

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**BIOLOŠKI FAKULTET**

Jelena Ž. Đurović

**Analiza polimorfizama gena za receptor  
za vitamin D i gena asociranih sa  
trombofilijom kod žena sa idiopatskim  
infertilitetom**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY**

Jelena Ž. Đurović

**Analysis of the polymorphisms in vitamin  
D receptor gene and genes associated  
with thrombophilia in women with  
idiopathic infertility**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2017

## PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

### MENTORI

**dr Oliver Stojković**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

**dr Katarina Zeljić**, docent

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

### ČLAN KOMISIJE

**dr Gorana Stamenković**, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za Biološka Istraživanja „Siniša Stanković“

Datum odbrane: \_\_\_\_\_2017.godine

## ZAHVALNICA

Najsrdačnije se zahvaljujem svojim mentorima, prof. dr Oliveru Stojkoviću i doc. dr Katarini Zeljić, na ukazanom poverenju i nesebičnoj pomoći u toku studija i izrade ove doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem dr Gorani Stamenković koja me je uvela u svet nauke i imala strpljenja za mene i sva moja pitanja od osnova pipetiranja pa do poslednje stranice ove teze.

Iskrenu zahvalnost dugujem i dr Jeleni Todorović na dobroj saradnji, strpljivim odgovorima i svim objašnjenjima vezano za kliničku praksu.

Veliku zahvalnost dugujem i svojim kolegama iz DNK laboratorije Instituta za sudsku medicinu na svim savetima, zajedničkom radu i lepom vremenu provedenom u laboratoriji.

Kolegama sa odeljenja za Medicinsku genetiku, Medicinskog Fakulteta, COMU Univerziteta u Turskoj, a posebno prof. Ozturk Ozdemiru i prof. Fatmi Silan na saradnji, korisnim savetima i nezaboravnom vremenu provedenom u njihovoj laboratoriji i njihovoj zemlji.

Veliko hvala svim mojim prijateljima koji su bili uz mene u različitim fazama i situacijama i činili moje dane zabavnijim i ispunjenijim.

Mom Marku, čija je blizina i podrška, uvek i u svemu, bila moj oslonac i stabilnost proteklih godina.

Najlepše hvala mojim Đurovićima i Cicovićima, bez kojih ja danas ne bih bila to što jesam.

Ipak, najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Ljiljani i Žarku, i svojoj braći, Darku, Nikoli i Mihailu, čija podrška mi je uvek davala snagu i osećaj da „Mogu“.

Jelena Đurović

## **Analiza polimorfizama gena za receptor za vitamin D i gena asociranih sa trombofilijom kod žena sa idiopatskim infertilitetom**

### **SAŽETAK**

**Uvod.** Genetičke analize mogu ukazati na uzrok infertiliteta kod žena kod kojih klinički testovi nisu uspjeli da utvrde razloge reproduktivnog neuspjeha.

**Cilj.** Cilj ovog rada je da se ispita postojanje veze genskih polimorfizama asociranih sa trombofilijom i polimorfizama u genu za receptor za vitamin D (VDR) sa idiopatskim infertilitetom.

**Materijal i metode.** U studiju je uključeno 117 pacijentkinja sa idiopatskim infertilitetom, kao i 130 žena sa najmanje jednom trudnoćom realizovanom bez komplikacija. Primenom TaqMan metode uzorci su genotipizirani u odnosu na polimorfizme: *FV* 1691 G>A, *FII* 20210 G>A, *MTHFR* 677 C>T, *MTHFR* 1298 A>C, *PAI-1* -675 4G/5G, *ATIII* 786 G>A, *ACE* I/D i *ITGB3* 1565 T>C, dok su polimorfizmi u *VDR* genu analizirani primenom restrikcionih enzima (FokI, BsmI, ApaI i TaqI).

**Rezultati.** Ispitivanjem etioloških faktora pokazano je da je porodična anamneza značajan faktor pri proceni individualnog rizika za infertilitet. Utvrđeno je da visokorizične varijante *FV* 1691A i *FII* 20210A predstavljaju nezavisne faktore rizika za nastanak primarnog infertiliteta. Analizom multilokusnih interakcija definisani su kompleksniji genotipovi asocirani sa sekundarnim infertilitetom. Ispitivanja polimorfizama u *VDR* genu pokazala su postojanje protektivne uloge alela F u FokI i alela B u BsmI polimorfizmu. Pored toga, analizom vezanosti markera u *VDR* genu identifikovano je postojanje haplotipova, od kojih je bAT povećavao rizik za sekundarni infertilitet, dok je BAT imao protektivnu ulogu za nastanak primarnog infertiliteta.

**Zaključak.** Analiza polimorfizama u genima asociranim sa trombofilijom i genu za *VDR* ne samo da definiše moguće kliničko-genetičke dijagnostičke procedure, već

sugeriše moguće mehanizme za održavanje hemostatskog i imunološkog balansa u procesu reprodukcije.

**Ključne reči:** idiopatski infertilitet, geni asocirani sa trombofilijom, VDR gen, multilokusne interakcije

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Genetika

**UDK:** 612.663: [575.22:[[577.117+577.161.2]+612.115]](043.3)

## **Analysis of the polymorphisms in vitamin D receptor gene and genes associated with thrombophilia in women with idiopathic infertility**

### **ABSTRACT**

**Introduction.** Genetic analysis may indicate cause of infertility in women to whom clinical trials have failed to determine the causes of reproductive failure.

**Aim.** The aim of this study is to investigate a link between polymorphisms associated with thrombophilia and polymorphisms in the vitamin D receptor gene (*VDR*) with idiopathic infertility.

**Material and methods.** This study included 117 female patients with idiopathic infertility, as well as 130 women with at least one pregnancy without complications. Using TaqMan method, the samples were genotyped for polymorphisms: *FV* 1691 G>A, *FII* 20210 G>A, *MTHFR* 677 C>T, *MTHFR* 1298 A>C, *PAI-1* -675 4G/5G, *ATIII* 786 G>A, *ACE* I/D and *ITGB3* 1565 T>C, while *VDR* gene polymorphisms were analyzed using restriction enzymes (FokI, BsmI, ApaI and TaqI).

**Results.** Examination of etiological factors has shown that family history is a significant factor in assessing individual risk for infertility. High risk variants *FV* 1691A and *FII* 20210A have been shown to be independent risk factors for occurrences of primary infertility. An analysis of multilocus interactions defined more complex genotypes associated with secondary infertility. Polymorphisms testing in *VDR* gene showed the existence of a protective role of allele F in FokI and allele B in BsmI polymorphisms. In addition, the analysis of the linkage in *VDR* gene identified the existence of haplotypes, of which bAT increased the risk of secondary infertility, while BAT had a protective role of primary infertility.

**Conclusions.** The analysis of polymorphisms in the genes associated with thrombophilia and the *VDR* gene not only defines possible clinical-genetic diagnostic procedures, but suggests possible mechanisms for maintaining hemostatic and immune balance in the reproductive process.

**Keywords:** idiopathic infertility, genes associated with thrombophilia, *VDR* gene, multilocus interactions

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Genetics

**UDC:** 612.663: [575.22:[577.117+577.161.2]+612.115]](043.3)



# SADRŽAJ

## Skraćenice

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Infertilitet, definicija i epidemiologija .....	<b>2</b>
1.1.1. Uzroci i podela infertiliteta .....	<b>3</b>
1.1.2. Idiopatski infertilitet i asistirana reprodukcija .....	<b>6</b>
1.2. Trombofilija .....	<b>8</b>
1.2.1. Hemostaza - primarna, sekundarna (koagulacija) i fibrinoliza.....	<b>8</b>
1.2.2. Stečena i nasledna trombofilija .....	<b>16</b>
1.2.3. Polimorfizmi asocirani sa trombofilijom .....	<b>20</b>
1.2.3.1. Faktor V 1691 G>A .....	<b>21</b>
1.2.3.2. Faktor II 20210 G>A .....	<b>24</b>
1.2.3.3. <i>MTHFR</i> : 677 C>T i 1298 A>C .....	<b>26</b>
1.2.3.4. <i>PAI-1</i> -675 4G/5G .....	<b>30</b>
1.2.3.5. <i>ATIII</i> 786 G>A .....	<b>33</b>
1.2.3.6. <i>ACE I/D</i> .....	<b>35</b>
1.2.3.7. <i>ITGB3</i> 1565 T>C .....	<b>36</b>
1.2.4. Trombofilija i reprodukcija .....	<b>38</b>
1.2.5. Terapija trombofilija u toku trudnoće .....	<b>44</b>
1.3. Vitamin D .....	<b>46</b>
1.3.1. Sinteza i metabolizam vitamina D .....	<b>46</b>
1.3.2. Biološke funkcije vitamina D .....	<b>48</b>
1.3.3. Receptor za vitamin D - VDR receptor. ....	<b>51</b>
1.3.4. Gen za receptor za vitamin D - <i>VDR</i> gen .....	<b>56</b>
1.3.4.1. FokI rs2228570 .....	<b>58</b>
1.3.4.2. BsmI rs1544410-ApaI rs7975232-TaqI rs731236 .....	<b>60</b>
1.3.5. Vitamin D i reprodukcija .....	<b>61</b>

1.4. Vitamin D i trombofilija .....	64
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>66</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>69</b>
3.1. Ispitivane grupe .....	70
3.2. Biološki uzorci i izolacija DNK .....	71
3.3. Real-Time PCR genotipizacija .....	71
3.3.1. Genotipizacija Real Time PCR metodom sa TaqMan probama ...	71
3.3.2. Genotipizacija HRM metodom .....	74
3.4. Genotipizacija RFLP metodom .....	75
3.5. Statistička analiza .....	77
<b>4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>81</b>
4.1. Analiza zastupljenosti etioloških faktora kod ispitivanih grupa .....	82
4.2. Analiza polimorfizama asociranih sa trombofilijom .....	85
4.2.1. Pojedinačno analizirani polimorfizmi asocirani sa trombofilijom .....	87
4.2.2. Analiza multilokusnih interakcija polimorfizama asociranih sa trombofilijom .....	93
4.3. Analiza polimorfizama u <i>VDR</i> genu .....	101
4.3.1. Pojedinačno analizirani polimorfizmi u <i>VDR</i> genu .....	103
4.3.2. Analiza haplotipova polimorfizama u <i>VDR</i> genu .....	107
4.3.3. Analiza multilokusnih interakcija polimorfizama u <i>VDR</i> genu .....	113
4.4. Analiza multilokusnih interakcija svih ispitivanih polimorfizama .....	115
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>120</b>
5.1. Etiološki faktori i infertilitet .....	121
5.2. Nasledna trombofilija .....	123

5.2.1. Pojedinačni lokusi u genima asociranim sa trombofilijom .....	127
5.2.2. Analiza asocijacije infertiliteta sa kombinacijama multilokusnih polimorfizama gena udruženih sa trombofilijom .....	140
5.3. VDR polimorfizmi .....	144
5.3.1. FokI kao nezavisan prognostički faktor .....	144
5.3.2. BsmI, ApaI i TaqI - pojedinačno analizirani lokusi .....	146
5.3.3. BsmI, ApaI i TaqI - haplotipski analizirani lokusi .....	147
5.3.4. Multilokusne interakcije polimorfizama u VDR genu .....	149
5.4. Trombofilija i VDR .....	150
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>151</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>154</b>
<b>8. BIOGRAFIJA AUTORA .....</b>	<b>197</b>
<b>9. PRILOZI .....</b>	<b>199</b>

## Skraćenice:

WHO - Svetska zdravstvena organizacija, engl. *World Health Organization*

ART - tehnologija asistirane reprodukcije, engl. *Assisted Reproductive Technology*

vWF - Von Willebrandov Faktor

TF - tkivni faktor

tFPI - inhibitor puta tkivnog faktora

tPA - tkivni aktivator plazminogena

uPA - urokinazni aktivator plazminogena

FDP - produkti degradacije fibrinogena, engl. *Fibrinogen Degradation Products*

PAI-1 - plazminogen aktivator inhibitor tip 1

ACE - angiotenzin konvertujući enzim

RAS - renin angiotenzin sistem

GPI - glikozil-fosfatidilinozitol

AT1 - angiotenzin tip 1

APS - antifosfolipidni sindrom

IVF - *in vitro* fertilizacija

ATIII - antitrombin III

PC - protein C

PS - protein S

DVT - duboke venske tromboze

MTHFR - metilentetrahidrofolat reduktaza

SNP - jednonukleotidni polimorfizmi, engl. *Single Nucleotide Polymorphism*

APCR - rezistencija na aktivirani protein C, engl. *Activated Protein C Resistance*

FVL - Factor V Leiden mutacija

APC - aktivirani protein C

CVD - kardiovaskularne bolesti, engl. *Cardio Vascular Diseases*

VT - venske tromboze

NTD - defekti neuralne tube, engl. *Neural Tube Defect*

ECM - ekstracelularni matriks

RPL - ponovljeni gubici ploda, engl. *Recurrent Pregnancy Loss*

ATIII - antitrombin III

IUGR - intrauterina restrikcija rasta, engl. *Intrauterine Growth Restriction*

UFH - nefrakcionisani heparin, engl. *Unfractionated Heparin*

LMWH - heparin niske molekulske težine, engl. *Low Molecular Weight Heparin*

aPTT - aktivisano parcijalno tromboplastinsko vreme, engl. *Activated Partial Thromboplastin Time*

DBP - vitamin D vezujući protein, engl. *Vitamin D Binding Protein*

VDR - receptor za Vitamin D

HDL - lipoprotein holesterol visoke gustine, engl. *High Density Lipoprotein Cholesterol*

LDL- lipoprotein holesterol niske gustine, engl. *Low Density Lipoprotein Cholesterol*

Th1 - T pomoćne 1 ćelije, engl. *T helper 1*

IFN-  $\gamma$  - interferon gama

IL-2 - interleukin 2

TNF- $\alpha$  - faktor nekroze tumora alfa

Treg - T regulatorne ćelije

Th2 - T pomoćne 2 ćelije, engl. *T helper 2*

AF2 - faktor funkcije 2

RXR - retinoid X receptor

VDRE - engl. *Vitamin D Response Elements*

BMD - mineralna koštana gustina, engl. *Bone Mineral Density*

LD - neravnoteža vezanosti, engl. *Linkage Disequilibrium*

BMI - indeks telesne mase, engl. *Body Mass Index*

HGVS - engl. *Human Gene Variants Society*

FRET - transfera energije fluorescentnom rezonancijom, engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta, engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*

HRM - topljenje visoke rezolucije, engl. *High Resolution Melting*

RFLP - polimorfizmi dužine restrikcionih fragmenata, engl. *Restriction Fragment Length Polymorphisms*

OR - odnos šansi, engl. *Odds Ratio*

CI - interval poverenja, engl. *Confidence Interval*

GMDR - generalizovana multifaktorska redukcija dimenzionalnosti

CVC - engl. *Cross Validation Consistency*

TrBA - engl. *Training Balanced Accuracy*

TeBA - engl. *Testing Balanced Accuracy*

HWE - Hardi Vajnberg ravnoteža, engl. *Hardy-Weinberg Equilibrium*

# **1. UVOD**



## 1.1. Infertilitet: definicija i epidemiologija

Uspešna reprodukcija, čiji je osnovni biološki smisao održanje vrste, uključuje ne samo fertilizaciju i dobijanje potomstva nego i preživljavanje potomstva do reproduktivnog doba kako bi se geni kontinuirano prenosili kroz generacije. Pojava steriliteta i infertiliteta se može uočiti kod mnogih životinjskih vrsta ali je teško utvrditi broj infertilnih jedinki u slobodnim populacijama, kao i uzroke koji dovode do ove pojave. Svetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization* - WHO) definiše infertilitet kao bolest reproduktivnog sistema, kod koje izostaje začeće nakon 12 meseci nezaštićenog seksualnog odnosa, ukoliko ne postoje drugi razlozi, kao što su dojenje ili postpartalna amenoreja. Smatra se da nakon jedne godine redovnog seksualnog odnosa, kod oko 85-95% parova dolazi do prirodnog začeća. Ukoliko se klinički uzrok infertiliteta ne otkrije standardnim testovima fertiliteta, kod oko 50% parova koji nisu ostvarili reproduktivni uspeh u toku prve godine, do trudnoće dolazi u drugoj godini, a kod dodatnih 12% u trećoj godini partnerstva (Gelbaya i sar., 2014). Kod žena koje su starije od 35 godina smatra se da tretman treba započeti nakon 6 meseci zbog infertiliteta povezane sa godinama (ASRM, 2015).

