenu stranu površine koja je izložena krvi. To uzrokuje aktivaciju faktora IX, X i XI. Dalje se aktivira faktor II koji pretvara protrombin u trombin. Trombin uzrokuje pretvaranje fibrinogena u fibrin. U mrežici od fibrina nalaze se zarobljeni trombociti koji tvore krvni ugrušak. Kaskade proteinskih interakcija koje su aktivirane oštećenim vanjskim površinama dio su vanjskog puta. Vanjski put uključuje faktore I (fibrinogen), II (protrombin), VII (prokonvertin-stabilni faktor) i X (Stuart-Prowerov faktor). Također faktor III (tkivni faktor, tkivni tromboplastin) dio je vanjskog puta. Vanjski put je kraći i brži od unutarnjeg puta. Tkivni faktor odnosno tromboplastin u normalnim uvjetima nije izložen krvi. Prilikom oštećenja žile endotelne stanice otpuštaju tromboplastin. On aktivira faktor VII u faktor VIIa te fosfolipide koji se pretvaraju u faktor IX. VIIa će aktivirati faktor X u Xa. To predstavlja točku gdje vanjski i unutarnji put postaju jedno. Proces aktivacije Xa složena je reakcija. Budući da su i unutarnji i vanjski put uključeni u stvaranje faktora Xa, aktivirajući kompleksi zajedno se nazivaju tenaza. To označava kompleks koji aktivira svoj supstrat cijepajući ga (Chaudhry i sur. 2021).



Slika 1. Kaskada zgrušavanja krvi (Preuzeto iz Husar D. i Đelmiš J. 2008).

2.2.1. Faktor V Leiden

Mutacija gena faktora *V Leiden* predstavlja mutaciju jednog od faktora zgrušavanja krvi. Mutacija gena faktora *V Leiden* sama po sebi ne pokazuje nikakve simptome. Prvi pokazatelj razvoja ove mutacije je razvoj abnormalnih krvnih ugrušaka. Ugrušci se većinom stvaraju u dojnjim ekstremitetima ili plućima. Neki ugrušci ne moraju biti štetni te mogu nestati sami od sebe dok drugi mogu razviti ozbiljne komplikacije. Ovisno o tome koji je dio tijela zahvaćen nastaju simptomi krvnog ugruška. Abnormalni krvni ugrušci ne razvijaju se kod velike većine ljudi s ovom mutacijom. Veći je rizik za razvoj DVT-a nego za plućnu emboliju zbog ugruška formiranog u prisutnost faktora V Leiden. Simptomi razvoja DVT-a uključuju bol, oteklinu, crvenilo i toplinu. Plućna embolija nastaje kao posljedica blokade protoka krvi. Dio DVT-a se oslobodi i desnom stranom srca dolazi do pluća te uzrokuje blokadu. Takva situacija može biti opasna po život.

Mutacija gena faktora *V Leiden* uzrokuje zamjenu arginina s glutaminom te kao posljedica onemogućuje cijepanje APC na mjestu arginina Arg506. Mutacija gena faktora *V Leiden* pogađa i muškarce i žene. Osobe koje su naslijedile mutaciju gena faktora *V Leiden* od samo jednog roditelja do 65. godine života imaju oko 5% šanse za razvoj abnormalnog krvnog ugruška. Čimbenici koji povećavaju rizik za razvoj abnormalnog krvnog ugruška obuhvaćaju dva neispravna gena odnosno nasljeđivanje genetske mutacije od oba roditelja, produljeno razdoblje nepokretnosti te ozljede ili operacije. Također osobe koje imaju krvnu grupu A, B ili AB imaju veću mogućnost razvoja abnormalnih krvnih ugrušaka za razliku od osoba s krvnom grupom 0. Žene koje imaju ovu mutaciju sklone su razvoju abnormalnih krvnih ugrušaka tijekom trudnoće ili tijekom korištenja hormona estrogena (faktor *V Leiden*). Mutacija gena faktora *V Leiden* može imati poveznicu s negativnim ishodima trudnoće kao na primjer ponovljeni pobačaj, preeklampsija, rađanje nedonoščadi te male novorođenčadi za gestacijsku dob. Diskutabilna je poveznica između mutacije gena faktora *V Leiden* i pobačaja u prvom tromjesečju. Provedeno istraživanje koje je obuhvaćalo veći broj pacijentica opovrglo je povezanost između habitualnog pobačaja u prvom tromjesečju i navedene mutacije. Oko 25 do 50% pacijentica koje u svojoj anamnezi imaju abrupciju posteljice su nositeljice mutacije gena faktora *V Leiden*. Povezanost heterozigotnog gena faktora *V Leiden* s teškim intrauterinim ograničenjem rasta ustanovljena je kod 6. do 23. ispitanice u istraživanju. Uočena je povezanost između mutacijegena faktora *V Leiden* i jedne od varijanti preeklampsije tzv. HELLP sindrom (engl. *Haemolysis Elevated Liver Enzymes Low Plateletes*) sindrom kojeg karakterizira razgradnja crvenih krvnih stanica, povišenih jetrenih enzima i smanjen broj trombocita (Bloomenthal i sur. 2002). Također žene koje imaju mutaciju gena faktora *V Leiden* tijekom menstruacije suočavaju se s manjim gubitkom krvi, imaju veće razine hemoglobina, smanjenu mogućnost po život opasnog krvarenja nakon poroda što se smatra evolucijskom prednošću (Van Dunne i sur. 2005). Antikoagulacijska terapija, odnosno lijekovi koji spriječavaju zgrušavanje krvi, smanjuju rizik od razvoja dodatnih krvnih ugrušaka te pomažu u izbjegavanju potencijalno ozbiljnih komplikacija. Na trajanje antikoagulacijskog tretmana te nadzor nad VTE ponajviše utječe rezultat genetske predispozicije za faktor *V Leiden* ili prisutnost višestrukih poremećaja. Neovisno o mutaciji gena faktora *V Leiden*, liječenje akutne venske tromboze uključuje nefrakcionirani klasični heparin UFH (engl. *unfractioned heparin*) ili heparin male molekularne mase LMWH (engl. *low-molecular-weight heparin*) skupa s antagonistima vitamina K. Testiranje na gen faktora *V Leiden* i druge gene nasljedne trombofilije preporučuje se kod osoba

s prvom trombozom na neobičnim mjestima. Probir faktora *V Leiden* postiže se uz pomoć testa otpornosti APC-a s abnormalnim rezultatima potvrđenim putem PCR metode ili ispitivanje DNA kako bi se utvrdilo nosi li pojedinac mutaciju *G1691A* (Campello i sur. 2016).

2.2.2. Faktor Protromin II

Trombofilno stanje te venska tromboza mogu biti posljedica mutacije gena faktora *II Protrombina G20210A*. Kao uzrok trombofilnog stanja smatra se povećana razina plazmatske protrombinske aktivnosti i antigena polimorfizma *G20210A*. Protrombin je važan za koagulaciju odnosno zgrušavanje krvi. Teško krvarenje poremećaj je protrombina koji može biti kao oblik tipa I ili oblik tipa II. Oblik tip I povezan je s pravim odnosno teškim krvarenjem dok je oblik tipa II povezan s blažom sklonošću krvarenju te niskom aktivnošću i u granicama normalnim antigenom. Otkriveno je da mutacija protrombina Arg596 koja spada u oblik tipa II povezana je s venskom trombozom bez krvarenja. Postoje homozigotni poremećaji tipa I te tipa II. Kod prvog tipa aktivnost protrombina i antigena je niska najčešće manja od 5% normalne. Dok kod drugog tipa karakteristična je neznatna sniženost protrombinskog antigena. Poremećaji mogu biti posljedica polimorfizma odnosno česte mutacije ili specifične rijetke mutacije. Međutim nije dokazana uloga polimorfizma u arterijskog trombozi (Girolami i sur. 2018). Istraživanja su pronašla povezanost između habitualnog pobačaja tijekom prvog tromjesečja te kasnog gubitka trudnoće, odnosno trudnoće nakon 20. tjedna s protrombinom (De Jong i sur. 2011). Rizik od habitualnih pobačaja bio je značajno veći kod žena iznad 29. godina. (Gao i Tao 2015).

2.2.3. Metilentetrahidrofolat-reduktaza (MTHFR)

Metilentetrahidrofolat-reduktaza (MTHFR) predstavlja ključni enzim koji sudjeluje u ciklusu metilacije. MTHFR je enzim koji kodira gen na kratkom kraku 1. kromosoma (Liu i sur. 2019). Enzim katalizira pretvorbu 5,10-metilentetrahidrofolata u 5-metiltetrahidrofolat koji je važan za remetilaciju homocisteina u metionin u prisutnosti vitamina B12 i folne kiseline. Osobe koje imaju niske razine folne kiseline zajedno s nižom razinom vitamina B12 razvit će hiperhomocistinemiju. To predstavlja stanje povišene koncentracije homocisteina u krvi (Liew i Gupta 2015). Istraživanja su objavila povezanost hiperhomocistinemije s aterosklerozom, venskom trombozom, poremećajem razvoja neuralne cijevi i abrupcijom posteljice. Hiperhomocistinemija nije povezana

s preeklampsijom (Kobashi i sur. 2005). Hiperhomocistinemija uzrokuje hiperkoagulabilno stanje te povećava rizik od arteriovenske tromboembolije uključujući i gubitak trudnoće. Ograničena opskrba embrija krvlju te nekroza resica posljedica su djelovanja tromba u placenti što je bitna značajka uzroka spontanih pobačaja. Najviše istražene mutacije gena *MTHFR* su: *C677T* koja uzrokuje zamjenu aminokiseline alanin u valin te mutacija *A1298C* koja uzrokuje zamjenu aminokiselina glumatin u alanin (Liew i Gupta 2015). Nekoliko istraživanja pokazalo je povezanost između mutacije *C677T* i habitualnog pobačaja. *MTHFR* ima tri vrste genotipa *CC* (*divlji tip*), *CT* (*mješoviti tip*) i *TT* (*homozigot*). *MTHFR* ima bitnu ulogu tijekom reprodukcije. Izostanak gena *MTHFR* ima negativan učinak na spermatogenezu. Negativni učinci su uvjetovani promjenama u procesu transmetilacije. Dodatak betaina koji djeluje kao metil donor predložen je kao rješenje. Naime on bi omogućio zaobilazanje nedostatka *MTHFR* i njegovih štetnih učinaka na spermatogenezu osiguravanjem normalne razine metilacije unutar muških zametnih stanica. Također je utvrđeno da polimorfizam *C677T* gena *MTHFR* ima utjecaj na kvalitetu sperme. Smrt spermija nastupa kao posljedica neispravne metilacije povezane s povećanom stopom ranog spontanog pobačaja. Povećani indeks dekonenzacije jezgre spermija doprinosi smrti spermija. Do povećane stope spontanih pobačaja može dovesti smanjena aktivnost *MTHFR* (Liu i sur. 2019). Također alel *T677* gena *MTHFR* pogoduje razvoju hiperhomocistinemije. Istraživanje provedeno među japanskom populacijom nije dalo poveznicu između alela *T677* te habitualnog pobačaja, iako je uključivalo manji broj ispitanika. U istraživanju nije uočena povezanost između razine homocisteina u plazmi te habitualnog pobačaja. Uz to genotipovi *T677* i *TT* bili su viši kod žena koje su imale habitualne pobačaje, četiri ili više (Kobashi i sur. 2005). Istraživanje provedeno unutar populacije Meksika potvrdilo je povećan rizik od spontanog pobačaja među ženskim nositeljicama genotipova *MTHFR 677TT* i *MTHFR A1298C* (Rodriguez-Guillen Mdel i sur. 2009). Niske razine folne kiseline u majčinom serumu mogu biti jedan od uzroka spontanog pobačaja. Također genotipovi koji imaju poremećen metabolizam homocisteina u žena povećavaju rizik za spontani pobačaj (Zetterberg i sur. 2003). Manja učestalost homozigotne mutacije gena *MTHFR* uočena je kod ljudi starijih od 80. godina u usporedbi s onima mlađe dobne grupe od 55. do 79. godina (14%) te 14. i 55. godina (19%) potvrdila je grupa znanstvenika u Japanu. Međutim nijedno izvješće nije dalo podatke o razlici između spolova i homozigotnosti *MTHFR* gena (Liew i Gupta 2015).

2.2.4. Inhibitor aktivatora plazimongen PAI-1

Inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) pripada inhibitorima serin proteinaze (serpin). Serpini se dijele na dvije skupine u koje spadaju inhibitori serpina i neinhibitori serpina. PAI-1 pripada skupini inhibitornih serpina odnosno inhibitora aktivatora plazminogena. Postoje dva tipa inhibitora aktivatora plazminogena-1 (PAI-1), aktivator plazminogena tkivnog tipa (t-PA) i aktivator plazminogena tipa urokinaze (u-PA). Polimorfizam je posljedica delecije (4G) ili insercije (5G) jednog gvanozina u promotorskom dijelu gena za *PAI-1* na 7. kromosomu. Oba tipa pripadaju serinskim proteazama. Aktivna proteaza plazmin stvara se na način da dolazi do cijepanja cirkulirajućeg proenzima plazminogena preko serinskih proteaza. Posljedica aktivacije plazminogena preko t-PA odnosno u-PA stvara se liza fibrina u krvnom ugrušku i pericelularna proteoliza. Najvažniji fiziološki inhibitor t-PA te u-PA i glavni regulator fibinolitičkog sustava smatra se *PAI-1*. Kao posljedica većih koncentracija antigena *PAI-1* u plazmi i aktivnosti uočena je ozbiljnost te brojni nepovoljni ishodi u mnogim bolestima te kao konačan ishod PAI-1 se smatra biomarkerom te potencijalnom molekularnom metom za terapeutike (Yildiz i sur. 2014). U promotorskim regijama gena *PAI-1* pronalazimo polimorfizme umetanje/delecije 4G/5G koji su povezani s plazmom te razinom aktivnosti *PAI-1*. U polimorfizmu 4G pronalazimo četiri gvanozinska ostatka dok u polimorfizmu 5G pronalazimo pet gvanozinskih ostataka. Otkrivena je mogućnost vezanja 4G alela na aktivator transkripcije čime se poboljšava transkripcija mRNA te povećava razina PAI-1 i mogućnost vezanja alela 5G na represor što bi izazvalo smanjenje transkripcije mRNA i razinu PAI-1. Opasnost od nastanka venske tromboembolije može se pripisati homozigotnom genotipu 4G/4G koji povećava razinu PAI-1 te kao posljedica javlja se stanje niske fibrinolize povećavajući rizik od nastanka venske tromboembolije (Zhang i sur 2020). Spomenuti polimorfizmi 4G/5G mogu biti povezani s sindromom policističnih jajnika, dijabetesom, koronarnim bolestima srca, rakom endometrija, astmom, tromboembolijom, habitualnim pobačajima te preeklampsijom. Zapravo genotip polimorfizama 4G ima najviše poveznica s komplikacijama u trudnoći koje uključuju preeklampsiju, intrauterinu restrikciju rasta, abrupciju posteljice te rađanje mrtvog ploda kao posljedica placentalne insuficijencije odnosno nepravilnog razvijanja posteljice te njenog oštećenja. Dokazano je da PAI-1 ima ključnu ulogu u remodeliranju tkiva majke tijekom invazije trofoblasta. Također pronađena je poveznica između neuspjelog procesa implanatcije i oštećene posteljice i genotipa 4G/4G. Niža molekularna masa

heparina i metformina mogu ublažiti komplikacije trudnoće te poboljšati proces implanatacije kod pacijenata koji sadrže 4G/4G genotip (Salazar i sur. 2016).

2.2.5. Stabilizacijski faktor fibrina (faktor XIII)

Bitan parametar u procesu koagulacije te također važan čimbenik u nastanku tromba i njegove otpornosti jest faktor XIII. Faktor XIII ima utjecaj na strukturu fibrina i trombozu. Nedostatak gena nasljednog homozigotnog faktora *XIII* rezultira komplikacijama ozbiljnog krvarenja te velikim rizikom od pobačaja. *G103T* je najčešći polimorfizam faktora *XIII* koji dovodi do zamjene valina u leucin na aminokiselini 34. Polimorfizam nije odgovoran za promjenu koncentracije FXIII u plazmi no zbog promjene aminokiseline može doći do promjene aktivnosti FXIII. Istraživanja su potvrdila porast trombina u plazmi FXIII s pomenutim polimorfizmom djelujući na stabilnost ugruška, sa strukturom koja sadrži tanja vlakna i manje pore. Međutim posljedica ovog polimorfizma je disfunkcija homeostaze što ukazuju krvni ugrušci te povećani fibrin intraviloznog prostora kao česti morfološki nalazi kod abortivnog tkiva spontanog pobačaja. S toga polimorfizam *G103T* gena *FXIII* utječe na umrežavanje fibrina i regulaciju fibrinolize i ima za posljedicu doprinos u ranom gubitku trudnoće (Jeddi i sur. 2010). Žene koje imaju nedostatak gena *FXIII* često ne proizvode iste razine faktora zgrušavanja, kao žene koje nemaju nedostatak tog gena te su s toga puno ranjivije na hemoragiju i loš ishod trudnoće koji će rezultirati spontanim pobačajem. Njegov nedostatak nije samo vezan za pojačano krvarenje iz maternice tijekom trudnoće, uz to dovodi do lošeg formiranja citotrofoblastične ljuske te dolazi do povećanog rizika odvajanja posteljice od maternice i pobačaja u prvom tromjesečju. Od 5. do 6. tjedna trudnoće pojavit će se decidualno krvarenje što će rezultirati spontanim pobačajem ako se ne provede nadomjesna terapija (Hsieh i Nugent 2008).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada jest istražiti povezanost genskih polimorfizama faktor *V Leiden FVQ506*, faktor *II Protrombin G20210A*, *MTHFR C677T*, *PAI-1 -5675 4G/5G* i faktora *XIII G103T* s pojavom spontanog pobačaja kod žena.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitanici

Istraživanje sam provela nakon odobrenja Etičkog povjerenstva Sveučilišne kliničke bolnice Mostar. Za ovo istraživanje koristila sam rezultate molekularnih analiza polimorfizama koje su odrađene u razdoblju od 2018.-2022. godine. Ispitanice sam podijelila u dvije skupine: žene bez spontanih pobačaja s minimalno jednom urednom prethodnom trudnoćom koje čine kontrolnu skupinu te žene s minimalno jednim spontanom pobačajem koje čine ispitivanu skupinu. Ukupan broj ispitanica ovog istraživanja bio je 150, od toga 72 ispitanice u kontrolnoj skupini i 78 ispitanica u ispitivanoj skupini. Raspon dobi za obje skupine bio je 18-45 godina. Kriteriji isključenja: anatomske abnormalnosti maternice, stečena trombofilija, abnormalni kariotip periferne krvi, urogenitalna infekcija i endokrinološke bolesti.

4.1.1. Materijali

Za istraživanje sam koristila uzorak pune krvi odnosno vensku krv ispitanica s K3-etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) iz koje sam izdvojila DNA te sam za svaki gen koristila početnice specifične za gen i polimorfizam. Do analize, uzorak DNA skladišten je na -20°C. Navedene polimorfizme analizirala sam referentnom metodom, odnosno lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) na analizatoru Real-time PCR (Applied Biosystems). Materijale potrebne za izolaciju genomske DNA iz pune krvi prikazala sam u Tablici 1. a uređaje u Tablici 2.

Tablica 1. Potreban materijal za izolaciju genomske DNA iz pune krvi

Redni broj	Korištene kemikalije i materijali	μL
1.	antikoagulans (EDTA)	Volumen EDTA epruvete 3,5 μL
2.	Svježe odmrznut uzorak venske krvi ispitanica	200 μL
3.	Proteinaza K	20 μL proizvođač Applied Biosystem Invitrogen
4.	RNaza A	20 μL Applied Biosystem Invitrogen
5.	Purelink Genomic pufer za lizu/vezanje	200 μL Applied Biosystem Invitrogen
6.	96-100% etanol	200 μL
7.	Stanični lizat	~ 640 μL
8.	Pufer za ispiranje 1	500 μL proizvođač Applied Biosystem Invitrogen
9.	Pufer za ispiranje 2	500 μL proizvođač Applied Biosystem Invitrogen
10.	Purelink Genomic pufer za izolaciju	100 μL proizvođač Applied Biosystem Invitrogen

Tablica 2. Uređaji korišteni tijekom izolacije genomske DNA iz pune krvi

Redni broj	Uređaji
1.	Analizator Real time PCR Applied Biosystems 7500 fast Eppendorf
2.	Eppendorf SmartBlock 5360000031 Thermoblock for 24x0,5ml
3.	V-1 Plus Vortex –Mixer
4.	Centrifuga Eppendorf mini

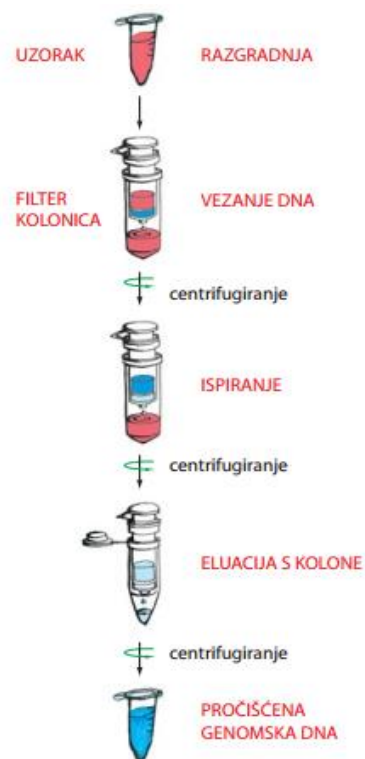
4.2. Metode

4.2.1. Izolacija genomske DNA

Najjednostavnija analiza za izolaciju genomske DNA je upotreba komercijalnih reagens paketa. Izolaciju DNA iz krvi izvodila sam prema protokolu tvrtke Applied Biosystem Invitrogen upotrebom kromatografskih kolona koje sadrže silika-gel membranu i pufera za pročišćavanje. Proces izolacije DNA iz uzorka krvi izvodila sam na sobnoj temperaturi, a uključivao je lizu stanične membrane i jezgre, odstranjivanje proteina i drugih nečistoća te pročišćavanje i koncentriranje DNA.

Uzorak krvi koji sam koristila za izolaciju DNA je svježe odmrznuti uzorak pune krvi s antikoagulansom (EDTA, heparin, citrat). Na Slici 2. su prikazani stupnjevi procesa izolacije DNA. Metoda izolacije DNA temelji se na četiri ključna koraka

1. Priprema staničnog lizata
2. Pročišćavanje genomske DNA iz staničnog ekstrakta
3. Koncentriranje DNA
4. Utvrđivanje kvalitete i količine pročišćene DNA



Slika 2. Postupak genomske izolacije DNA (vlastita slika).

Postupak:

Izolaciju DNA izvodila sam u sterilnom kabinetu te je zahtijevala sterilnu opremu, sterilan potrošni materijal, kao i izniman oprez pri izvođenju zbog moguće kontaminacije. Prilikom izolacije pazila sam na sve propise i pravila laboratorija za molekularnu medicinu. Termoblok sam zagrijala na 55 °C. U sterilnu mikro epruvetu od 1,5 µL dodala sam 200 µL uzorka odmrznute krvi. U uzorak sam dodala 20 µL Proteinaze K. Zatim sam dodala sam 20 µL RNaze A dobro promiješala, kratko sam vorteksirala na vorteks-mješalici i inkubirala na sobnoj temperaturi 2 minute. Nakon toga sam dodala 200 µL Purelink Genomic pufer za lizu/vezanje, izmješala, kratko vorteksirala na vorteks-mješalicu do homogene smjese. Inkubirala sam 10 minuta na prethodno zagrijanom termobloku na 55 °C. Nakon inkubacije ostavila sam da se lizat ohladi na sobnu temperaturu i dodala sam 200 µL 96-100% etanola. Vorteksirala sam na vorteks-mješalici 5 sekundi do homogene smjese. Pripremila sam *Spin Column* tubice u *Collection Tube* (donju tubicu). Pripremljeni lizat (~ 640 µL) prebacila sam na *Spin Column* tubice. Kolone sam centrifugirala na 10 000 x g, 1 minutu na sobnoj temperaturi. Odbacila sam *Collection Tube* tubice i *Spin Column* tubice prebacila u nove *Collection Tube* tubice (reagens paket). Dodala sam 500 µL pufera za ispiranje 1 (prethodno pripremljen s