Danas je dijagnoza infertiliteta postavljena kod više miliona ljudi, ali je tačan broj ljudi sa ovom dijagnozom teško utvrditi zbog različitih kriterijuma koji se koriste za njenu definiciju, kao i nepotpunijim podacima o učestalosti muškog infertiliteta. Prema podacima objavljenim 2004., 2007. i 2012. godine, broj osoba sa infertilitetom varira između 48.5 i 186 miliona (Izzo i sar., 2015). Procenjuje se da je taj procenat između 8% i 12% u delu populacije koja se nalazi u dobu reproduktivne zrelosti (15-49 godina, prema WHO), sa prosečnom globalnom prevalencom od 9% (Bovin i sar., 2007). Iako u nekim regionima sveta, kao što su južna i centralna Azija, istočna i severna Afrika, kao i istočna Evropa, incidenca infertiliteta može da dostigne i 30%, Bovin i saradnici (2007) sugerišu da, uprkos dosadašnjem uverenju,

nema velike razlike u prevalenci infertiliteta između više razvijenih (6.6-26.4%) i manje razvijenih zemalja (5.0-25.7%).

Uzroci reproduktivnog neuspeha se kod dve trećine parova mogu klinički identifikovati kao zdravstveni problemi kod muškarca ili žene, na morfo-anatomskom, biohemijskom, hormonskom ili imunološkom nivou. U slučajevima kada postoje anomalije na nivou reproduktivnih organa usled kojih nije moguće da dođe do fertilizacije, kao što su ovarijalna ili testikularna disfunkcija, upotrebljava se termin sterilnost. U situacijama kada postoji smanjena mogućnost ili trenutna nesposobnost začeća i trudnoće, koja može biti i na nivou nekog drugog sistema osim reproduktivnog, upotrebljava se termin infertilitet. Kod 30% do 40% infertilnih parova poreklo infertiliteta se može identifikovati u nedostacima u reproduktivnom zdravlju žene, kod oko 40% uzrok infertiliteta se može pronaći kod muškarca, dok je kod 20% do 30% slučajeva razlog infertiliteta prisutan kod oba partnera. U određenom procentu (15-30%) ne može se utvrditi njegov uzrok ni kod muškarca ni kod žene, standardni testovi fertiliteta ne mogu dati objašnjenje za ovu pojavu, pa infertilitet ostaje klinički neobjašnjen i označava se kao idiopatski infertilitet (Gelbaya i sar., 2014; Izzo i sar., 2015).

### **1.1.1. Uzroci i podela infertiliteta**

Ne ulazeći u poreklo i uzrok infertiliteta, ovo zdravstveno stanje se može podeliti na primarni i sekundarni infertilitet. Primarni infertilitet podrazumeva da nikada nije dolazilo do začeća, dok se pod sekundarnim smatra nemogućnost ponovnog začeća nakon uspešne trudnoće, ali i nemogućnost da se trudnoća uspešno iznese do kraja, usled prekida trudnoće (spontanog ili namernog), biohemijske ili vanmaterične trudnoće (Mascarenhas i sar., 2012). Postoje mnogi biološki i etiološki faktori koji se smatraju uzročnicima infertiliteta. Neki od ekstrinzičkih faktora koji utiču na šansu prirodnog začeća su: učestalost seksualnog odnosa,

pušenje, fizička aktivnost, telesna masa kod žene, upotreba nekih lekova ili podvrgnutost određenim medicinskim intervencijama, kao i psihološki i sociološki faktor (Izzo i sar., 2015). Parovi koji imaju aktivan i redovan seksualni odnos imaju znatno veće šanse za prirodno začeće od onih koji ga nemaju. Pored toga, reproduktivni kapacitet žene u velikoj meri zavisi i od njene starosne dobi, jer se kvalitet oocita smanjuje tokom reproduktivnog života, a ovo smanjenje postaje znatno izraženije posle 35 godina života. Sa starošću žene, smanjuje se šansa za prirodno začeće, a povećava se stopa spontanih abortusa i embrionalnih hromozomskih anomalija. Jedan od značajnih faktora koji može uticati na začeće je i pušenje, koje može dovesti do smanjenja uspešnosti reprodukcije. Štetan uticaj pušenja zavisi od količine i broja godina tokom kojih žena puši, ali i izloženosti duvanskom dimu u okruženju. Nikotin i druge štetne hemikalije u cigaretama ometaju sposobnost tela da stvori estrogen, jedan od glavnih hormona koji reguliše folikulogenezu i ovulaciju. Takođe, pušenje utiče na folikule, embrionalni transfer, receptivnost endometrijuma, angiogenezu endometrijuma, ali i na miometrijum materice i protok krvi u njoj (Dechanet i sar., 2011). Pored navedenih spoljašnjih faktora, u današnje vreme i socijalni faktor znatno doprinosi obrnutoj proporcionalnosti godina i reproduktivnosti kod žene. U urbanim sredinama žene se sve više okreću obrazovanju, karijeri i efikasnim kontraceptivnim sredstvima, čime se odlaže rađanje dece.

Prema biološkim faktorima koji mogu biti uzročnici ove pojave, infertilitet se može podeliti na:

1. Infertilitet genitalnog porekla, koji, u odnosu na lokalizaciju, obuhvata vaginalni, cervikalni, uterusni, tubarni i ovarijalni infertilitet. Najčešći uzrok ženskog infertiliteta su problemi ovulacije koji se manifestuju neredovnim ili potpunim odsustvom menstrualnog ciklusa. U osnovi ovarijalne disfunkcije uglavnom se nalazi policistični ovarijalni sindrom, gojaznost,

neuhranjenost, poremećaji tiroidne žlezde i hiperprolaktinemija (Quaas i Dokras, 2008). Pored ovarijalne disfunkcije mogu se javiti i anomalije materice (5-10%) tj. promene na grliću materice, sužen ili neprohodan kanal grlića materice (nakon hroničnih upala ili operacija), kao i endometrioza koja se javlja sa učestalošću od 15%, a predstavlja pojavu ćelija endometrijuma materice van materice (na jajovodima, jajnicima, trbušnoj duplji, mokraćnoj bešici).

2. Hormonski uzrokovan infertilitet, koji nastaje kao poremećaj ili izostanak menstruacije usled disbalansa hormona. U ovu grupu uzročnika spadaju: poremećaji ovulacije, smanjenje ovarijalne rezerve, prekomerna gojaznost, prekomerna mršavost, poremećaj rada štitne žlezde, povišene vrednosti prolaktina i stres.
3. Infertilitet ekstragenitalnog porekla, koji se javlja u 2-3% slučajeva, a odnosi se na poremećaj rada drugih endokrinih žlezda (tiroidna, nadbubrežna žlezda, hipotalamus, hipofiza) usled čega može doći i do reproduktivnog neuspeha.
4. Imunski uzrokovan infertilitet, koji se javlja u oko 3-5% slučajeva, predstavlja pojavu imunizacije žene na antigene spermatozoida. U ovom slučaju dolazi do stvaranja antispermatozoidnih antitela koji sprečavaju kretanje spermatozoida prema jajnoj ćeliji.

Postavljanje dijagnoze infertiliteta obuhvata detaljna klinička ispitivanja, koja uključuju ne samo medicinske i fiziološke testove, nego i psihološko stanje i pitanja lične i porodične anamneze. Ultrasonografska dijagnostika materice i jajnika, kao i bazični hormonski testovi su prvi pregledi koji se obavljaju. Na osnovu indikacija nekada je potrebno uraditi i dodatne dijagnostičke analize. Neke od dodatnih metoda koje se koriste za uspostavljanje dijagnoze infertiliteta su i histeroskopija i laparoskopija kojom se ispituje unutrašnjost materice, tj. materična duplja i

sluzokoža, kao i postojanje septuma, polipa, mioma ili drugih abnormalnosti. Provera infertiliteta može se obaviti i metodom histerosalpinografijom koja podrazumeva kontrastno snimanje rendgenom, a daje značajnu informaciju o prohodnosti jajovoda kao vrlo važnom faktoru za uspešno začeće (Quaas i Dokras 2008; ASRM 2015). Pored medicinskog i kliničkog aspekta, infertilitet može biti uzrokovan i unutrašnjim psihološkim konfliktima kod žene, mogu se javiti frustracija, depresija, socijalno neprihvatanje i mnogi drugi problemi, što ovu pojavu čini predmetom interesovanja i različitih psihologa (Ciu L., 2010; Chachamovich i sar., 2010).

### **1.1.2. Idiopatski infertilitet i asistirana reprodukcija**

U nekim situacijama klinički, ultrazvučni ili rendgenski pregledi nisu dovoljni da se sagleda stanje unutrašnjih organa i da se dođe do odgovora na pitanje šta je uzrok reproduktivnog neuspeha, pa se uspostavlja dijagnoza idiopatskog infertiliteta. Studija Somigliana i saradnika (2016) je pokazala da postoji određeni procenat lažno pozitivnih rezultata kada je u pitanju postavljanje dijagnoze idiopatskog infertiliteta i naglašava da je važno praviti razliku između idiopatskog infertiliteta i infertiliteta uzrokovanog starosnom dobi žene. Poslednjih decenija tehnologija asistiranje reprodukcije (engl. *Assisted Reproductive Technology - ART*) dobija sve veći značaj, ali uprkos povećanju primene postupaka asistiranje reprodukcije, stopa trudnoće i uspešnih porođaja nije se značajno poboljšala proteklih godina (Ferraretti i sar., 2013; Kupka i sar., 2016). Međutim, asistirana reprodukcija se sve više koristi bez obzira na kliničke indikacije i potrebe za tim. Kod velikog broja parova sa smanjenom fertilnošću koji posećuju lekare, ne mogu se utvrditi uzroci koji redukuju fertilitet. Studija Kerstena i saradnika (2015) je pokazala da je otprilike 1/3 parova sa dijagnozom idiopatskog infertiliteta, koja je imala dobre šanse za prirodno začeće, bila podvrgnuta prevremenom tretmanu asistiranje reprodukcije. Pod ovim terminom se podrazumeva da je tretman fertilnosti

započet posle 6 meseci neuspešnog prirodnog začeća (Kersten i sar., 2015), čime se smanjuje šansa i vreme za prirodno začeće. Povećana tendencija za odlaganje reprodukcije, usled karijernih, socijalnih ili drugih razloga, stavlja lekare pod pritisak da intervenišu kada do prirodnog začeća ne dođe u kratkom vremenskom intervalu. Na osnovu individualnih karakteristika, potrebno je pažljivo odrediti period tokom kojeg se daje šansa prirodnom začeću, a takođe pored medicinskih i fizioloških karakteristika, u ovu kalkulaciju treba uključiti i uspešnost asistirane reprodukcije, troškove i rizik od komplikacija i višestrukih trudnoća. Tip infertiliteta još jedan je od faktora koji dovode do prevremene asistirane reprodukcije. Pokazano je da parovi sa primarnim infertilitetom imaju veći rizik za prevremeno podvrgavanje ART proceduri u poređenju sa parovima sa sekundarnim infertilitetom, kao i da dužina trajanja infertiliteta i godine žene predstavljaju značajan faktor koji dovodi do prevremene asistirane reprodukcije (Kersten i sar., 2015).

Ponovljeni gubici ploda i idiopatski infertilitet su vrlo heterogena stanja koja mogu biti uzrokovana ne samo genetičkim ili faktorima okruženja, nego i njihovom interakcijom. Danas se dijagnostika, u situacijama kada klinička medicina ne može da nađe odgovor za uzrok infertiliteta, sve više spušta na molekularni nivo, ispitujući promene na nivou gena koje mogu biti asocirane sa reproduktivnim neuspehom. Brzi i ekstenzivni razvoj molekularne biologije sve više ima uticaj i značaj u oblasti ginekologije i akušerstva. Poslednjih godina otkriveni su mnogi genski polimorfizmi koji mogu imati značajan efekat na komplikacije tokom trudnoće, ali i na sam reproduktivni uspeh. Takođe je sugerisano da određeni genski markeri povećavaju rizik za pojedine bolesti i neželjena stanja tokom trudnoće (Seremak-Mrozikiewicz, 2013).

## 1.2. Trombofilija

Termin trombofilija prvi put su upotreбили Jordan i Nandorff (1956) u cilju opisivanja nasledne tendencije ka trombotičkim događajima. Sam termin ne označava prisustvo bolesti, već se odnosi na stanje povećanog rizika za abnormalnu koagulaciju. Trombofilija može biti identifikovana kao stečena ili nasledna, a danas se smatra multifaktorskim stanjem koje uključuje genetičke i stečene faktore rizika za nastanak tromboze. Kod većine osoba koje imaju naslednu trombofiliju nikada ne dođe do trombotičkog događaja i zbog toga se ovo stanje i kod takvih osoba mora razmatrati u kontekstu asocijacije sa drugim faktorima rizika za pojavu tromboza, kao što su operacije, upotreba određenih lekova (oralnih kontraceptiva ili zamenske hormonske terapije), kao i neka druga stanja (imobilizacija, trudnoća ili postpartalni period) (Cohoon i Heit, 2014). Trombotički događaj podrazumeva nastajanje krvnog ugruška složenim mehanizmima hemostaze koji će biti objašnjeni u narednom poglavlju.