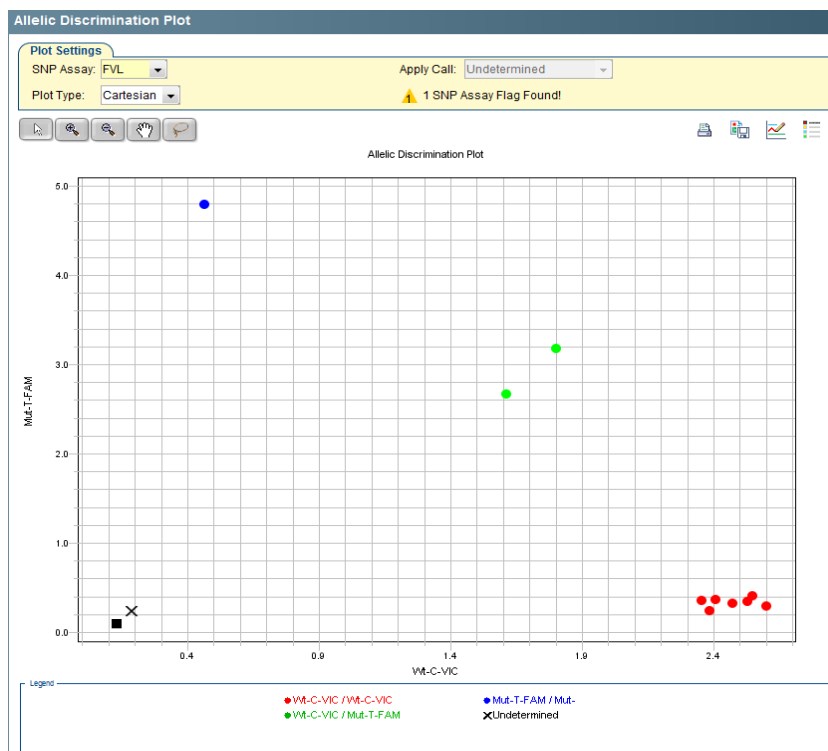
etanolom) na kolonu. Kolonu sam centrifugirala na 10 000 x g, 1 minutu na sobnoj temperaturi. Odbacila sam *Collection Tube* tubice i *Spin Column* tubice sam prebacila u nove *Collection Tube* (reagens paket). Točno 500 µL pufera za ispiranje 2 (prethodno pripremljen s etanolom) dodala sam na kolonu. Kolone sam centrifugirala na 14 000 g, 3 minute na sobnoj temperaturi. Zatim sam odbacila *Collection Tube* tubice. *Spin Column* tubice sam prebacila u novu sterilnu 1,5 µL mikro epruvetu. Dodala sam 100 µL *Purelink Genomic* pufera za izolaciju DNA. Inkubirala sam na sobnoj temperaturi 1 minutu te centrifugirala na 14 000 g, 1 minutu na sobnoj temperaturi. Odbacila sam *Spin Column* tubice i pohranila DNA na +4 °C za skoro korištenje odnosno na -20 °C za duži period do PCR analize.

4.3. Genotipizacija mutacija faktor *V Leiden*, faktor *II Protrombin*, metilentetrahidrofolat-reduktaze, faktor *XIII* i *PAI* pomoću metode Real-time (RT-PCR) – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Real-time PCR metoda je inačica klasične polimerazne reakcije čija osjetljivost je povećana uvođenjem fluorescentnih proba. U Real-time PCR reakciji koristi se dvostruko označena fluorescentna proba. Reporter boja (emitirajuća) emitira fluorescentnu svjetlost vezana za '5 kraj TaqMan probe, dok je prigušivač boje (engl. *quencher* - onaj koji gasi) vezan za 3' kraj. Tijekom umnažanja dolazi do komplementarne hibridizacije probe za ciljnu sekvencu te njene razgradnje kao posljedica 5'-3' egzonuklearne aktivnosti Taq DNA polimeraze koja razgrađuje fluorescentnu probu i dovodi do oslobađanja reporter boje. Ovim procesom se prigušivač fluorescencije udaljava do reporter (emitirajuće) boje i nema blokade emisije. Signal fluorescencije se normalizira u odnosu na intezitet emisije referentne boje (pasivna referenca) koja je uključena u reakcijsku smjesu. Amplifikacijska krivulja grafički prikazuje odnos signala fluorescencije i broja ciklusa umnožavanja. Bazičnu liniju amplifikacijske krivulje čine početni ciklusi umnožavanja u kojima ne dolazi do velike promjene u signalu fluorescencije. Detekcija signala iznad bazične linije označava umnoženi produkt. *Threshold cycle* (Ct) vrijednost prikazuje broj ciklusa u kojima intezitet fluorescencije prelazi intezitet praga. Real-time PCR tehnologija je visoko automatizirana, pri čemu uređaj kontinuirano mjeri fluorescenciju u uzorcima, a softver te podatke analizira. Za genotipizaciju mutacija *MTHFR C677T* i *A1298C* te faktora *V Leiden* u ovom radu koristila sam uređaj ABI Prism 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, SAD).

4.3.1. Alelna diskriminacija

U ovom radu koristila sam test alelne diskriminacije (AD), odnosno test završne točke nakon Real-time PCR umnožavanja i dobivene fluorescencije koji određuje genotip na temelju točkaste mutacije SNP (engl. *single nucleic polymorphism*) u ciljnoj sekvenci. U reakciji sam koristila dvije fluorescentne TaqMan probe koje omeđuju ciljnu sekvencu na mjestu SNP-a. Sve su se probe vezale na istoj temperaturi taljenja. Iz omjera inteziteta fluorescencije reporter boja kojima su označene probe (FAM i VIC) odredila sam alel koji se dominantno umnažava. Jedna fluorescentna proba vezala se na tip bez mutacije (engl. *wild*) i označena je kao alel 1, a druga se vezala na mjesto mutacije i označena je kao alel 2. Test alelne diskriminacije razvrstava nepoznate uzorke na homozigote (uzorci imaju alel 1 ili alel 2) i heterozigote (uzorci koji imaju oba alela 1 i 2). Signal fluorescencije za svaki uzorak smjestila sam u graf, gdje su se lako detektirala tri moguća genotipa mutacije. Na osi x prikazala sam uzorke umnožene kao normalni aleli bez mutacije (W-engl. *wild*, označeni crvenom bojom), a na osi y uzorke s mutacijom (M, označeni plavom bojom), dok sam uzorke heterozigota s jednim normalnim, a drugim mutiranim alelom smjestila u sredinu grafa (označeni zelenom bojom). Uzorke negativne kontrole (amplifikacija bez ciljne sekvence) prikazala sam kao crni kvadratić na dnu lijeve strane grafa (Slika 3).



Slika 3. Prikaz rezultata alelne diskriminacije nakon provedenog real-time PCR umnožavanja DNA za faktor *V Leiden* mutaciju na uređaju AB 7500 (ispis rezultata s uređaja ABI Prism 7500 Real-time PCR system; Laboratorij za molekularnu medicinu, Medicinski fakultet Mostar (vlastita slika).

4.3.2. Reagensi za izvođenje Real-time PCR metode

Za Real-time PCR reakciju detekcije svih polimorfizma gena koristila sam 40x Assay koncentrirane otopine ukupnog volumena 15 μ L (13 μ L PCR smjese uz dodatak 2 μ L DNA uzorka, te kontrolne DNA kao pozitivne kontrole i sterilne destilirane vode kao negativne kontrole).

- Univerzalni TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, SAD)
- Custom TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, SAD):

-*MTHFR*:

ACATAGTCACTCTGAAAATCAGAAG[C/T]GGGCTGTGATGAGTCCAAAGCCACC

-*FV Leiden*:

ATACTCAACAGTGCTTAGTAATGGC[C/T]TAAAGAATGGATGAACAGATGGACA

-FII Protrombin:

CTGGTGCGCATTGGCAAGCACTCCC[A/G]CACCAGGTACAGAACTGGTGGCCCG

-FXIII:

GATATGGAGAATGCCAAATAACTAT[C/T]TTTTTGTTCATTTTAAACAATTGCAA

-PAI:

GGCTTCCAGAAATAGTGGAGAAGCC[A/G]GGAGAACTAGGTGAAAACCCAGTGC

- Bidestilirana voda (Aqua pro injectione, HZTM, Zagreb)
- MicroAmp Optical Tube (0,2 mL) (Applied Biosystems, SAD) - optičke epruvete za PCR reakciju
- MicroAmp Optical Cap (Applied Biosystems, SAD) - čepovi za optičke epruvete
- nastavci s filterom 2 – 100 μ L (Eppendorf, Njemačka)
- nastavci s filterom 0,1 - 10 μ L (Eppendorf, Njemačka)

4.3.3. Postupak pripreme Real-time PCR reakcijske smjese

U sterilnom kabinetu s laminarnim protokom zraka pripremila sam reakcijsku smjesu za Real-time PCR reakciju na uređaju AB 7500 (Applied Biosystems, SAD).

Tablica 3. Komponente reakcijske smjese

Redni broj	Komponente	μ L
1.	univerzalni TaqMan Master Mix	7,5 μ L
2.	TaqMan SNP početnica	0,38 μ L
3.	bidestilirana voda	5,12 μ L
4.	reakcijska smjesa za Real-time PCR	13 μ L
5.	izolat genomske DNA	2 μ L

Svaki uzorak bio je ukupnog volumena 15 μ L. U svakoj seriji uz reakcijske smjese za nepoznate uzorke, kao dio procesne kontrole stavljala sam negativnu kontrolu (s bidestiliranom vodom umjesto izolata genomske DNA kao kalupa) i 3 pozitivne kontrole izolata genomske DNA s poznatim genotipom za svaki gen (divlji tip – bez mutacije, heterozigotni tip – samo jedan mutirani alel, a drugi divlji i homozigotni tip za mutaciju - oba mutirana alela). Nakon završenog pipetiranja epruvete sam zatvorila s čepovima i stavila u uređaj za Real-time PCR. Odabirom programa definiraju se uvjeti reakcije i započinje umnožavanje uz mogućnost praćenja porasta fluorescencije u odnosu na broj ciklusa umnožavanja.

4.3.4 Uvjeti Real-time PCR reakcije

U Tablici 3 navedeni su uvjeti PCR reakcije koje sam koristila u postupku umnožavanja polimorfizama gena faktora *V Leiden*, *II Protrombin*, *Metilentetrahidroksi-reduktaze*, *Inhibitor aktivatora plazimnogene PAI-1*.

Tablica 4. Uvjeti Real-time PCR reakcije u postupku umnožavanja polimorfizama gena faktora *V Leiden*, *II Protrombin*, *Metilentetrahidroksi-reduktaze*, *Inhibitor aktivatora plazimnogene PAI-1*

Uvjeti reakcije PCR	Temperatura	Vrijeme
HOLD-aktivacija enzima AmpErase uracil-N-glikosilaza	50 °C	2 min.
HOLD-aktivacija AmpliTaq Gold enzima	95 °C	10 min.
40 ciklusa umnožavanja: Denaturacija Vežanje početnica i produljenje lanca	95 °C 60 °C	15 sek. 1 min.
Detekcija fluorescencije	60 °C	

4.3.5. Statistička obrada podataka

Dobivene rezultate istraživanja pohranila sam u MS Excel (Microsoft Excell inačici 11) bazu podataka, a za statističku analizu dobivenih podataka koristila sam programski sustav *IBM SPSS Statistics 20*. Za prikazivanje dobivenih podataka za kategorijalne varijable koristila sam postotke te frekvencije, dok sam kontinuiranu varijablu (dob) prikazala preko deskriptivnih parametara (srednja vrijednost i standardna devijacija). Za usporedbu učestalosti pojavnosti varijabli koristila sam χ^2 (Hi-kvadrat test). Za testiranje razlika između dvije skupine koristila sam *t*-test za nezavisne uzorke (*t*). Granica statističke značajnosti postavljena je na $p=0,05$, a svi rezultati $p<0,05$ u odnosu na kontrolnu smatraju se statistički značajnim.

5. REZULTATI

5.1. Raspodjela ispitanica prema ispitivanoj i kontrolnoj skupini

Kao što je vidljivo iz Slike 4. od ukupnog broja ispitanica ($N=150$) njih 52,0% ($N=78$) se nalazi u ispitivanoj skupini, odnosno skupini koja obuhvaća žene koje su imale minimalno jedan spontani pobačaj, dok se u kontrolnoj skupini nalazi 48,0% ($N=72$) žena bez spontanih pobačaja s minimalno jednom urednom prethodnom trudnoćom.

Analizom nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti broja ispitanica u ispitivanoj i kontrolnoj skupini ($\chi^2=0,24$; $df=1$; $p>0,62$).



Slika 4. Grafički prikaz raspodjele ispitanica s obzirom na skupinu kojoj pripadaju

5.2. Raspodjela ispitanica prema dobi

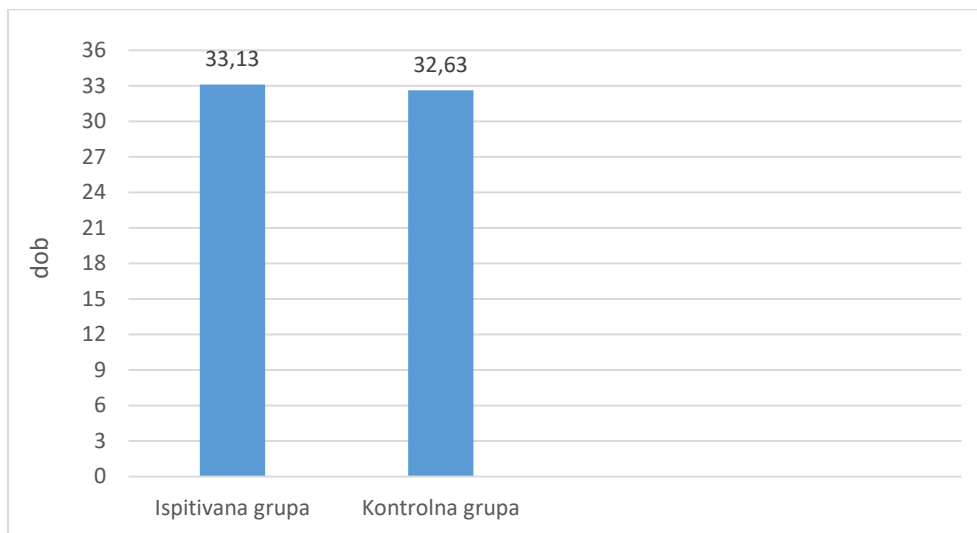
U ovom istraživanju raspon dobi kreće se od 18 do 45 godina. Prosječna dob svih ispitanica obuhvaćenih ovim uzorkom iznosila je 33 godine (Tablica 4). Prosječna životna dob ispitanica iz ispitivane skupine iznosila je 33 godine ($SD=5,27$), a kontrolne 32 ($SD=6,57$) godine.

Tablica 5. Prosječna životna dob ispitanica

<i>N</i>	<i>SV</i>	<i>SD</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
150	32,89	5,92	18	45

Kratice: *N*- ukupni broj ispitanica; *SV*-srednja vrijednost; *SD*-standardna devijacija; *Min*- minimalni rezultat; *Max*-maksimalni rezultat.

Kako bi se ispitale značajnosti eventualnih razlika u dobi s obzirom na dvije skupine u ovom istraživanju, korišten je *t*-test za nezavisne uzorke (*t*). Analiza rezultata pokazuje da nije utvrđena statistički značajna razlika u dobi, što bi značilo da su obje skupine relativno izjednačene po starosnoj dobi ($t=0,52$; $df=148$; $p>0,60$) (Slika 5). Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost (*SV*).



Slika 5. Prosječne starosne dobi ispitanica u kontrolnoj i ispitivanoj grupi

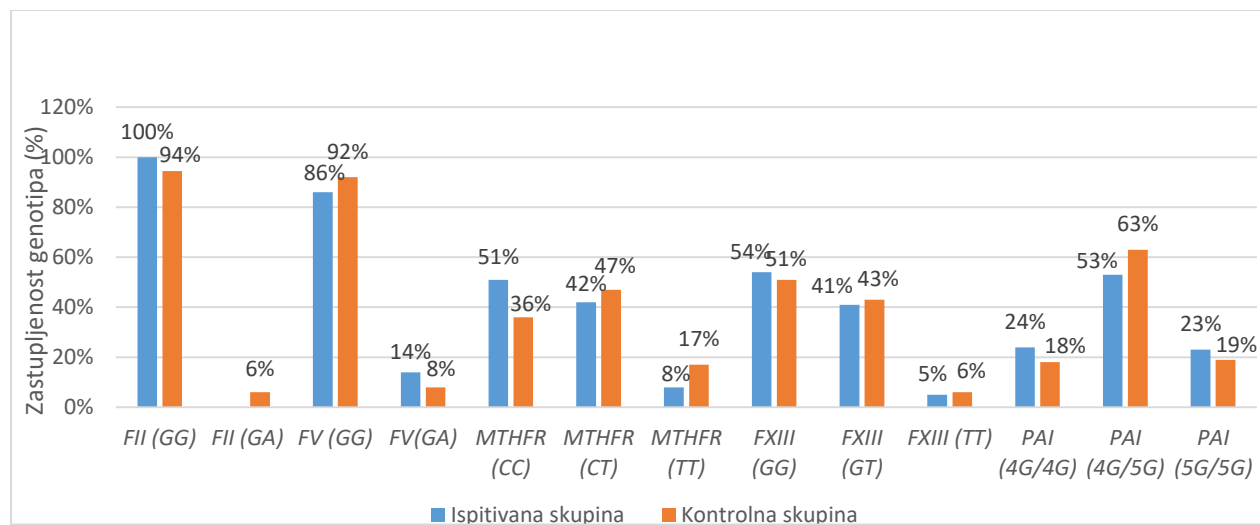
5.3. Raspodjela ispitanica prema zastupljenosti genotipova

Rezultati su prikazani na Slici 6. Od ukupnog broja ispitanica iz ispitivane i kontrolne skupine najveći broj njih (100%- ispitivana skupina; 94,4%- kontrolna skupina) ima zastupljen genotip *FII*

(GG). Niti u jednoj od skupina nitko nema zastupljen genotip *FV* (AA). Dobiveni rezultati su prikazani u frekvencijama.

Nadalje, istražili smo da li se razlikuju ispitivana i kontrolna skupina po zastupljenosti određenog genotipa. Utvrđena je statistički značajna razlika u zastupljenosti genotipa *FII*, *FV*, *MTHFR* i *PAI* između ispitivane i kontrolne skupine ($p < 0,05$).