### 1.2.1. Hemostaza - primarna, sekundarna (koagulacija) i fibrinoliza

Hemostaza je fiziološki mehanizam koji kontroliše tečno stanje krvi i njenu neometanu cirkulaciju. Potencijalno, hemostaza ima ulogu u formiranju krvnog ugruška, kako bi se zaustavilo ili ograničilo krvarenje na mestu povrede (Segers i sar., 2007). Normalna hemostaza se održava finim balansom između prokoagulantnih i antikoagulantnih faktora. Tri zasebne faze hemostatskog procesa su: primarna hemostaza, sekundarna hemostaza (koagulacija) i fibrinoliza, a glavne komponente ovog sistema su: endotel krvnih sudova, trombociti, proteini koagulacije i fibrinolize.

1) **Primarna hemostaza** inicirana je povredom vaskularnog endotela koja dovodi do izlaganja kolagenih vlakana na koje se adheriraju trombociti. Kao rezultat ove interakcije sa kolagenom, trombociti se aktiviraju i adheriraju jedan na

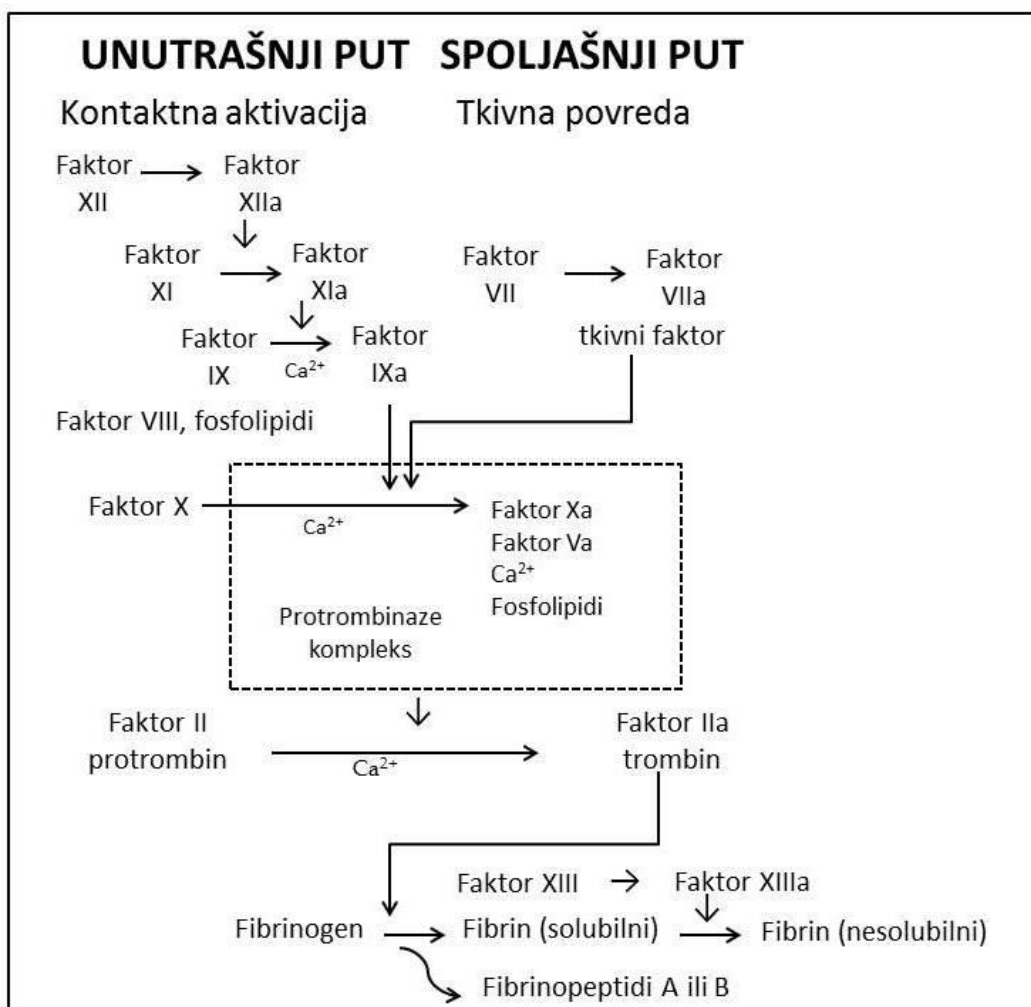
drugi preko adhezionih receptora, integrina, koji se vezuju za isti receptor na susednim trombocitima. Glavni integrin na trombocitima jeste  $\alpha_{IIb}\beta_3$  koji je neophodan za agregaciju trombocita i kao takav jedan od centralnih molekula uključenih u hemostazu. Aktivacija trombocita predstavlja specifičnu transformaciju integrina, što mu omogućava da se vezuje za fibrinogen i vWF (engl. *Von Willebrand Factor* - vWF, poznat i kao Faktor I), ligande koji spajaju trombocite, ili za druge ligande, kao što su vitronektin i fibronektin, koji modulišu agregaciju (Ma i sar., 2007). Aktivacija trombocita dalje rezultuje u aktivaciji nekoliko fosfolipidnih transporterskih proteina, koji dovode do transporta negativno naelektrisanih fosfolipida sa unutrašnje na spoljašnju stranu membrane trombocita. Ovi negativno naelektrisani fosfolipidi obezbeđuju katalitičku površinu za aktivaciju sistema koagulacije, jer se za njih vezuju neki od faktora koagulacije, kao što su faktori Va i VIIIa (Sakariassen i sar., 1979; Ma i sar., 2007).

2) **Sekundarna hemostaza**, poznata i kao koagulacija, predstavlja proces zgrušavanja krvi. Većina faktora koagulacije se sintetiše u jetri i izlučuje u cirkulaciju uglavnom u neaktivnoj formi, formi profaktora. Prilikom zgrušavanja krvi, profaktori prelaze u svoj aktivni oblik ili oblik kofaktora. Faktori koagulacije obeležavaju se rimskim brojevima, dok se njihov aktivni oblik obeležava dodavanjem malog slova „a“. U profaktore spadaju: protrombin (poznat i kao FII), prekalikrein i faktori VII, IX, X, XI i XII, dok u kofaktore spadaju: tkivni faktor (TF) i faktori V i VIII. Neki od faktora koagulacije zavisni su od vitamina K, kao što su: protrombin, protein C, protein S, faktori VII, IX i X. Ovi enzimi su strukturno dosta slični, a sintetišu se u jetri. Svi pripadaju serin proteazama, osim proteina S koji nema katalitičke domene u strukturi i predstavlja kofaktor koji pospešuje inhibitornu aktivnost aktivisanog proteina C. U jetri ovi faktori podležu posttranslacionoj modifikaciji koju katalizuje enzim  $\gamma$ -glutamil karboksilaza čija je aktivnost zavisna od vitamina K. Grupa faktora V i VIII predstavlja kofaktore



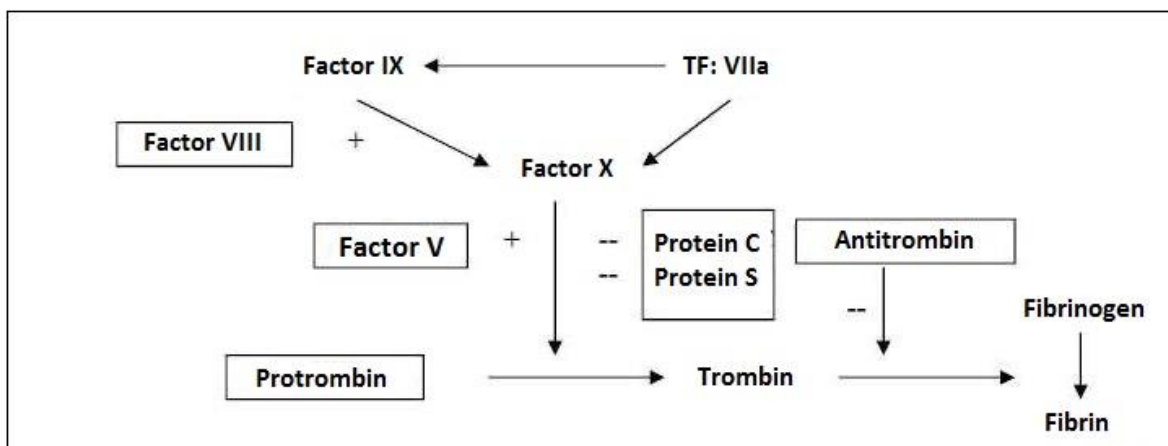
serinskim proteazama. Ova dva proteina vrlo su slična u strukturi i biohemijskim karakteristikama. Faktor VIII cirkuliše zajedno sa vWF koji, pored uloge u adheziji i agregaciji trombocita, deluje i kao stabilizator FVIII. Sam proces koagulacije može biti aktiviran ili inhibiran, u zavisnosti od potrebe organizma.

➤ **Aktivacija koagulacije:** Proces zgrušavanja krvi se tradicionalno deli na spoljašnji i unutrašnji put, koji se spajaju u zajednički put, pri čemu se u poslednjem koraku stvara trombin. Trombin dovodi do prevođenja fibrinogena u fibrin i stvaranja krvnog ugruška (Slika 1).



Slika 1. Unutrašnji i spoljašnji put koagulacije (Kohler i Grant., 2000-  
preuzeto, modifikovano).

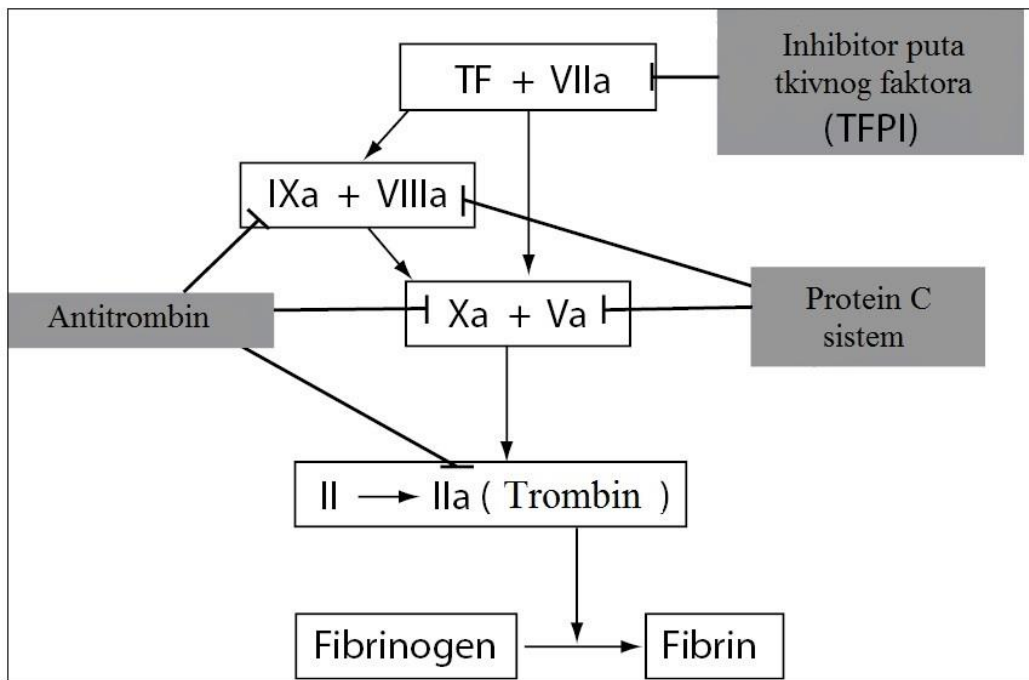
Ključna komponenta spoljašnjeg puta jeste TF (tkivni faktor) koji ima jak afinitet za FVII. U fiziološkim uslovima TF se ne nalazi u krvi, nego je deo ćelijskih membrana u tkivima. Kada dođe do povrede krvnog suda, TF dospeva u krv i u prisustvu kalcijuma stvara kompleks sa FVII koji zatim prelazi u svoj aktivirani oblik, FVIIa. Male količine ovog faktora cirkulišu i aktiviraju FXa i FIXa koji povratno olakšavaju dalju aktivaciju FVIIa vezanog za TF. Faktor XIa aktivira FXa, a FVIII je kofaktor koji maksimalnu aktivnost FXa povećava oko 200 000 puta. Aktivirani FXa je jedini enzim koji može da pretvori protrombin (FII) u trombin. Trombin je serinska proteaza koja ima mnogobrojne fiziološke funkcije. On je izrazit agonist trombocita i ima ključnu ulogu u aktivaciji i agregaciji trombocita. Direktno je uključen u stvaranje krvnog ugruška katalizirajući pretvaranje fibrinogena u fibrin, tako što ga cepa na monomerne jedinice. Monomeri fibrina se povezuju i grade fibrinsku mrežu u koju se hvataju krvne ćelije i formiraju krvni ugrušak. Trombin takođe aktivira i neke od faktora koagulacije (FV, FVIII i FXIII), a kada se veže sa trombomodulinom (glikoproteinom koji se nalazi na površini endotelnih ćelija) katalizuje i aktivaciju proteina C, koagulacijskog inhibitora FVa i FVIIIa. Trombin deluje i na endotelne ćelije i stimuliše stvaranje prostaciklina, vWF, PAI-1, PDGF (Labor i sar., 2007, Segers i sar., 2007). Uprošćen prikaz koagulacije krvi prikazan je na Slici 2.



Slika 2. Uprošćen prikaz koagulacije krvi (Varga, 2007-preuzeto, modifikovano)

➤ **Inhibicija koagulacije:** Pored aktivatora koagulacije, u održavanju hemostaze uključeni su i inhibitori koagulacije, koji specifično inhibiraju određene faktore koagulacije. Najznačajniji antikoagulansi su: antitrombin, protein C, protein S, trombomodulin, inhibitor puta tkivnog faktora (tFPI), C1 inhibitor, heparin kofaktor II i drugi (Slika 3). Aktivacija FX kompleksom FVIIa/TF je kratkog veka, zbog prisustva inhibitora puta tkivnog faktora. Ovaj faktor je serinska proteaza koja reguliše kompleks FVIIa/TF i katalitičku aktivnost FXa. U cirkulaciji je vezan za lipoproteine, a oslobađa se stvaranjem trombina. Svoju inhibitornu aktivnost ostvaruje najpre vezivanjem, a potom inhibicijom FXa i stvaranjem inhibitorne strukture tFPI/FXa/FVIIa/TF. Drugi inhibitor koagulacionog puta jeste antitrombin III, plazmatski glikoprotein koji neutralizuje trombin i faktore FIXa, FXa, FXIa i FXIIa. Stvaranje kompleksa antitrombina III i navedenih faktora je sporo bez heparina, koji se i daje kao jedna od antikoagulatnih terapija, kako bi se ubrzala inhibitorna aktivnost ovog proteina. Treći tip inhibicije procesa koagulacije jeste sistem proteina C. Protein C se aktivira nakon vezivanja trombina na trombomodulin koji se nalazi na površini endotelnih ćelija. Nastali kompleks aktivira protein C koji je sposoban da razgradi aktivirane FVIIIa i FVa i da na taj način spreči dalje stvaranje trombina. Delovanje proteina C

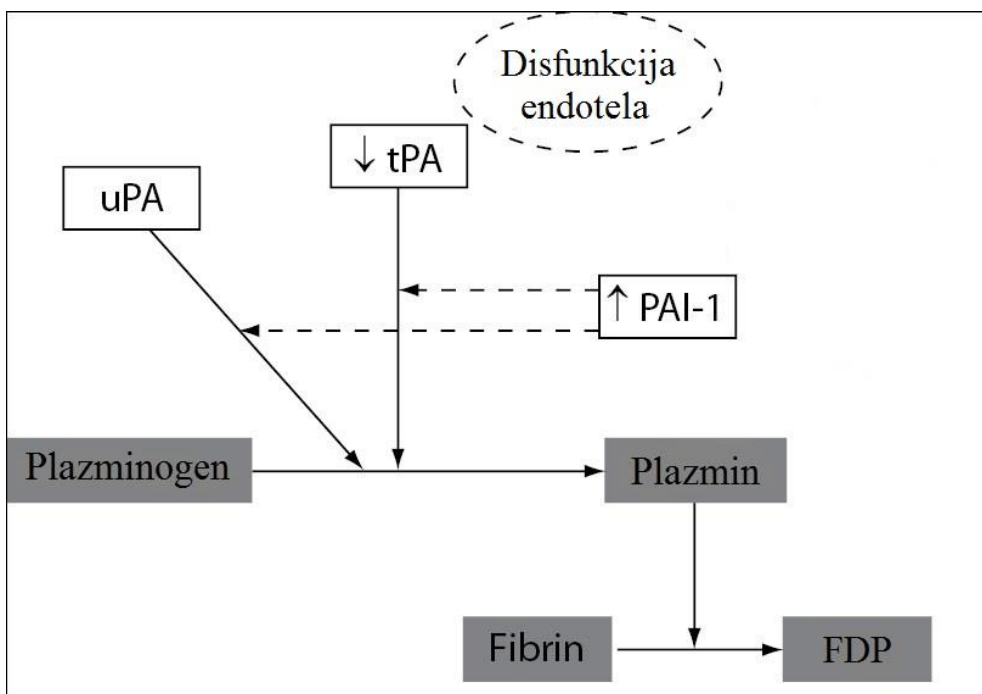
pojačava drugi, takođe vitamin K zavisni, protein S, koji vezuje protein C za površinu trombocita (Labor i sar., 2007).



Slika 3. Tri glavna antikoagulantna mehanizma: inhibitor puta tkivnog faktora, antitrombin i protein C sistem (Margetic, 2012- preuzeto, modifikovano).

3) Treća faza hemostaze uključuje **fibrinolizu**, poseban proces koji razlaže krvni ugrušak nastao u toku koagulacije. Sam proces fibrinolize može biti primarni i sekundarni. Primarna fibrinoliza je prirodni proces koji se dešava u organizmu, dok je sekundarna fibrinoliza nasilno razgrađivanje tromba pomoću lekova ili usled nekih medicinskih poremećaja. Glavni enzim fibrinolize jeste plazmin, koji nastaje aktivacijom plazminogena, neaktivnog proteina krvne plazme. U organizmu se aktivacija plazminogena ostvaruje uz pomoć tkivnog aktivatora plazminogena (tPA) i urokinaznog aktivatora plazminogena (uPA). Plazmin poseduje veliki afinitet za fibrin i nagomilava se u formiranom krvnom ugrušku koji je bogat fibrinom, a ima mogućnost da proteolitički degraduje fibrin, pri čemu nastaju produkti degradacije fibrina (engl. *Fibrinogen Degradation Products* - FDP)

(Segers i sar., 2007). U krvnoj plazmi se takođe nalaze i faktori koji sprečavaju dejstvo aktivatora plazmina nazvani inhibitori aktivatora plazmina. Plazminogen aktivator inhibitor tip 1 (SERPINE 1, takođe poznat i kao PAI-1) jeste serin proteazni inhibitor koji funkcioniše kao primarni inhibitor endogene fibrinolitičke aktivnosti, tako što inhibira tPA i uPA, glavne aktivatore plazminogena i same fibrinolize. Vezujući se za tkivni plazminogen aktivator on inhibira konverziju plazminogena do plazmina, dovodeći do opadanja fibrinolize (Slika 4). Poremećen balans između plazminogen aktivatora i PAI-1 inhibitora može imati kliničke posledice. Višak plazminogen aktivatora i deficijencija PAI-1 može dovesti do hemoragije, dok se obrnuta situacija, deficijencija plazminogen aktivatora i višak PAI-1 inhibitora, manifestuje kao povećan rizik za trombozu (Vaughan i sar., 1997).



**Slika 4. Prikaz fibrinolize** (Margetic, 2012-preuzeto, modifikovano).

Pored inhibitora aktivatora plazminogena tip 1, angiotenzin konvertujući enzim (engl. *Angiotensine converting enzyme* - ACE) takođe je uključen u fibrinolitički proces. Angiotenzin konvertujući enzim predstavlja jednu od najznačajnijih

karboksipeptidaza uključenih u regulaciju krvnog pritiska. Ovaj enzim zavisian je od hlorida i cinka, a prisutan je na površini epitelnih i endotelih ćelija. Njegova glavna ulogu je da konvertuje dekaeptid angiotenzin I (neaktivna komponenta) u oktapeptid angiotenzin II (aktivna komponenta). Cirkulišući angiotenzin II jedan je od glavnih efektor renin-angiotenzin sistema (RAS) i uključen je u globalnu regulaciju krvnog pritiska, kao i balansa elektrolita i zapremine telesnih tečnosti. Angiotenzin II deluje na sužavanje krvnih sudova (vazokonstrikciju), otpuštanje aldosterona, a posreduje i u ćelijskom rastu i proliferaciji, tako da može uzrokovati i disfunkciju endotela (Fleming, 2006; Sayed-Tabatabaei i sar., 2006). Pored toga, ACE enzim se vezuje za endotelne ćelije i stimuliše produkciju PAI-1 inhibitora, a uključen je i u razgradnju bradikinina koji stimulišu produkciju tPA, i na taj način doprinosi smanjivanju fibrinolize i povećavanju rizika za trombozu (Vaughan i sar., 1997). Bradikinin je peptid koji uzrokuje proširenje krvnih sudova čime se snižava krvni pritisak, a njegova razgradnja može dovesti do vazokonstrikcije (Jaspard i sar., 1993). Pored osnovnih uloga u stvaranju Angiotenzina II i razgradnji bradikinina, različita istraživanja pokazala su da ACE može imati ulogu i u putu signalne transdukcije (Fleming, 2006), *in vitro* razgradnji amiloid-beta-peptida (Hu i sar., 2001), kao i uticaj na aktivnost glikozilfosfatidilinozitolaze čime se omogućava otpuštanje glikozilfosfatidilinozitola (GPI) vezanog za membranu (Kondoh i sar., 2005). Angiotenzin II takođe pozitivno reguliše ekspresiju PAI-1 gena preko receptora za angiotenzin tip 1 (AT1 receptor) (Nakamura i sar., 2000). Lekovi koji se daju za hipertenziju, a imaju ulogu da inhibiraju ACE enzim (takozvani ACE inhibitori), takođe mogu da redukuju i nivo PAI-1 i na taj način da smanje incidencu kardiovaskularnih komplikacija (Brown i sar., 2002).

### 1.2.2. Stečena i nasledna trombofilija

Trombofilija, kao stanje povećanog rizika za tromboze, uglavnom nastaje kao kombinacija naslednih i stečenih faktora. Od stečenih stanja asociranih sa trombofilijom najznačajnije mesto zauzima antifosfolipidni sindrom (APS), koji uključuje antifosfolipidna antitela (lupus antikoagulans i antikardiolipinska antitela) (De Santis i sar., 2006). APS je veoma kompleksan sindrom koji deluje na nekoliko glavnih komponenti koje regulišu hemostazu. Antifosfolipidna antitela inhibiraju protein C aktivaciju i formiranje aktivisanog proteina C koji sprečava aktivaciju FV i FVIII. Ova inhibicija dešava se usled prisustva beta-2-glikoproteina koji je preduslov za vezivanje antifosfolipidnih antitela za protein C. Takođe, antifosfolipidna antitela mogu vršiti regulaciju adhezionih molekula (kao što su: E-selektin, intracelularni adhezioni molekul, itd.) i povećavati sekreciju proinflamatornih citokina (interleukin beta i interleukin-6), čineći inflamaciju jednom od značajnih posledica APS-a (Check, 2012). Neki podaci sugerišu da ovaj sindrom može biti uzročnik gubitaka ploda i komplikacija tokom trudnoće putem stanja povećane koagulacije i pojave tromboza, što posledično može dovesti do infarkcija placente, ali i putem aktiviranja inflamatornog odgovora. Kod trudnica sa APS sindromom pokazana je povećana nekroza i akutna inflamacija u poređenju sa ženama koje su imale normalnu trudnoću (Van Horn i sar., 2004). Pored toga, sugerisano je da APS može da uzrokuje gubitak ploda vezivanjem za fosfolipide koji su eksprimirani na trofoblastima čime se inhibira razvoj placente, a može delovati i na embrionalnu implantaciju u toku rane trudnoće (Di Simone i sar., 1999), što ga čini i potencijalnim uzročnikom neuspešnih IVF (engl. *In vitro fertilization* - IVF) procedura (Coulam i sar., 1997).

U stečene trombofilije spadaju i trombotička stanja uzrokovana spoljašnjim faktorima kao što su: imobilizacija, operacije, maligne bolesti, primena hormonske terapije, trudnoća, a jedan od faktora koji ima najizraženiji uticaj jeste i starosna

dob. Incidenca venskih tromboza je veoma mala u mlađoj populaciji (<1:10 000 godišnje) dok se sa starošću povećava za oko 1% svake godine. Jedno od objašnjenja povećavanja incidence trombotičkih događaja u starijoj populaciji (osobe preko 60 godina) jeste postojanje specifičnih faktora asociranih sa godinama starosti, kao što su: smanjenje snage mišića, endotelna disfunkcija i venska insuficijencija (Engbers i sar., 2010).

Nasledna trombofilija se može javiti usled kongenitalne deficijencije ili abnormalnosti antitrombina (ATIII), proteina C (PC), proteina S (PS), ili usled prisustva mutacija koje povećavaju rizik za nastanak tromboza. Prvi slučaj nasledne trombofilije opisao je Oleg Egeberg (1965) u jednoj skandinavskoj porodici, u kojoj je pokazano da nasledna deficijencija antitrombina III dovodi do venske trombozne embolije. Egeberg je ovu deficijenciju opisao kao autozomalno-dominantni poremećaj. Heterozigotna deficijencija ovog proteina rezultuje u smanjenju količine ili aktivnosti antitrombina, što dovodi do povećanog koagulacionog stanja u krvi i posledično do formiranja ugruška. Deficijencija usled heterozigotnog oblika nije toliko učestala, incidenca javljanja se kreće od 1:500 do 1:5 000 individua, dok se homozigotno stanje smatra nekompatibilnim sa životom (Varga, 2007). Opisane mutacije koje mogu da dovedu do hiperkoagulacije podeljene su u 3 grupe:

- mutacije u genima koji kodiraju za inhibitore koagulacije (što dovodi do smanjene inhibicije koagulacije),
- mutacije u genima koji kodiraju za prokoagulantne faktore (što dovodi do povećane sinteze ovih faktora ili smanjenja mogućnosti njihove inhibicije) i
- mutacije u genima koji kodiraju za faktore fibrinolitičkog sistema (usled čega dolazi do poremećaja u procesu fibrinolize) (Đorđević i sar., 2014).



Deficijencija ATIII, PC i PS se javljaju sa mnogo manjom učestalošću od SNP polimorfizmima (jednonukleotidni polimorfizam, engl. *Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) u određenim genima, kao što su Faktor V Leiden (*FVL*) i Faktor II protrombin mutacije (*FII 20210 G>A*). Populacione studije pokazale su da postoji razlika u prevalenci ovih naslednih faktora rizika za trombofiliju u opštoj populaciji, kod pacijenata sa dubokim venskim trombozama (DVT) i u porodičnim studijama u kojima je prisutna nasledna trombofilija, prikazano u Tabeli 1 (Koenderman i Reitsma, 2011). U Azijskim populacijama učestalost ove deficijencije ATIII, PC i PS je veća nego u Evropskim tako da se, za razliku od SNP polimorfizama, deficijencije ovih proteina smatraju najznačajnijim uzročnikom nasledne trombofilije u Azijskim populacijama (Roberts i sar., 2009).

**Tabela 1. Prevalenca glavnih naslednjih faktora rizika za trombofiliju.**

(Koenderman i Reitsma, 2011-preuzeto, modifikovano)

Nasledni faktor rizika	Prevalenca		
	Opšta populacija	VTE pacijenti	Porodična trombofilija
AT deficijencija	0.0002-0.002%	1%	4%
PC deficijencija	0.2-0.4%	3-5%	6%
PS deficijencija	0.03-0.13%	1-5%	6%
<i>FV</i> 1691 G>A	1-15%	10-50%	45%
<i>FII</i> 20210 G>A	1-3%	6%	10%
Ne-O krvna grupa	57%	73%	/

U nasledne trombofilije spadaju i indirektni aktivatori procesa koagulacije kao što je hiperhomocisteinemija. Homocistein je neproteinska aminokiselina koja nastaje u višestepenom procesu metabolizma esencijalne amino kiseline metionina. Homologa je amino-kiselini cisteinu od koje se razlikuje po dodatnoj metil (-CH<sub>2</sub>-) grupi. Glavni enzim koji učestvuje u prevođenju homocisteina u metionin jeste metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR). Usled smanjene aktivnosti ovog enzima može doći do pojave hiperhomocisteinemije, koja posledično može prekomerno da aktivira proces koagulacije. Ova aktivacija, posredovana homocisteinom, odvija se kroz nekoliko mehanizama, kao što su: povećavanje ekspresije tkivnog faktora, slabljenje procesa antikoagulacije, povećanje reaktivacije trombocita i proizvodnje trombina, povećavanje aktivnosti faktora V, oštećenje fibrinolitičkog potencijala i vaskularne povrede, uključujući endotelnu disfunkciju. Molekularni mehanizmi koji leže u osnovi protrombotičke aktivnosti homocisteina nisu do kraja poznati, ali uključuju oksidativni stres, DNK hipometilaciju i proinflamatorne efekte (Undas i sar., 2005).