Genotip *FII* (GG) je zastupljeniji kod ispitivane skupine u odnosu na kontrolnu, *FV* (GG) je zastupljeniji kod kontrolne skupine, dok *FV* (GA) kod ispitivane. Nadalje, genotip *MTHFR* (CC i TT) su zastupljeniji kod kontrolne skupine, dok *PAI* (4G/4G) i (5G/5G) kod ispitivane skupine. Jedino nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti genotipa *FXIII* između dviju skupina ($p > 0,05$) (Slika 6).



Slika 6. Grafički prikaz zastupljenosti genotipa u kontrolnoj i ispitivanoj skupini

5.4. Analiza povezanosti haplotipova i genotipova između ispitivane i kontrolne skupine

U Tablici 6, istražili smo vjerojatnost povezanosti između haplotipova i ispitivane skupine, odnosno žena koje su imale minimalno jedan spontani pobačaj u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 6). Analizom rezultata nije utvrđena statistički značajna povezanost između haplotipova i spontanog pobačaja (Tablica 6).

Tablica 6. Testiranje vjerojatnosti povezanosti između haplotipova i ispitivane skupine

Haplotip	FV	FII	MTHFR	FXIII	PAI	HAPLOTIP FREKVENCija	OR (95% CI)	<i>p</i>
1	GA	GG	CC	GG	4G/5G	0,05128	8,76 (0,46-165,61)	0,15
2	GA	GG	CC	GT	4G/5G	0,01282	2,81 (0,11-70,00)	0,53
3	GA	GG	CC	GT	5G/5G	0,01282	2,81 (0,11-70,00)	0,53
4	GA	GG	CT	GG	4G/4G	0,01282	2,81 (0,11-70,00)	0,53
5	GA	GG	CT	GG	4G/5G	0,01282	0,45 (0,04-5,12)	0,52
6	GA	GG	CT	GT	5G/5G	0,01282	2,81 (0,11-70,00)	0,53
7	GA	GG	TT	GG	4G/4G	0,01282	0,92 (0,06-15,02)	0,96
8	GA	GG	TT	GG	5G/5G	0,01282	0,92 (0,06-15,02)	0,96
9	GG	GG	CC	GG	4G/5G	0,14103	1,31 (0,49-3,47)	0,58
10	GG	GG	CC	GG	5G/5G	0,05128	1,89 (0,34-10,66)	0,47
11	GG	GG	CC	GT	4G/4G	0,08974	1,68 (0,47-5,98)	0,43
12	GG	GG	CC	GT	4G/5G	0,06410	1,58 (0,36-6,84)	0,54
13	GG	GG	CC	GT	5G/5G	0,03846	0,68 (0,15-3,15)	0,62
14	GG	GG	CC	TT	4G/4G	0,01282	2,81 (0,11-70,00)	0,53
15	GG	GG	CC	TT	4G/5G	0,02564	4,74 (0,22-100,39)	0,32
16	GG	GG	CT	GG	4G/4G	0,03846	2,84 (0,29-27,94)	0,37
17	GG	GG	CT	GG	4G/5G	0,14103	1,02 (0,4 -2,56)	0,97
18	GG	GG	CT	GG	5G/5G	0,03846	2,84 (0,29-27,94)	0,37
19	GG	GG	CT	GT	4G/4G	0,05128	1,24 (0,27-5,76)	0,78
20	GG	GG	CT	GT	4G/5G	0,07692	0,58 (0,20-1,73)	0,33
21	GG	GG	CT	GT	5G/5G	0,02564	0,45 (0,08-2,52)	0,36
22	GG	GG	CT	TT	5G/5G	0,01282	2,81 (0,11-70,00)	0,53
23	GG	GG	TT	GG	4G/4G	0,01282	0,46 (0,04-5,12)	0,52
24	GG	GG	TT	GG	5G/5G	0,01282	2,81 (0,11-70,00)	0,53
25	GG	GG	TT	GT	4G/4G	0,01282	0,92 (0,06-15,02)	0,96
26	GG	GG	TT	GT	5G/5G	0,01282	2,81 (0,11-70,00)	0,53

U Tablici 7, prikazani su rezultati vjerojatnosti povezanosti između genotipova kod dvije skupine (ispitivane i kontrolne). Dobiveni rezultati pokazuju da nije utvrđena povezanost između genotipova s obzirom na ispitivanu i kontrolnu skupinu ($p>0,05$).

Tablica 7. Testiranje vjerojatnosti povezanosti između genotipova s obzirom na ispitivanu i kontrolnu skupinu

Genotip	OR (95% CI)	<i>p</i>
<i>FV GG+GA vs. AA</i>	-	-
<i>FII GG+GA vs. AA</i>	-	-
<i>MTHFR CC+CT vs. TT</i>	0,42 (0,15-0,18)	0,09
<i>FXIII GG+GT vs. TT</i>	0,92 (0,22-3,82)	0,91
<i>PAI 5G5G+4G5G vs. 4G4G</i>	1,46 (0,66-3,23)	0,35

6. RASPRAVA

Spontani pobačaj jedan je od prevladavajućih negativnih reproduktivnih ishoda među ženama diljem svijeta, što predstavlja veliki izazov za promicanje zdravlja majki.

Kada doživljavaju uzastopne neuspjele trudnoće, parovi koji žele imati djecu prolaze kroz znatan psihički teret. Međutim, temeljni patofiziološki mehanizmi pobačaja ostaju nejasni i često kontroverzni. Predloženo je nekoliko prepoznatljivih čimbenika rizika, kao što su anatomske, endokrini, imunološki, inficirani i genetski poremećaji, ali u do 30-50% slučajeva uzroci ostaju neobjašnjeni nakon sveobuhvatnog istraživanja.

Habitualni pobačaj je važna klinička situacija jer uz sav napredak u genetskim i imunološkim istraživanjima inkriminirajući čimbenici još nisu otkriveni. Liječenje je također podložno kontroverzama, smatra se ili neučinkovitim ili agresivnim (Manolea i sur. 2015).

Otprilike 1-5% pacijentica koje pokušavaju zatrudnjeti imaju habitualne pobačaje. Za 50% tih pacijentica uzrok pobačaja nije poznat. Nasljedna trombofilija kao što je mutacija gena faktora *V Leiden*, mutacija gena za *Protrombin (PT 20210A)* i nedostaci prirodnih antikoagulansa kao što su protein C, protein S i antitrombin povezani su s habitualnim pobačajem (Manolea i sur. 2015).

U ovom istraživanju utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti broja ispitanica u kontrolnoj i ispitivanoj skupini (Slika 4). Također nije utvrđena statistički značajna razlika u dobi (Slika 5). Najvažniji osvrt ovog istraživanja predstavljaju rezultati raspodjele ispitanica prema zastupljenosti genotipova. Rezultati pokazuju da najveći broj ispitanica u obje skupine ima zastupljen genotip *FII* (GG) (100,0% - ispitivana skupina; 94,4% - kontrolna skupina). Niti u jednoj od skupina nitko nema zastupljen genotip *FV* (AA). Prikazana je statistički značajna razlika u zastupljenosti genotipa *FII*, *FV*, *MTHFR* i *PAI* između ispitivane i kontrolne skupine koja iznosi ($p < 0,05$) (Slika 6). Dobiveni rezultati prikazani su u frekvencijama. Analizirana je povezanost genotipova i haplotipova između ispitivane i kontrolne skupine. Nije utvrđena povezanost između genotipova s obzirom na ispitivanu i kontrolnu skupinu ($p > 0,05$) (Tablica 6). Istražena je vjerojatnost povezanosti između haplotipova i ispitivane skupine, odnosno žena koje su imale minimalno jedan spontani pobačaj u odnosu na kontrolnu skupinu. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između haplotipova i spontanog pobačaja prema dobivenim rezultatima (Tablica 7). Ne može se govoriti, odnosno tvrditi da prisutnost nekog od haplotipova značajno povećava izgled, odnosno vjerojatnost za spontani pobačaj.

Sustavni pregled istraživanja Pereza i sur. (2017) uključio je 428 istraživanja od 1990. do 2015., koje su se značajno razlikovale u pogledu definicije ponavljajućeg pobačaja, kliničke evaluacije pacijenata i odabira kontrolnih subjekata. Kod žena su ispitane 472 varijante u 187 gena. Meta-analize su provedene za 36 varijanti u 16 gena. Povezanost s tri ili više spontanih pobačaja otkrivena je za 21 varijantu gena uključenih u imunološki odgovor (IFNG, IL10, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, MBL, TNF), koagulaciju (F2, F5, PAI-1, PROZ), metabolizam (GSTT1, MTHFR) i angiogenezu (NOS3, VEGFA) (Pereza i sur. 2017).