Potencijalni kandidati za skrining za prisustvo nasledne trombofilije su svi pacijenti sa venskim tromboembolizmom, nezavisno od starosne dobi kada se trombotički događaj desio (pre ili posle 45te godine), pacijenti sa hematološkim

bolestima, sve trudnice sa komplikacijama tokom trudnoće, asimptomatske osobe koje su u prvom stepenu srodstva sa pacijentima koji imaju kliničku dijagnozu trombofilije ili asimptomatske žene sa pozitivnom porodičnom anamnezom na trombotičke događaje, u toku trudnoće ili pre korišćenja oralnih kontraceptiva ili supstitucione hormonske terapije (De Stefano i sar., 2002).

Do sada su opisani brojni polimorfizmi u genima koji kodiraju za proteine uključene, direktno ili indirektno, u neki od procesa hemostaze (*FV 1691 G>A*, *FII 20210 G>A*, *PAI-1 -675 4G/5G*, *MTHFR 677 C>T*, *MTHFR 1298 A>C*, *ATIII 786 G>A*, *ACE I/D*, *GPIIIa L33P*, *VEGF-A*), a neki od njih, koji su analizirani eksperimentalno u ovom radu, biće razmatrani posebno u narednom poglavlju.

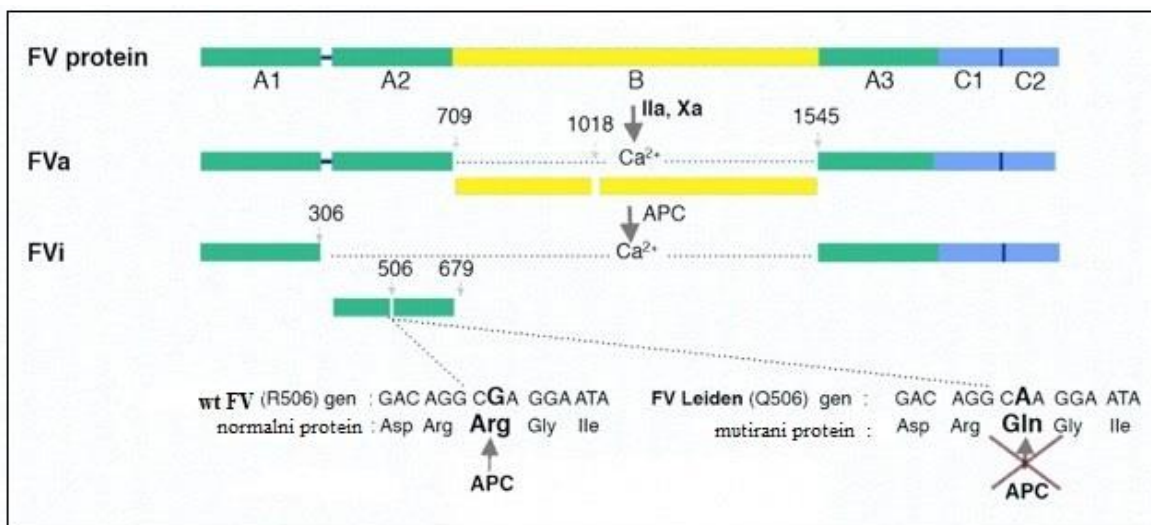
### **1.2.3. Polimorfizmi asocirani sa trombofilijom**

Česte razlike u sekvenci DNK koje postoje između individua jedne vrste u populaciji označene su kao polimorfizmi sekvence DNK, dok su različite varijante DNK sekvence nekog gena označene kao aleli. Postoji više tipova polimorfizama sekvenci DNK, kao što su: polimorfizmi nukleotidne sekvence (koji obuhvataju tačkaste i inserciono-delecione polimorfizme), polimorfizmi dužine sekvenci i polimorfizmi broja kopija. Tačkasti polimorfizmi ili jednonukleotidni polimorfizmi (SNP) vezani su za varijabilnost tipa baze, dok su inserciono-delecioni polimorfizmi vezani za inserciju ili deleciju određenog niza nukleotida (Savić-Pavićević i Matić, 2011). Za neke od polimorfizama asociranih sa trombofilijom (*FV 1691 G>A*, *FII 20210 G>A*, *MTHFR 677 C>T*) pokazana je jasna asocijacija sa komplikacijama tokom trudnoće, venskim trombozama, ponovljenim gubicima ploda, intrauterinom restrikcijom rasta i infertilitetom (La Farina i sar., 2016; Fatini i sar., 2000; 2012; Kovač i sar., 2010; Liatsikos i sar., 2016; Mitić i sar., 2010; Torabi i sar., 2012; Yenicesu i sar., 2010). U mnogim slučajevima intrauterine smrti ploda pokazane su promene na placenti povezane sa hiperkoagulacijom, koje uključuju

infarkciju placente, mikrovaskularne tromboze i obliteraciju krvnih sudova placente. Polimorfizmi asocirani sa naslednom trombofilijom: *FV* 1691 G>A, *FII* 20210 G>A, *MTHFR* 677 C>T i 1298 A>C, *PAI-1* -675 4G/5G, *ATIII* 786 G>A, *ACE* I/D, *ITGB3* 1565 T>C koji su ispitivani u ovom radu, biće opisani svaki ponaosob u narednim poglavljima.

### 1.2.3.1. Faktor V 1691 G>A

Prekretnica u istraživanju nasledne trombofilije bila je otkriće rezistencije na aktivirani protein C (engl. *Activated Protein C Resistance* - APCR) od strane Dahlback i saradnika (1993), a vrlo brzo i otkriće mutacije u genu za *FV* koja je odgovorna za ovu rezistenciju. Ustanovljeno je da se ova izmena javlja na poziciji 1691 *FV* gena, a nazvana je *FV* Lajden po gradu u kome je otkrivena (engl. *Factor V Leiden* - *FVL*) (Bertina i sar., 1994). Zamena guaninskog nukleotida adeninskim na ovoj poziciji dovodi do supstitucije arginina glutamatom na poziciji 506 u proteinskom lancu, usled čega faktor V postaje rezistentan na aktivirani protein C (Kujovich, 2011). APC (aktivirani protein C) je prirodni antikoagulantni protein koji inaktivira faktore Va i VIIIa. Usled izmene ovog jednog nukleotida, *FV* je oko 10 puta sporije inaktivisan nego u neizmenjenom obliku, što povećava šansu za prekomernu koagulaciju. Inaktivacija *FV* proteina dešava se od strane APC isecanjem na 3 mesta: Arg306, Arg506 i Arg679, što dovodi do inhibiranja njegove aktivacije. Mutacija *FVL* dovodi do eliminacije jednog APC mesta isecanja što dovodi do smanjene degradacije aktiviranog proteina *FVa* i povećanog rizika za trombotička stanja, što je šematski prikazano na Slici 5 (Dahlback i sar., 2008).



Slika 5. Šematski prikaz FV gena i proteina, u wt i mutiranom obliku, sa APC mestima (Dahlback i sar., 2008-preuzeto, modifikovano).

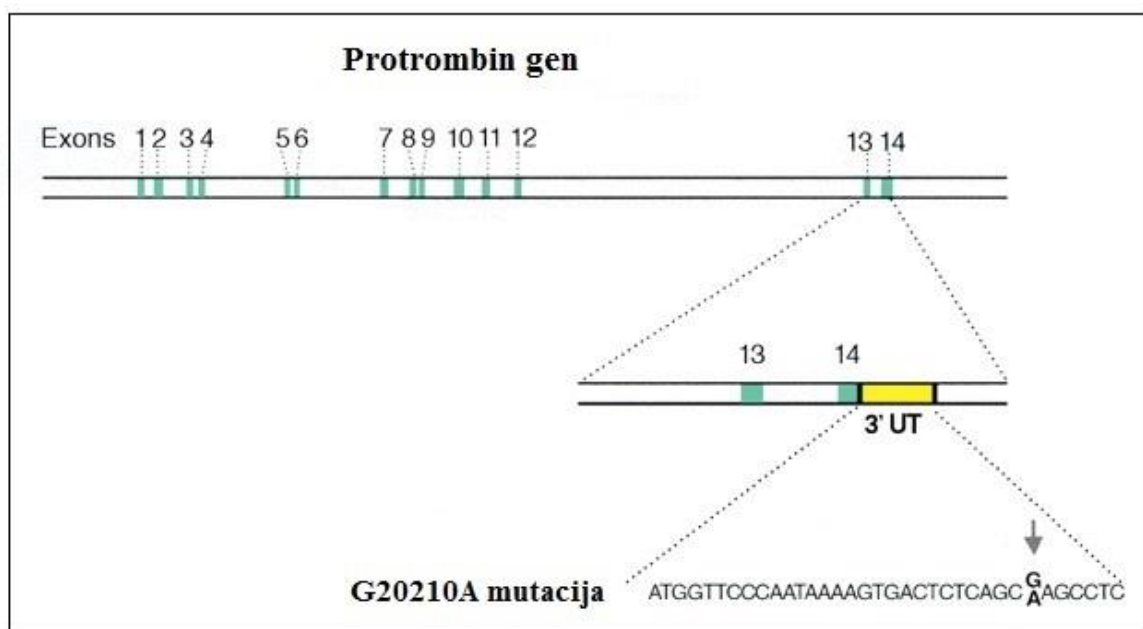
Između 3% i 8% ljudi evropskog porekla nose jedan mutirani alel, a otprilike jedna osoba na 5 000 ima homozigotnu izmenu za mutirani alel (Kujovich, 2011). To je jedan od najčešćih uzročnika nasledne trombofilije, sa prevalencom od oko 5.27% u populaciji Amerikanaca kavkazoidnog porekla (Ridker i sar., 1997a), mada je njena geografska i etnička distribucija vrlo heterogena (Adler i sar., 2012; Bozikova i sar., 2012). Za razliku od evropskih populacija, ova mutacija je vrlo retka u Aziji (Rees i sar., 1995; Pepe i sar., 1997). Haplotipska analiza FV gena ukazuje da je mutacija postala zastupljenija usled efekta osnivača (engl. *Founder effect*) koji se desio pre oko 20 000-30 000 godina, kada je došlo do razdvajanja bele populacije od Azijata i Afrikanaca (Zivelin i sar., 1997). Visoka prevalenca ove mutacije među belcima sugeriše da se radi o balansnom polimorfizmu koji donosi i određeni stepen prednosti preživljavanja osobama koje su heterozigotni nosioci ove izmene (Zivelin i sar., 1997). Tako na primer neki autori spekuliraju da ovakav genotip, koji posledično može dovesti do izraženijeg protrombinskog stanja, donosi i redukciju mortaliteta uzrokovanu krvarenjima, ali i manji gubitak krvi tokom menstrualnog ciklusa, porođaja i operacije srca (Lindqvist i sar., 2001; Donahue i sar., 2003).

Druge studije sugerisale su da, kod teških slučajeva hemofilije, osobe koje su heterozigotni nosioci *FVL* mutacije imaju manje ozbiljna krvarenja (Lee i sar., 2000a). Dodatni faktori, kao što su krvna grupa koja nije nulta (ne-O krvna grupa), mogu značajno da utiču na već postojeću rezistenciju na aktivirani protein C i još više povećaju rizik za tromboze. Ove krvne grupe, naime, pokazuju asocijaciju sa povećanim nivoom FVIII i vWF i na taj način povećavaju rizik za trombotički događaj (Morelli i sar., 2005). Na sličan način, dodatni efekat oralnih kontraceptiva na APC senzitivnost, kod nosilaca *FVL* mutacije, dovodi do povećanog rizika za tromboze. Ovaj rizik značajno je veći nego prosti zbir rizika koji nosi svaki od ovih faktora posebno. Rizik za tromboze kod osoba koje koriste oralne kontraceptive je 4 puta povećan u odnosu na one koje ne koriste ovu vrstu kontracepcije. Sa druge strane, rizik za tromboze kod nosilaca *FVL* je 8 puta veći nego kod nosilaca alela divljeg tipa, dok je u poređenju sa ženama koje nisu nosioci *FVL* i ne koriste oralne kontraceptive, rizik 30 puta veći kada su u isto vreme i nosioci *FVL* i koriste oralne kontraceptive (Vanderbroucke i sar., 1994). Ovaj polimorfizam je do sada ispitivan u cilju asocijacije sa različitim patologijama, kao što su venske tromboze (Rosendaal i sar., 1995; Margaglione i sar., 2001), abdominalne tromboze (D' Amico i sar., 2013), ponovljeni VTE događaji kod dece i omladine (Young i sar., 2009; Mansilha i sar., 2005) i različiti kanceri (Abramson i sar., 2006). Ipak, najviše je ispitivan i asociiran sa različitim patologijama tokom trudnoće. Pokazano je da postoji značajna asocijacija ove mutacije sa ponovljenim gubicima ploda (Finan i sar., 2002; Yenicesu i sar., 2010; Biron-Andreani i sar., 2009) i prevremenog rođenja deteta (Hiltunen i sar., 2011).

### 1.2.3.2. Faktor II 20210 G>A

Nekoliko godina nakon otkrića APC rezistencije i *FVL* mutacije, otkriven je polimorfizam u genu za protrombin, koji predstavlja značajan faktor rizika za venske tromboze. Protrombin je prekursor trombina, ključnog regulatora procesa hemostaze. Sintetiše se predominantno u jetri i izlučuje u krvotok, gde ostaje da cirkuliše u formi zimogena do trenutka aktivacije. Pripada vitamin K zavisnim proteinima, isto kao i faktori VII, IX i X, protein C i protein S. Gen za ovaj protein sekvenciran je 1987. godine (Degen i sar., 1987), dugačak je oko 21kb, sa 14 egzona i 13 introna. Nalazi se na hromozomu 11 (p11-q12), u blizini centromere (Royle i sar., 1987). Gen za protrombin je predominantno eksprimiran u jetri, mada je pokazano da se u manjoj meri eksprimira i u mozgu, dijafragmi, bubrezima, placentalnom i adrenalnom tkivu. Mutacije u genu za protrombin najviše su povezane sa poremećajima hemostatske ravnoteže u smeru hiperkoagulacije. Protrombinski gen ima specifičnu, nekanonsku organizaciju 3' kraja u kome postoje regioni manje efikasni u iskrajanju iRNK, usled čega ovaj region predstavlja potencijalno mesto za pronalaženje funkcionalnih genskih varijanti koje mogu da dovedu do povećane ekspresije gena (Danckwardt i sar., 2004). Među do sada opisanim genskim varijantama na 3' kraju ovog gena, najznačajnija je izmena *FII* 20210 G>A koja je otkrivena 1996 godine (Poort i sar., 1996). Mesto ove mutacije u protrombin genu šematski je prikazana na Slici 6. Kao i za *FVL*, utvrđeno je da se ova izmena fiksirala efektom osnivača pre oko 24 000 godina (Zivelin i sar., 2006). Ova izmena nalazi se u 3'UTR regionu na poziciji 20210 koje predstavlja mesto iskrajanja iRNK (Poort i sar., 1996). Za razliku od većine eukariotskih iRNK kod kojih je dinukleotid CA karakterističan za mesto isecanja, nemutirana sekvenca protrombina na ovom mestu poseduje CG dinukleotid. *In vitro* studija (Danckwardt i sar., 2004) je pokazala da je isecanje iza CG dinukleotida najmanje efikasno od svih mogućih kombinacija. Zamena G

nukleotida bilo kojim drugim na ovoj poziciji u protrombinskom genu dovodi do povećane efikasnosti isecanja i povećane ekspresije ovog gena. U poređenju sa 20210G nukleotidom, 20210C i 20210T doveli su do povećanja nivoa iRNK za 1.4 i 1.5 puta, dok je izmena 20210A dovela do povećanja nivoa iRNK za 2.15 puta u odnosu na wt alel na ovoj poziciji. Ovo povećanje količine iRNK bilo je u korelaciji sa proteinskom sintezom (Danckwardt i sar., 2004).



**Slika 6. Pozicija 20210 G>A mutacije u *FII* genu (Dahlback i sar., 2008-preuzeto, modifikovano).**

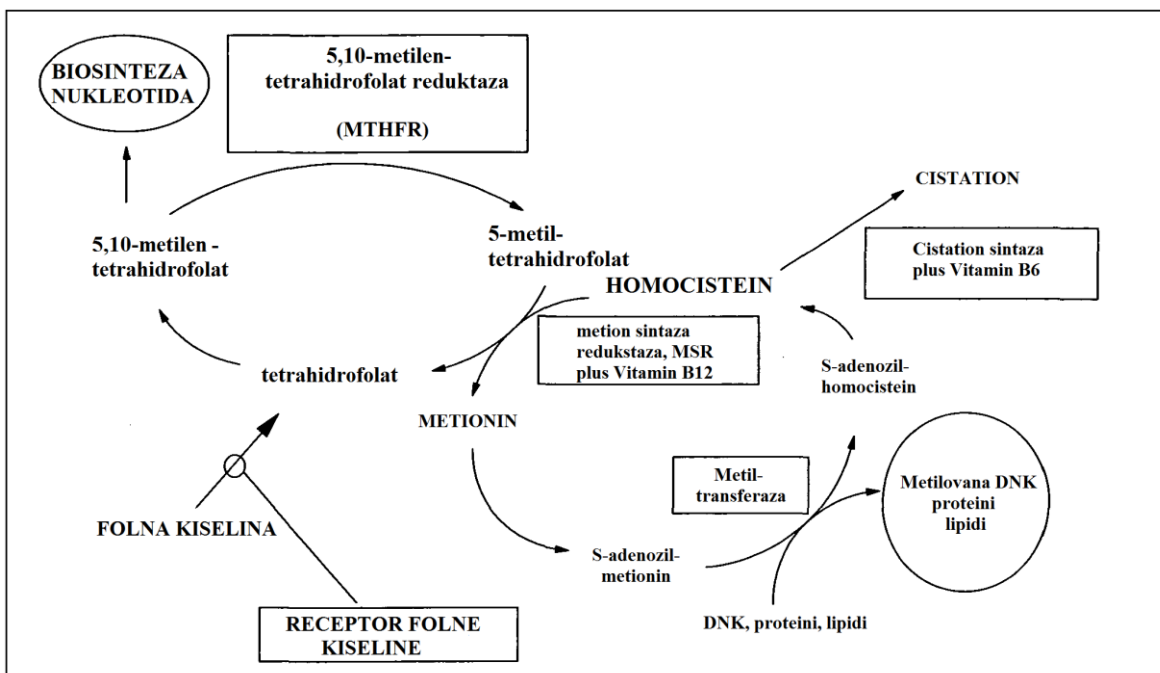
Mutacija *FII* 20210 G>A se javlja sa nešto većom učestalošću u populacijama Evrope i Amerike (1.2% do 4.6%), dok se veoma retko javlja u Afričkim i Azijskim populacijama (Bosler i sar., 2006), što govori u prilog hipotezi o relativno recentnom nastanku ove mutacije. U populaciji pacijenata sa dubokim venskim trombozama učestalost se povećava na 6.2%, dok se kod pacijenata sa pozitivnom porodičnom anamnezom taj procenat penje na 18% (Poort i sar., 1996). Dosadašnje studije su *FII* 20210 G>A izmenu asocirale sa različitim patološkim stanjima, mada rezultati nisu konzistentni. Iako je većina studija uočila postojanje asocijacije sa



trombotičkim stanjima (Đorđević i sar., 2011, Margaglione i sar., 2001; Liatsikos i sar., 2016), studija D' Amico i saradnika (2013) nije pokazala da postoji ova asocijacija sa abdominalnim trombozama. Studija Ridkera i saradnika (1999) je takođe pokazala da nema asocijacije *FII* mutacije sa infarktom miokarda, šlogom i venskim trombozama, kao ni sa povećanim rizikom za trombotički događaj kod pacijentkinja sa kancerom dojke koje su na tamoksifenskoj terapiji (Abramson i sar., 2006). Iako je dosta ispitivan kod odraslih osoba, ovaj polimorfizam se nalazi sa značajno većom učestalošću i kod dece koja su imala ponovljene trombotičke događaje (Young i sar., 2009). Pored navedenog, intenzivno je studiran i asociiran sa trudnoćom i različitim komplikacijama tokom trudnoće, gde je uočena jasna veza sa venskim trombozama i gubicima ploda, dok je asocijacija polimorfizma 20210 G>A sa preeklampsijom, intrauterinom restrikcijom rasta i abrupcijom placente bila kontroverzna u dosadašnjoj literaturi (Liatsikos i sar., 2016). Prethodne studije u Srbiji pokazale su da žene koje su nosioci ove izmene imaju povećan rizik za venske tromboze u toku trudnoće (Đorđević i sar., 2005), gubitak ploda (Mitić i sar., 2010) i intrauterinu smrt ploda (Kovač i sar., 2010). Studija Pileri i saradnici (2010) pokazala je da i fetalni genotip sa *FII* mutacijom može biti faktor rizika za intrauterinu restrikciju rasta ploda, ukazujući na moguću ulogu fetalnog genotipa u objašnjenju nekonzistentnosti rezultata u dosadašnjoj literaturi.

### 1.2.3.3. *MTHFR*: 677 C>T i 1298 A>C

Metilentetrahidrofolat reduktaza (*MTHFR*) je enzim koji ima vrlo značajnu ulogu u folat-zavisnoj remetilaciji homocisteina, koja se dešava u procesu metaboličkog puta folata (Slika 7).



Slika 7. Uprošćen metabolički put folata koji uključuje MTHFR (5,10-metilentetrahydrofolat reduktazu) i MSR enzim (reduktazu metionin sintaze) (Botto i Yang, 2000-preuzeto, modifikovano).

Folna kiselina i MTHFR enzim uključeni su u kompleksni metabolički put. MTHFR enzim katalizuje redukciju 5,10-metilen tetrahydrofolata do 5-metil tetrahydrofolata, koji konvertuje amino kiselinu homocistein do metionina. Metionin se dalje konvertuje i važan je u mnogim biološkim reakcijama, kao što je metilacija DNK. Glavni kofaktori ovog puta su vitamini B6 i B12 (Slika 7). Normalna MTHFR aktivnost može da pomogne u održavanju puta folne kiseline i metionina i potencijalno da spreči nagomilavanje homocisteina (Botto i Yang, 2000).

Kang i saradnici su 1988. godine opisali termolabilnu varijantu ovog enzima, za koju su pokazali da je asocirana sa smanjenjem enzimske funkcije, usled čega može doći do povećanja nivoa homocisteina u plazmi. Odgovor na pitanje šta dovodi do ove termolabilnosti MTHFR enzima dali su Frosst i saradnici 1995. godine kada su identifikovali polimorfizam na poziciji 677 u genu za MTHFR, koji dovodi do

zamene citozina timinom. Ova nukleotidna izmena dešava se u egzonu 4, a dovodi do supstitucije amino kiseline alanin sa amino kiselinom valin u proteinskom lancu na poziciji 222. Kao i za prethodno navedene polimorfizme asocirane sa trombofilijom, učestalost *MTHFR* 677 C>T izmene je u populaciji belih ljudi veća u odnosu na Afričku populaciju (Rosenberg i sar., 2002). Takođe je primećeno povećanje prevalence ove izmene idući od severa ka jugu (Botto i Yang, 2000; Pepe i sar., 1998). Ovakva distribucija može se objasniti uticajem veće količine folata u ishrani mediteranskih populacija u poređenju sa severno-evropskim populacijama. Polimorfizam 677 C>T je veoma čest u određenim etničkim grupama. U Evropi se učestalost homozigotne mutacije kreće od 8 do 18%, dok se među belcima koji žive van Evrope (Kanada, Amerika, Brazil, Australija) ta učestalost kreće od 10 do 14% (Botto i Yang, 2000). U Azijskim populacijama učestalost ove izmene je nešto manja, sa oko 11% se javlja kod Japanaca, dok se u afričkim populacijama javlja sa učestalošću od 1-2% (Botto i Yang, 2000).

Druga česta mutacija u ovom genu jeste *MTHFR* 1298 A>C u egzonu 7, koja rezultuje zamenom glutamata alaninom na poziciji 429 u aminokiselinskom nizu. Studija *in vitro* (Weisberg i sar., 2001) je pokazala da ovaj polimorfizam dovodi do sinteze enzima kome je smanjena aktivnost, ali za razliku od 677 polimorfizma, enzim nije termolabilan. Varijantni enzimi, koji se eksprimiraju kod bakterija sa konstruktima napravljenim od cDNA sa 677T odnosno sa 1298C mutacijom, zadržavaju samo 45% (677T) i 68% (1298C) normalne enzimске aktivnosti. Pored toga, ova studija je pokazala da ukoliko enzim sadrži obe mutacije (677T i 1298C), on ispoljava još nižu aktivnost, oko 41% normalne aktivnosti enzima. Ovakvi *in vitro* rezultati bili su u korelaciji sa prethodno objavljenim rezultatima merjenja aktivnosti enzima iz limfocita (Weisberg i sar., 1998). Međutim, *in vitro* studije ne mogu u potpunosti da imitiraju *in vivo* stanja. U svojoj funkcionalnoj formi, ovaj enzim je homodimer. Različite kombinacije peptida sa izmenom jedne amino

kiseline, mogu da formiraju različite oblike enzima sa različitom aktivnošću. Teorijski, ovaj enzim, kao dimer, može da se nađe u 6 različitih konfiguracija u odnosu na polimorfizme 677C>T/1298A>C: CC/AA, CC/AC, CC/CC, CT/AA, CT/AC i TT/AA. Uočene su male razlike u kinetičkim parametrima između wt i varijantnog homodimera ali je pokazano da je potrebna veća količina folata da stabilizuje homodimer 222Val/222Val (genotip TT/AA) nego homodimere 222Ala/222Ala (genotip CC/AA) i 222Ala-429Ala/222Ala-429Ala (genotip CC/CC). Detaljna ispitivanja i merenja metaboličkih koncentracija našla su značajnu razliku u količini folata i tHcy između različitih genotipova. Prema serumskom nivou folata genotipovi se mogu rangirati kao CC/AA>CC/AC>CC/CC≈CT/AA>CT/AC>TT/AA. Zbog toga je pretpostavljeno da povećana senzitivnost na folatnu redukciju homocisteina kod osoba koje su homozigotni nosioci TT alela na 677 lokusu može biti objašnjena folatnom stabilizacijom ovakvog homodimera MTHFR enzima (Ogino i Wilson., 2003; Ulvik i sar., 2007).

Od 1995. godine, polimorfizmi u *MTHFR* genu bili su u fokusu ispitivanja i asociranja sa različitom koncentracijom homocisteina u plazmi, sa jedne strane, ali i, sa druge strane, sa različitim kliničkim stanjima, kao što su: kardiovaskularne bolesti (engl. *Cardio Vascular Diseases* - CVD) (Frosst i sar., 1995; Christensen i sar., 1997; Saffari i sar., 2013; Hanson i sar., 2001; Morita i sar., 1997), VT (venske tromboze) (Đorđević i sar., 2011) i defekti zatvaranja nervne cevi (engl. *Neural Tube Defect* - NTD) (van der Put i sar., 1998; Beaudin i sar., 2009). Međutim, detaljno razumevanje biohemijske prirode veze između nivoa homocisteina i određenih kliničkih stanja je za sada izostalo. Pokazano je da varijante u *MTHFR* genu i folatnom statusu mogu uticati na DNK metilaciju i gensku regulaciju (Friso i sar., 2002). U skorije vreme, otkrića da osobe sa homozigotnom izmenom 677TT ispoljavaju niži nivo DNK metilacije usled niskog folatnog statusa (Friso i sar.,