Prema istraživanju Zhang i sur. (2017) stupanj rizika od ponavljajućeg pobačaja procijenjen je korištenjem omjera izgleda (OR) i 95% intervala pouzdanosti (CI). Sve u svemu, nasumični učinci OR bili su 1,464 (95% CI: 1,269-1,690) za 4G naspram 5G, 2,075 (95% CI: 1,563-2,754) za 4G/4G naspram 5G/5G, 1,457 (95% CI: 1,211-1,753) za 4G/5G u odnosu na 5G/5G, 1,743 (95% CI: 1,358-2,236) za 4G/4G u odnosu na 4G/5G i 5G/5G i 1,600 (95% CI: 1,327-1,930) za 4G/4G i 4G/5G u odnosu na 5G/5G, što ukazuje da bi polimorfizam gena *PAI-1* 4G/5G mogao dovesti do povećanog rizika od ponavljajućeg pobačaja. Nadalje, analiza podskupina pokazala je značajno povećanu osjetljivost na ponavljajući pobačaj u Azijata, Kavkazaca i Afrikanaca. Stoga je ovo istraživanje pokazalo da polimorfizam *PAI-1* 4G/5G vjerojatno daje genetski doprinos razvoju pobačaja. Rezultati mogu pomoći u razvoju teorijske osnove za učinkovite pristupe za prevenciju i liječenje ponavljajućeg pobačaja (Zhang i sur. 2017).

Prema Liu i sur. (2019), polimorfizam *MTHFR C677T* imao je mali učinak na koncentraciju spermija i stopu trudnoće. Međutim, polimorfizam *C677T* mogao je utjecati na cjelovitost DNA sperme utječući na metilaciju DNA, što je dovelo do povećanja stope ranog spontanog pobačaja. Polimorfizam *C677T* gena *MTHFR* treba ispitati prije trudnoće. Zbog male veličine uzorka, potrebno je napraviti daljnja istraživanja s velikim uzorkom kako bi se potvrdili rezultati ovog istraživanja (Liu i sur. 2019).

U slučajevima neobjašnjivog pobačaja, učestalosti alela *T677* i genotipa *TT* imale su tendenciju porasta prema broju prethodnih spontanih pobačaja, ali porast je bio bez statističke značajnosti: učestalosti alela *T677* i genotipa *TT* u žena s dva pobačaja bile 18,2% i 0%, dok su u žena s tri pobačaja učestalosti bile 38,0% i 9,5%, a u žena s četiri ili više pobačaja učestalosti su bile 50,0% odnosno 16,7%. Osim toga, nije otkrivena nikakva mutacija faktora *V Leiden* u žena s pobačajem ili u kontrolnoj skupini. Ni *T677 MTHFR* ni mutacija faktora *V Leiden* nisu bile povezane s neobjašnjivim ponovljenim pobačajem u japanskoj populaciji (Kobashi i sur. 2005).

Trudnice s nasljednom trombofilijom imaju povećan rizik od ponovljenog pobačaja, posebno za trudnice s mutacijom gena *G1691A* za faktor *V Leiden*, mutacijom *G20210A* gena za protrombin (PGM) i nedostatkom proteina S (PS). Uključeno je ukupno 89. istraživanja koja su uključivala 30 254 osobe. Rezultati su pokazali da žene s mutacijom gena faktora *V Leiden* (omjer izgleda (OR): 2,44, 95% CI: 1,96-3,03), PGM (OR: 2,08, 95% CI: 1,61-2,68) ili nedostatkom PS (OR: 3,45, 95% CI: 1,15–10,35) imali su veći rizik od razvoja ponovljenog pobačaja. U usporedbi s referentnom skupinom, nije uočena veza između nedostatka AT ili PC i habitualnog pobačaja (svi $p > 0,05$). Heterogenost u procjenama rizika djelomično je objašnjena geografskom regijom, definicijama, vrstama i kontroliranim zbunjujućim faktorima. Analize osjetljivosti potvrdile su robusnost nalaza (Liu i sur. 2021).

Gen *MTHFR C677T (TT)* povezuje se s pojavom hiperhomocisteinemije, a njegova visoka ekspresija često ukazuje da je rizik od spontanog pobačaja znatno povećan, što može dati novi smjer istraživanja za zdravlje majki (Zhang i sur. 2021).

U istraživanje Li i sur. (2015) uključeno je devet istraživanja s 10 skupova podataka. Pozitivna povezanost otkrivena je u skupnim rezultatima za dominantni model (Val/Val+Val/Leu naspram Leu/Leu; OR=0,417, 95% CI: 0,180–0,965, $I^2=45,60\%$) i kodominantni model (Val/Val u odnosu na Val/Leu; OR=0,638, 95% CI: 0,452–0,899, $I^2=36,40\%$) za polimorfizme *FXIII Val34Leu*. Međutim, nije otkrivena statistički značajna povezanost između polimorfizama β -fibrinogena - 455G/A i ponovljenog spontanog pobačaja u četiri različita modela, uključujući analize podskupina azijskih i bijelaca (Li i sur. 2015).

Rezultati Joksic i sur. (2020) nisu pokazali značajan porast prevalencije testiranih polimorfizama u žena s ponovnim gubitkom trudnoće. Međutim, relativni rizik za ponovni gubitak trudnoće među ženama heterozigotima za *FXIII V34L* bio je 2,81 puta povećan (OR 2,81, 95% CI 1,15-6,87, $p=0,023$). Analiza haplotipa pokazala je da kombinirana prisutnost visokorizičnih genotipova za *FXIII* i *PAI-1* značajno povećava rizik za ponovljeni gubitak trudnoće (OR 13,98, CI 95% 1,11-17,46, $P=0,044$) (Joksic i sur. 2020).

Ovim istraživanjem nije pronađena statistički značajna razlika između kontrolne i ispitivane skupine u polimorfizmima *FV(AA)* i *FXIII*. Ograničenije istraživanja predstavlja mali broj uzoraka. Sljedeća istraživanja trebalo bi provesti na većem broju ispitanica budući da i druga istraživanja s većim brojem ispitanica koja su istraživala iste polimorfizme imaju kontradiktorne rezultate. Uzrok spontanog pobačaja još uvijek ostaje neobjašnjiv i potrebno je istražiti genetsku predispoziciju.

7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti:

- Analizom je utvrđeno da najveći broj ispitanica u obje skupine (žena koje su imale spontani pobačaj i žena koje nisu imale spontani pobačaj) ima zastupljen genotip *FII* (GG) dok genotip *FV* (AA) nije zastupljen niti u jednoj skupini.
- Utvrđena je statistički značajna razlika u zastupljenosti genotipa *FII*, *FV*, *MTHFR* i *PAI* između žena koje su imale spontani pobačaj u odnosu na žene koje nisu imale spontani pobačaj.
- Genotip *FII* (GG) je zastupljeniji kod žena koje su imale spontani pobačaj u odnosu na žene koje nisu imale spontani pobačaj, *FV* (GG) je zastupljeniji kod žene koje nisu imale spontani pobačaj, dok *FV* (GA) kod žena koje su imale spontani pobačaj.
- genotip *MTHFR* (CC i TT) je zastupljeniji kod žena koje nisu imale spontani pobačaj, dok *PAI* (4G/4G) i (5G/5G) je zastupljeniji kod žena koje su imale spontani pobačaj.
- Između žena koje su imale spontani pobačaj u odnosu na žene koje nisu imale spontani pobačaj, nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti genotipa *FXIII*.
- Analizom nije utvrđena povezanost genotipova između žena koje su imale spontani pobačaj u odnosu na žene koje nisu imale spontani pobačaj.
- Dobivenim rezultatima nije utvrđena statistički značajna povezanost između haplotipova i spontanog pobačaja
- Ovo istraživanje doprinijelo je novim saznanjima o alelnoj frekvenciji istraživanih polimorfizama populacije u Hercegovini koja do sada nije analizirana. Također, ovo istraživanje može koristiti sljedećim istraživanjima, kao što su meta analize i sustavni pregledni radovi u otkrivanju povezanosti polimorfizama i spontanih pobačaja.