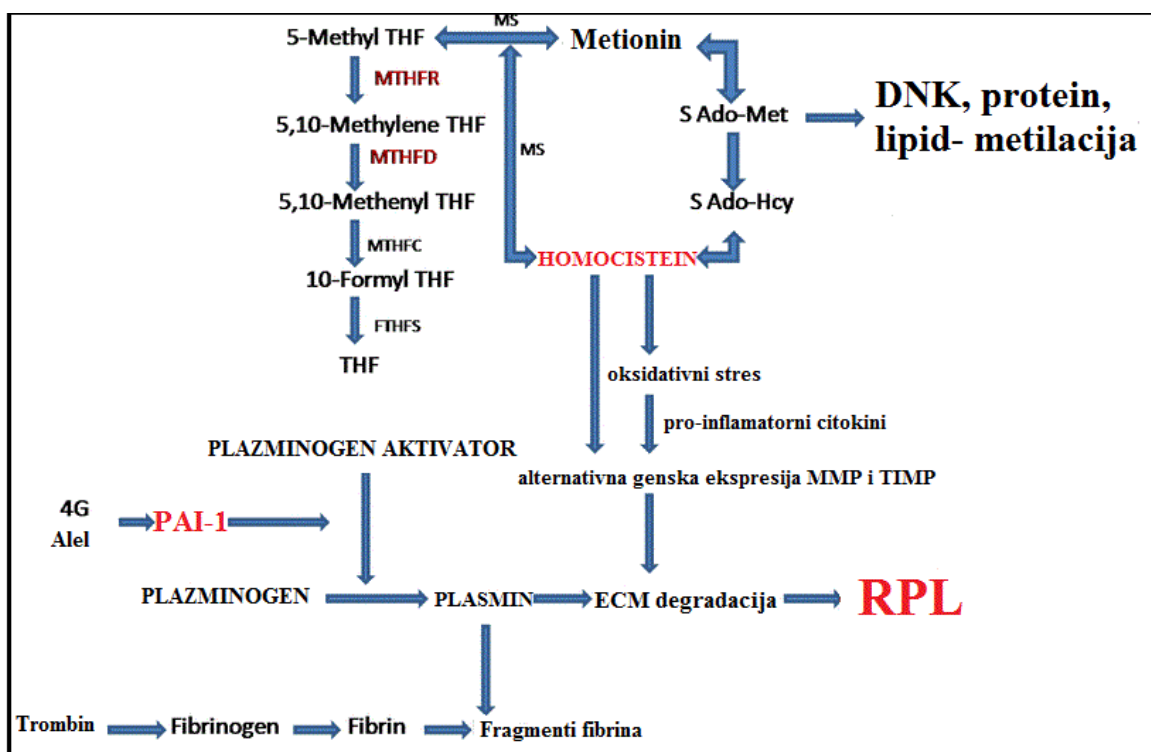
2002), a da je hipometilacija uočena u ranim stadijumima tumorogeneze (Jones i sar., 2005), sugerisali su da ova mutacija može biti povezana sa razvojem kancera (Araujo i sar., 2015; Al-Motasseem i sar., 2015). *MTHFR* genske varijante su dosta ispitivane kod depresivnih poremećaja i odgovora na antidepresivnu terapiju ali su i u ovom slučaju rezultati dosta raznoliki. Nekoliko studija našlo je jasnu vezu između TT genotipa 677 lokusa i depresivnog poremećaja, dok druge studije nisu uočile postojanje ove asocijacije (Gabriela Nielsen i sar., 2015). Analiziranje 1298 *MTHFR* genskog lokusa ukazalo je na 2 puta povećan rizik za depresivni poremećaj kod žena koje su homozigotni AA nosioci (Gabriela Nielsen i sar., 2015). Termolabilna varijanta *MTHFR* enzima predstavlja faktor rizika za nastanak hiperhomocisteinemije, naročito ako je nivo folata u plazmi smanjen. Ako je količina folata adekvatna, homozigotni nosioci 677TT izmene ne pokazuju hiperhomocisteinemiju. Ovakva gensko-nutriciona interakcija pokazuje da dovoljna količina folata može da prevaziđe genski poremećaj i da spreči pojavu hiperhomocisteinemije. Uz nedostatak folata od značaja je i nivo vitamina B6 i B12, kao i primena lekova koji deluju na metabolizam folata, kao što su metotreksat i antikonvulzivna terapija. Pored asocijacije sa povećanim rizikom za kardiovaskularne bolesti i tumore, ovaj gen je prepoznat i kao značajni prediktivni parametar kod žena sa različitim komplikacijama tokom trudnoće (gubitak ploda, intrauterina restrikcija rasta, infertilitet, neuspešne IVF procedure) (Kovač i sar., 2010; Safdarian i sar., 2014; Coriu i sar., 2014b; Tiwari i sar., 2015).

#### **1.2.3.4. PAI-1 -675 4G/5G**

Inhibitor aktivatora plazminogena tip 1, za koji kodira gen SERPINE 1, je jednolančani glikoprotein koji se sastoji od 379 amino-kiselina (Bosma i sar., 1988). Pripada familiji serin proteaznih inhibitora koji funkcioniše kao primarni inhibitor endogene fibrinolitičke aktivnosti, tako što inhibira tkivni aktivator plasminogena (tPA) i urokinazni aktivator plazminogena (uPA), glavne aktivatore plazminogena

i same fibrinolize. *PAI-1* gen lokalizovan je na hromozomu 7, u regionu q21.3-q22, i sastoji se od 9 egzona i 8 introna (Bosma i sar., 1988). Sinteza i sekrecija PAI-1 proteina može biti modifikovana različitim faktorima, kao što su hormoni, faktor rasta, endotoksini, citokini, ali na količinu i aktivnost ovog proteina značajno mogu uticati i genetički faktori. Pokazano je da transkripciona regulacija sinteze PAI-1 može biti izmenjena u zavisnosti od prisustva određenih alelskih oblika *SERPINE1* gena. Povećana sinteza ovog proteina povezuje se sa stanjem povećane koagulacije, dok intenzivna fibrinoliza usled smanjenog nivoa PAI-1 proteina može biti asocirana sa komplikacijama usled krvarenja (Schleef i sar., 1989; Dieval i sar., 1991). Interesantan je slučaj potpune deficijencije PAI-1 opisan kod devetogodišnje devojčice koja je imala nekoliko ozbiljnih epizoda hemoragije nakon povrede ili operacije. Sekvenciranjem njene DNK na PAI-1 gen pokazano je da na 3' kraju egzona 4 postoji insercija 2 bazna para koja dovodi do pomerenog okvira čitanja i nizvodnog formiranja preuranjenog stop kodona (Fay i sar., 1992). Više polimorfizama otkriveno je u ovom genu, a najviše je proučavan 4G/5G polimorfizam u promotorskom regionu na poziciji -675 (rs1799889, NM\_000602.4:c.-821\_-820insG). Insercija/delecija jednog guanina u ovom regionu igra značajnu ulogu u regulaciji genske ekspresije i asocirana je sa različitim plazmatskim nivoom PAI-1. Za sada je pokazano da 4G alel, koji se javlja sa učestalošću od oko 50%, dovodi do povećanog nivoa PAI-1 proteina, čime se redukuje fibrinoliza, usled čega može doći do stanja povećane koagulacije i povećanog rizika za tromboze (D' Amico i sar., 2013; 2015; Lijnen, 2005; Parveen i sar., 2013; Sartori i sar., 1998). Ovaj polimorfizam ispitan je i u studijama asocijacije sa različitim patologijama i stanjima tokom trudnoće. Proteini koji su uključeni u proces fibrinolize su neophodni za invaziju trofoblasta na endometrijum, što ih čini važnim faktorom u procesu implantacije embriona ali i tokom asistiranе reprodukcije (Dossenbach-Glaninger i sar., 2003). Usled smanjenja procesa fibrinolize, višak fibrina se akumulira u spiralnim arterijama i u

intervilusnom prostoru i na taj način može sprečiti normalni razvoj fetusa (Parveen i sar., 2013). Žene koje nose 4G4G oblik imaju veći rizik za komplikacije tokom trudnoće, kao što su preeklampsija, ponovljeni gubici ploda i mrtvorodena deca. I homocistein i plazminogen dovode do degradacije ili poremećaja u regulaciji sastava ekstracelularnog matriksa (ECM) što može uzrokovati prevremeni porođaj ili ponovljeni gubitak ploda (engl. *Recurrent Pregnancy Loss - RPL*) (Dossenbach-Glaninger i sar., 2003; Parveen i sar., 2013), što je šematski prikazano na Slici 8. Takođe je pokazano da se homozigotni 4G4G oblik češće javlja kod žena koje su imale neuspeh implantacije nakon embrio transfera, nego kod fertilne kontrolne grupe (Coulam i sar., 2006a).



Slika 8. Veza između homocisteina, PAI-1 proteina i fibrinolitičkog puta kod RPL-a (Parveen i sar., 2013-preuzeto, modifikovano).

### 1.2.3.5. *ATIII* 786 G>A

Jedan od glavnih inhibitora koagulacionog puta jeste antitrombin III (ATIII) kodiran *SERPINC1* genom, poznatim i kao *ATIII* gen. Antitrombin je protein od 58kDa koji pripada grupi inhibitornih faktora. Za razliku od drugih prirodnih antikoagulanasa, kao što su protein C i protein S, ovaj protein nije zavisen od vitamina K. U svojoj strukturi poseduje dva funkcionalna domena, jedan je heparin vezujuće mesto, a drugi je reaktivni centar enzima (Lane i sar., 1996). Glavna uloga ovog enzima jeste u inhibiciji mnogobrojnih serin proteaza koje su uključene u put koagulacije, od kojih su najznačajniji aktivirani faktor X (FXa) i trombin (FIIa), a u nešto manjoj meri i faktori IXa, XIa i XIIa. Iako postoji više inhibitora koagulacije, pokazano je da antitrombin ima ključnu ulogu u regulaciji procesa koagulacije obezbeđujući oko 80% prirodnog antikoagulantnog efekta (Maclean i Tait, 2007). Pored antikoagulantne uloge, pokazano je da ATIII ima važnu ulogu i u anti-inflamatornom efektu koji se ostvaruje njegovom interakcijom sa endotelom. Inhibirajući trombin i FXa redukuje se i oslobađanje proinflamatornih citokina posredovano faktorima FIIa/FXa, kao što su interleukin 6 i interleukin 8. Kada se antitrombin veže za heparan sulfat koji se nalazi na endotelu, dolazi do povećane produkcije važnih anti-inflamatornih citokina (prostaciklina) koji posreduje u relaksaciji glatkih mišića, vazodilataciji i inhibiciji agregacije trombocita. Anti-inflamatorni efekat AT je povezan sa njegovom sposobnošću da se veže za endotelske glukozaminoglikane i nije primećen u njegovoj reakciji sa slobodno cirkulišućim heparinom (Patnaik i Moll, 2008). Heparan sulfat je član glikozaminske familije ugljenih hidrata koja obuhvata i blisko srodni molekul heparin. Heparin se proizvodi u mastocitima i funkcioniše kao antikoagulant, dok se heparan sulfat proizvodi u skoro svim tipovima ćelije i ima znatno niži antikoagulantni efekat od heparina. Heparin dovodi do konformacione promene na proteinu otkrivajući njegovu reaktivnu petlju čime se povećava antikoagulantna



uloga antitrombina i do nekoliko hiljada puta (Wang i sar., 2015). Prethodne studije spekulisale su da promene u nivou ATIII proteina ili njegove aktivnosti mogu da dovedu do različite senzitivnosti za heparin, što je rezultovalo istraživanjima efekata ATIII suplementacije na heparinsku senzitivnost (Despotis i sar., 1997; Dietrich i sar., 2013). Pored suplementacije ATIII proteina, novije studije okrenule su se ispitivanjima tačkastih polimorfizama unutar *ATIII* gena koji mogu dovesti do promena u količini ili aktivnosti ovog proteina. Gen za ovaj enzim sastoji se od 7 egzona i nalazi se na 1q23-25 hromozomu (Lane i sar., 1996), a najviše je eksprimiran u parenhimskim ćelijama jetre. Kao što je već naglašeno, prvi opisani nasledni poremećaj doveden u vezu sa trombofilijom bio je deficijencija antitrombina, koja se javlja usled određenih mutacija u ovom genu. Do danas je identifikovano više od 120 mutacija u *ATIII* genu koje na različite načine mogu dovesti do deficijencije ovog enzima, što rezultira u povećanom riziku za venske tromboze. Neke od ovih mutacija dovode do deficijencije tipa I, koja se smatra „klasičnom antitrombin deficijencijom“ u kojoj se redukuje sinteza antitrombina III dovodeći do kvantitativne deficijencije ovog enzima. Neke dovode do izmena u strukturi proteina (heparin vezujućeg ili reaktivnog domena) usled čega dolazi do deficijencije tipa II, dok neke dovode i do multipnog efekta u kome dolazi do izmene i u funkcionalnom delu proteina i u njegovom nivou (Lane i sar., 1996). Genetički faktori koji dovode do interindividualne varijabilnosti u nivou antitrombina još uvek nisu precizno definisani. Studija analize senzitivnosti na heparinsku terapiju pre operacije srca identifikovala je dve mutacije u egzonu 5 u *ATIII* genu (rs5877, rs5878) koje mogu biti odgovorne za produženo koagulaciono vreme i potrebu za višim terapijskim nivoom heparina, sugerišući postojanje efekta ovih mutacija na preoperativnu senzitivnost na heparin (Wang i sar., 2015). Jedna od mutacija za koju je pokazano da dovodi do funkcionalnih posledica jeste izmena u intronu 1, lokalizovana oko 140bp nizvodno od egzona 1. Ova mutacija, koja se označava kao 786 G>A (rs2227589), dovodi do izmene guanina adeninom,

usled čega dolazi do smanjenja antitrombina i značajnog povećanja FXa proteina, što povećava rizik za abnormalnu koagulaciju (Anton i sar., 2009). Ovaj polimorfizam ispitan je u studijama asocijacije sa venskim trombozama (Bezemer i sar., 2008), kao i komplikacijama tokom trudnoće i ponovljenim gubicima ploda (Cao i sar., 2013b; Guerra-Shinohara i sar., 2012; Sharma i sar., 2015).

#### 1.2.3.6. ACE I/D

Angiotenzin konvertujući enzim je važna komponenta renin-angiotenzin-aldosteron sistema. Njegova uloga je da konvertuje angiotenzin I u angiotenzin II, jedan od najmoćnijih vazokonstriktora u organizmu. Takođe, ACE razgrađuje i vazodilatatorne kinine u organizmu. Količina ACE enzima u plazmi tokom života je relativno konstantna. Međutim, velika interindividualna varijabilnost u izmerenim vrednostima ACE sugeriše značajno učešće genetičkog faktora u kontroli nivoa ovog enzima u plazmi (Alhenc-Gelas i sar., 1991). Gen odgovoran za ekspresiju ACE enzima nalazi se na dugom kraku hromozoma 17 (17q23), dugačak je 21 kb i sastoji se od 26 egzona i 25 introna (Sayed-Tabatabaei i sar., 2006). Ovaj gen nosi informaciju za dve različite forme ACE enzima, somatsku formu molekulske mase od 170 kDa, koja je eksprimirana u somatskom tkivu i obeležava se kao sACE i testikularna forma, tACE, koja se nalazi u germinativnim ćelijama testisa i manje je molekulske mase, od oko 100 kDa. Funkcija tACE još uvek nije sasvim jasna, ali se smatra da može imati ulogu u fertilitnosti kod muškaraca. Za ekspresiju pojedinih formi ACE enzima odgovorni su različiti promotori (Sayed-Tabatabaei i sar., 2006). Somatski ACE molekul nastaje kao iRNK transkript od egzona 1 do egzona 26, isključujući egzon 13, dok testikularni ACE nastaje transkripcijom od egzona 13 do egzona 26 (Hubert i sar., 1991). Smatra se da struktura ACE gena može biti rezultat duplikacije u okviru predačkog gena. Egzoni 4 do 11 i 17 do 24, kodiraju 2 homologa domena ACE molekula, koja su vrlo slična i po veličini i po sekvenci. Za razliku od egzona u ova dva klastera,

intronske sekvence se značajno razlikuju po dužini (Hubert i sar., 1991). Pretpostavlja se da se u svim sisarskim vrstama u kojima je ovaj gen ispitan (ljudi, miševi i zec) dogodila duplikacija, dok se kod *Drosophila melanogaster*, homolog ACE gena javlja bez duplikacije, što može predstavljati njegovu predačku formu (Coates i sar., 2000). Sugeriraju se da se ova duplikacija desila pre oko 300 miliona godina. Danas je identifikovano više od 160 polimorfizama u genu za ACE, od kojih se samo 34 nalaze u kodirajućim regionima od kojih su 18 *missense* mutacije (Sayed-Tabatabaei i sar., 2006). Do sada je najviše proučavan inserciono/delecioni polimorfizam sekvence dugačke 278 nukleotida koja se nalazi u intronu 16 ovog gena, a otkrili su ga Rigat i saradnici (1990). Homozigoti za deleciju DD imaju dvostruko veći plazmatski nivo enzima, u odnosu na homozigote za inserciju II, dok heterozigotni nosioci ID imaju intermedijalni nivo (Rigat i sar., 1990). Novije studije pokazale su da postoji značajna veza između PAI-1 nivoa u plazmi (izraženo u ng/mL) kod osoba koje su nosioci D alela (DD i ID genotipovi) u odnosu na one sa homozigotnom insercijom (II genotip) (de Carvalho i sar., 2016). Ovaj polimorfizam intenzivno je proučavan i asociran sa različitim stanjima i bolestima, kao što su dijabetes, različiti kanceri, venske tromboze, hipertenzija, koronarne srčane bolesti, šlog i različite komplikacije tokom trudnoće (Gong i sar., 2015; Fatini i sar., 2000; Morgan i sar., 1999; Munhoz i sar., 2005; Su i sar., 2013).