8. LITERATURA

1. Yamada, H., Kato, E. H., Kobashi, G., Ebina, Y., Shimada, S., Morikawa, M., Yamada, T., Sakuragi, N., Fujimoto, S. (2001): Recurrent pregnancy loss: etiology of thrombophilia. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 27(2): 121–129.
2. Bloomenthal D., von Dadelszen P., Liston R., Magee L., Tsang P. (2002): The effect of factor V Leiden carriage on maternal and fetal health. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = Journal de l'Association Medicale Canadienne*. 167(1): 48–54.
3. Zetterberg, H., Zafiroopoulos, A., Spandidos, D. A., Rymo, L., Blennow, K. (2003): Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C>T and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 18(9): 1948–1950.
4. Sánchez Carpio, C., Rodi, E., Piola, P., & Fernanda Piola, M. (2004): Trombofilia--estado actual [Trombofilia--current status]. *Revista de la Facultad de Ciencias Medicas (Cordoba, Argentina)*. 61(1): 32–36.
5. Kobashi, G., Kato, E. H., Morikawa, M., Shimada, S., Ohta, K., Fujimoto, S., Minakami, H., Yamada, H. (2005): MTHFR C677T Polymorphism and factor V Leiden mutation are not associated with recurrent spontaneous abortion of unexplained etiology in Japanese women. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 31(3): 266–271.
6. van Dunné, F. M., Doggen, C. J., Heemskerk, M., Rosendaal, F. R., Helmerhorst, F. M. (2005): Factor V Leiden mutation in relation to fecundity and miscarriage in women with venous thrombosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 20(3): 802–806.
7. Arredondo F., Noble L. S. (2006): Endocrinology of recurrent pregnancy loss. *Seminars in Reproductive Medicine*. 24(1): 33–39.
8. Blickstein I. (2006): Thrombophilia and women's health: An overview. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 33(3): 347–356.
9. Khan S., Dickerman J. D. (2006): Hereditary thrombophilia. *Thrombosis journal*. 4: 15.
10. Hsieh, L., Nugent, D. (2008): Factor XIII deficiency. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia*. 14(6): 1190–1200.
11. Husar D., Đelmiš J. (2008): Trombofilija i njezin utjecaj na ishod trudnoće. 17(3): 150-156.
12. Weselak M., Arbuckle T. E., Walker M. C., Krewski D. (2008): The influence of the environment and other exogenous agents on spontaneous abortion risk. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical Reviews*. 11(3-4): 221–241.

13. Rodríguez-Guillén, M., Torres-Sánchez, L., Chen, J., Galván-Portillo, M., Blanco-Muñoz, J., Anaya, M. A., Silva-Zolezzi, I., Hernández-Valero, M. A., López-Carrillo, L. (2009): Maternal MTHFR polymorphisms and risk of spontaneous abortion. *Salud Publica de Mexico*. 51(1): 19–25.
14. Andreis, I., Batinić, D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjic D. (2010): *Imunologija*, sedmo, obnovljeno i dopunjeno izdanje. Medicinska naklada, Zagreb.
15. Jeddi-Tehrani, M., Torabi, R., Mohammadzadeh, A., Arefi, S., Keramatipour, M., Zeraati, H., Zarnani, A. H., Akhondi, M. M., Mahmoudian, J., Mahmoudi, A. R., Zarei, S. (2010): Investigating Association of Three Polymorphisms of Coagulation Factor XIII and Recurrent Pregnancy Loss. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*. 64(3): 212–217.
16. de Jong, P. G., Goddijn, M., Middeldorp, S. (2011): Testing for inherited thrombophilia in recurrent miscarriage. *Seminars in reproductive medicine*. 29(6): 540–547.
17. McNamee, K., Dawood, F., Farquharson, R. G. (2012): Thrombophilia and early pregnancy loss. *Best practice & research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 26(1): 91–102.
18. Miranda-Vilela A. L. (2012): Role of polymorphisms in factor V (FV Leiden), prothrombin, plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and cystathionine β -synthase (CBS) genes as risk factors for thrombophilias. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 12(10): 997–1006.
19. Jurkovic D., Overton C., Bender-Atik R. (2013): Diagnosis and management of first trimester miscarriage. *BMJ (Clinical research ed.)*. 19: 346-f3676.
20. Larsen E. C., Christiansen O. B., Kolte A. M., Macklon N. (2013): New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC medicine* 11: 154
21. Đelmiš J., Orešković S. (2014): *Fetalna medicina i opstetricija*. Medicinska naklada, Zagreb.
22. Yasar Yildiz, S., Kuru, P., Toksoy Oner, E., Agirbasli, M. (2014): Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1. *TheScientificWorldJournal*. 2014: 858293.
23. Gao, H., Tao, F. B. (2015): Prothrombin G20210A mutation is associated with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis update. *Thrombosis Research*.135(2): 339–346.

24. Li, J., Wu, H., Chen, Y., Wu, H., Xu, H., Li, L. (2015): Genetic association between FXIII and β -fibrinogen genes and women with recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 32(5): 817–825.
25. Liew, S. C., Gupta, E. D. (2015): Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *European Journal of Medical Genetics*. 58(1): 1–10.
26. Manolea M., Neamtu S., Alexandru D., Rica R., Novac L. (2015): Statistical Correlations of the Spontaneous Abortion with Trombophilia and Other Associated Pathologies. *Current Health Sciences Journal*. 41(2): 158-164.
27. Campello E., Spiezia L., Simioni P. (2016): Diagnosis and management of factor V Leiden. *Expert Review of Hematology*. 9(12): 1139–1149.
28. Salazar Garcia, M. D., Sung, N., Mullenix, T. M., Dambaeva, S., Beaman, K., Gilman-Sachs, A., Kwak-Kim, J. (2016): Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/5G Polymorphism is Associated with Reproductive Failure: Metabolic, Hormonal, and Immune Profiles. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*. 76(1): 70–81.
29. Stevens S. M., Woller S. C., Bauer K. A., Kasthuri R., Cushman. M., Streiff M., Lim W., Douketis J. D. (2016): Guidance for the evaluation and treatment of hereditary and acquired thrombophilia. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 41(1): 154–164.
30. Pereza N., Ostojić S., Kapović M., Peterlin B. (2017): Systematic review and meta-analysis of genetic association studies in idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Fertility and Sterility*. 107(1): 150-159.
31. Girolami, A., Cosi, E., Ferrari, S., Girolami, B. (2018): Prothrombin: Another Clotting Factor After FV That Is Involved Both in Bleeding and Thrombosis. *Clinical and Applied*. 24(6): 845-849.
32. Campello E., Spiezia L., Adamo A., Simioni P. (2019): Thrombophilia, risk factors and prevention. *Expert Review of Hematology*. 12(3): 147–158.
33. Dautaj A., Krasi, G., Bushati V., Precone V., Gheza M., Fioretti F., Sartori M., Costantini A., Benedetti S., Bertelli M. (2019): Hereditary thrombophilia. *Acta bio-medica: Atenei Parmensis*. 90(10-S): 44–46.
34. Liu, Y., Zhang, F., Dai, L. (2019): C677T polymorphism increases the risk of early spontaneous abortion. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 36(8): 1737–1741.

35. Turocy J. M., Rackov B. W. (2019): Uterine factor in recurrent pregnancy loss. *Seminars in Perinatology*. 43(2): 74–79.
36. Factor V Leiden (mrežna stranica). (2020). Dostupno na: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/factor-v-leiden/symptoms-causes/syc-20372423>.
37. Joksic I., Mikovic Z., Filimonovic D., Munjas J., Egic A., Joksic G. (2020): Combined presence of coagulation factor XIII V34L and plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G gene polymorphisms significantly contribute to recurrent pregnancy loss in Serbian population. *Journal of Medical Biochemistry*. 39(2): 199-207
38. Viotti M. (2020): Preimplantation Genetic Testing for Chromosomal Abnormalities: Aneuploidy, Mosaicism, and Structural Rearrangements. *Genes*. 11(6): 602.
39. Zhang, Q., Jin, Y., Li, X., Peng, X., Peng, N., Song, J., Xu, M. (2020): Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphisms and risk of venous thromboembolism - a meta-analysis and systematic review. *VASA. Zeitschrift für Gefasskrankheiten*. 49(2): 141–146.
40. Liu X., Chen Y., Ye C., Xing D., Wu R., Li F., Chen L., Wang T. (2021): Hereditary thrombophilia and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. 36(5): 1213–1229.
41. Zhang L., Fu H., Wei T. (2021): MTHFR gene polymorphism and homocysteine levels in spontaneous abortion of pregnant women. *American Journal of Translational Research*. 13(6): 7083-7088
42. Chaudhry, R., Usama, S. M., Babiker, H. M. (2021): Physiology, Coagulation Pathways. 2021 Sep 1. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan.

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 14. 08. 1998. godine u Mostaru, Bosna i Hercegovina. Nakon završene Osnovne škole Petra Bakule, 2013. godine upisujem Gimnaziju fra Grge Martića u Mostaru. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja 2017. godine upisujem preddiplomski sveučilišni studij jednopredmetne Biologije na Fakultetu prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti Sveučilišta u Mostaru. Nakon završetka preddiplomskog studija 2020. godine upisujem diplomski sveučilišni studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.