#### 1.2.3.7. *ITGB3* 1565 T>C

U adheziji i agregaciji trombocita tokom hemostaze glavnu ulogu ima integrinski kompleks na površini trombocita. Jedan od glavnih kompleksa uključenih u ove mehanizme jeste glikoproteinski kompleks GPIIb/IIIa, poznat i kao  $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$ . Ovaj kompleks se formira kroz kalcijum zavisnu asocijaciju GPIIb i GPIIIa, neophodnu za agregaciju trombocita i njihovu adheziju na endotel (Calvete i sar., 1995). Ekstracelularni deo ovog glikoproteinskog receptora služi za vezivanje fibrinogena

i vWF i ima ulogu u aktivaciji trombocita (Ma i sar., 2007). Inhibitori GPIIb/IIIa se danas koriste da spreče nastanak krvnog ugruška i da smanje rizik za pojavu srčanog udara i šloga. Glikoprotein IIIa, poznat i kao Integrin Beta 3 Receptor, kodiran je *ITGB3* genom koji se nalazi na hromozomu 17. Najznačajnija izmena koja je otkrivena u ovom genu jeste 1565 T>C, poznata i kao PLA1/A2 polimorfizam, i nalazi se u drugom egzonu, na hromozomskoj lokaciji 17q21.32. Učestalost ove izmene je između 15% i 20% u zdravoj populaciji (Komsa-Penkova i sar., 2016). Ova nukleotidna izmena, dovodi do zamene amino kiseline leucin sa amino kiselinom prolinom na poziciji 59 u polipeptidnom lancu, što dovodi do konformacione promene koja je asocirana sa povećanjem agregabilnosti trombocita i povećanjem protrombotičke aktivnosti (Torabi i sar., 2012; Komsa-Penkova i sar., 2016). Ovaj polimorfizam je proučavan i asociran sa različitim bolestima i stanjima. Pokazano je da izmena 1565C dovodi do povećanog rizika za venske tromboze, infarkt miokarda, koronarne arterijske bolesti i heparinom indukovanu trombocitopeniju (Khatami i sar., 2016; Harris i sar., 2008; Pourgheysari i sar., 2013; Renner i sar., 2001; Ridker i sar., 1997b; Weiss i sar., 1996). Meta analize pokazale su asocijaciju C alela sa ishemičnim šlogom (Floyd i sar., 2014a) i sa miokardijalnom infarkcijom (Floyd i sar., 2014b; Pastinen i sar., 1998). Ovaj polimorfizam proučavan je i u studijama asocijacije sa različitim kancerima, kao što su ovarijalni kancer i kancer dojke (Bojesen i sar., 2003; 2005; Langsenlehner i sar., 2006). Novija istraživanja pokazala su da je 1565C varijanta kod žena značajan faktor rizika za pojavu DVT u mlađem dobu (<45 godina), za ponovljeni trombotički događaj, kao i za rani gubitak ploda (Komsa-Penkova i sar., 2016; Ruzzi i sar., 2005). Međutim, rezultati ispitivanja ovog polimorfizma nisu uniformni. Neke studije nisu našle asocijaciju A2 alela i dubokih venskih tromboza (Renner i sar., 2001), kao ni infarkcije miokarda (Ridker i sar., 1997b). Smatra se da dodatni faktori koji povećavaju protrombotičku aktivnost, kao što su trudnoća, postpartalni period i oralni kontraceptivi, mogu biti okidači za pojavu DVT i

ponovljenih tromboza kod mlađih žena koje su nosioci ove izmene (Komsa-Pankova i sar., 2016).

#### **1.2.4. Trombofilija i reprodukcija**

Nasledna trombofilija može biti prisutna ali ne mora nužno indukovati stanje hiperkoagulacije koja dovodi do kliničke tromboze. Postoje osobe kod kojih se, iako su nosioci trombofilne mutacije, nikada ne javi trombotički događaj. Zbog toga se smatra da dodatni, spoljašnji faktori, predstavljaju okidač za pokretanje i razvoj hiperkoagulacije i pojavu venske tromboze. Još od 19. veka bilo je prepoznato da postoje tri glavna faktora koja doprinose formiranju ugruška u venama: dinamički, mehanički i biohemijski. Ovi faktori su, na fiziološkom nivou, međusobno povezani i mogu da potenciraju jedan drugog. Dinamički faktori koji dovode do tromboze odnose se na zastoj cirkulacije, koji se može javiti usled dužeg perioda imobilizacije (kao što je vožnja duža od 4-5 sati, avionom ili drumskim prevozom, boravak u krevetu duži od 3 dana, nošenje gipsa ili stacionarni način života). Ove situacije dovode do povećanog rizika za nakupljanje krvi, uglavnom u ekstremitetima gde se i formira krvni ugrušak. Drugi faktor za nastanak tromboza su mehaničke povrede koje povećavaju verovatnoću nastanka tromba ili zbog narušavanja integriteta krvnih sudova ili zbog povećane produkcije inflamatornih faktora i faktora koagulacije. Treći faktor za povećani trombotički rizik predstavljaju promene u biohemijskom sastavu krvi. Ove biohemijske promene mogu biti nasledne (kao što su deficijencija određenih proteina ili izmene u određenim genima), ili privremene, uzrokovane spoljašnjim faktorima, uključujući i dinamičke i mehaničke faktore koji dovode do tromboze (imobilizacija, operacija, kancer, korišćenje oralnih kontraceptiva ili supstitucione hormonske terapije, trudnoća ili postpartalni period) (Varga, 2007; Varga i Kujovich, 2012). Način na koji interakcija spoljašnjih faktora sa naslednim predispozicijama može dodatno da poveća rizik za trombotički događaj prikazan je u Tabeli 2.

Trombotički događaj, uzrokovan izmenom u genima asociranim sa trombofilijom, prvi put se može dogoditi tokom trudnoće ili postpartalnog perioda (Raspollini i sar., 2007). Trudnoća je fiziološko stanje sa povećanom koagulacijom, koja predstavlja nezavisni faktor rizika za trombotički događaj, pogotovo za pojavu dubokih venskih tromboza kod trudnice. Ovo stanje uzrokovano je hormonalnim promenama u majčinoj krvi u toku trudnoće kada se povećava nivo nekoliko koagulacionih faktora (FVII, FVIII, FX, FvW), redukuje se aktivnost prirodnih antikoagulanasa (PC, PS), a umanjuju se fibrinolitički procesi (Coriu i sar., 2014a; De Santis i sar., 2006).

**Tabela 2. Stečeni faktori rizika i interakcija sa naslednom trombofilijom.**

Faktor rizika	Rizik za VT (OR)	Interakcija sa naslednim faktorom
Godine	1000 (detinjstvo vs. $\geq 65$ godina)	Prisutvo nasledne trombofilije dovodi do pojave VT u mlađem dobu
Antifosfolipidni sindrom	4	Dodatno povećan rizik za VT
Porodična istorija	2-3	Veći je VT rizik ukoliko se javlja kod više članova u porodici mlađih od 50 godina
Kancer	6-7	Prisustvo <i>FVL</i> i <i>FII</i> mutacije dodatno povećava rizik za VT 2-4 puta kod pacijenata koji imaju kancer
CVK	2	Prisustvo <i>FVL</i> i <i>FII</i> mutacije dodatno povećava rizik za VT za 2-3 puta
Imobilizacija	2-6	Prisustvo <i>FVL</i> povećava VT rizik za oko 17-24 puta
Hospitalizacija	8	Nije definisano
Operacija	6	Dodatni rizik usled nasledne trombofilije je relativno mali u odnosu na trombotički rizik usled operacije. <i>FVL</i> i <i>FII</i> -kontradiktorni podaci
Mehanička trauma	5-13	Još uvek nedovoljno jasni podaci
OK	3-5	Prisustvo <i>FVL</i> ili <i>FII</i> povećavaju rizik za 16-30 puta. Deficijencija AT, PC i PS povećavaju rizik za oko 10-23 puta.
HST	2-4	<i>FVL</i> i <i>FII</i> heterozigoti, dodatno povećavaju rizik 14-25 puta.
SMER	2-3	Nije poznato
Gojaznost	2-3	Povećan rizik
Putovanja	2	Letenje avionom i nasledna trombofilija povećavaju rizik 14-16 puta

VT-venska tromboza, CVK-centralni venski kateter, OK-oralni kontraceptivi, HST-hormonska supstituciona terapija, SMER-selektivni modulatori estrogenskog receptora, *FVL*-faktor V Lajden, *FII*-faktor II protrombin, AT-antitrombin, PC-protein C, PS-protein S. (Varga i Kujovich, 2012-preuzeto, modifikovano)

Proteklih godina intenzivno je ispitivana učestalost polimorfizama asociranih sa trombofilijom kod žena sa reproduktivnim neuspehom i komplikacijama tokom trudnoće. Pokazano je da su genetičke varijante koje se dovode u vezu sa naslednom trombofilijom mnogo češće prisutne kod žena sa komplikacijama tokom trudnoće, venskim tromboembolizmom i gubicima ploda, u poređenju sa zdravom, fertilnom kontrolom (Finan i sar., 2002; Biron-Andreani i sar., 2009; Kovač i sar., 2010; Yenicesu i sar., 2010). Sam reproduktivni uspeh umnogome zavisi od adekvatne maternalno-fetalne cirkulacije. Proces intravaskularne koagulacije na nivou uterusa i placente može biti značajan faktor u stanjima ponovljenih gubitaka ploda, intrauterine smrti ploda, preeklampsije, kao i abrupcije placente. Takođe, ne treba smetnuti sa uma da nastanci krvnih ugrušaka u samom plodu zavise od interakcije koagulacijskih faktora koje proizvodi embrion, odnosno fetus, sa jedne strane, i koagulacijskih faktora iz majčine krvi koji mogu proći kroz placentalnu barijeru, sa druge strane. Od 1980. godine pokazano je da i stečena i nasledna trombofilija može biti faktor za RPL, a različite studije pokazale su jasnu asocijaciju između nasledne trombofilije i reproduktivnog uspeha. Smatra se da rani gubitak ploda (do 12 ili 14 nedelje) može biti asociran sa maternalnom trombofilijom koja je značajna za ključne procese, kao što su uterušna implantacija oplođenog jajeta i razvoj placente. Značajno veća incidenca nasledne trombofilije uočava se kod ozbiljnih komplikacija tokom trudnoće, koje uključuju preeklampsiju, abrupciju placente, intrauterinu restrikciju rasta (engl. *Intrauterine growth restriction* - IUGR) i mrtvorodenu decu. Placenta predstavlja složeni fetomaternalni organ izgrađen od tkiva majke (zida materice) i tkiva embriona (horionske resice) koji funkcioniše samo u toku intrauterinog razvića. Preko placente se obavljaju sve metaboličke, endokrinološke, imunološke i nutritivne funkcije čiji krajnji cilj omogućava normalan rast i razvoj fetusa. Razvoj placente započinje implantacijom blastociste u maternalni endometrijum. Citotrofoblastne ćelije imaju ključnu ulogu u



pravilnom povezivanju sa zidom materice kako bi se omogućila razmena i adekvatno snabdevanje fetusa nutrijentima (Lam i sar., 2005). Citotrofoblastne ćelije su mononukleusne epitelne ćelije ektodermalnog porekla i pripadaju unutrašnjem sloju trofoblasta. Od diferencijacije ovih ćelija zavisi funkcija horionskih resica koje predstavljaju glavne funkcionalne jedinice placentе. Citotrofoblastne ćelije putem diferencijacije i fuzije formiraju spoljašnji trofoblastni sloj polimorfonukleusnih sinciotrofoblastnih ćelija, čija je glavna funkcija transport materija i lučenje hormona humanog horionskog gonadotropina (hHCG). Glavna funkcija ovog hormona jeste indukcija žutog tela da nastavi sa lučenjem progesterona što uzrokuje opstanak endometrijalne sluznice (decidue). U procesu endovaskularne invazije, citotrofoblastne ćelije zamenjuju endotelijalne ćelije i mišićni sloj materičnih arteriola, tako da su do kraja drugog trimestra krvni sudovi isključivo obavijeni citotrofoblastnim ćelijama. Glavni cilj ove endovaskularne invazije jeste da decidualne spiralne arteriole postanu šire i manje izuvijane, kako bi se omogućio lakši i adekvatniji protok majčine krvi u placentu (Lam i sar., 2005). Putem difuzije i osmoze, kao i nekih drugih nedovoljno ispitanih procesa, između ova dva krvotoka se uspostavlja prisna veza koja traje sve do kraja trudnoće. Krv iz placentе odlazi u embrion preko umbilikalne (pupčane) vene, dok se vraća u placentu preko pupčane arterije.

Nedovoljna prokrvljenost placentе može da nastane usled trombotičkog događaja, bilo u maternalnoj ili u fetalnoj cirkulaciji, koji može biti uzrokovan postojanjem nasledne ili stečene trombofilije. Pregledom placentе kod žena koje imaju naslednu trombofiliju uočeno je postojanje patoloških karakteristika placentе koje su povezane sa njenom vaskularizacijom. Ove promene uključuju smanjen razvoj placentе, višestruke infarkcije placentе i placentе sa fibrinoidnim nekrozama, hronični vilitis, kao i fetalnu trombotičku vaskulopatiju (Many i sar, 2001; Raspollini i sar., 2007). Placentalna insuficijencija može da dovede i do intrauterine

fiziološke restrikcije rasta fetusa koja nastaje usled fetalne nehranjenosti. Rast fetusa zavisi od kapaciteta placente da prenosi oksigenisanu krv i hranljive materije od maternalne do fetalne cirkulacije. Pokazano je da hiperkoagulabilno stanje i u fetalnoj cirkulaciji može da dovede do pojave mikrotromboza u fetalnim krvnim sudovima i posledično do placentalne infarkcije i spontanog pobačaja (Yalcintepe i sar., 2015).

Kako trombofilija može da dovede i do pojave mikrotromboze na mestu implantacije, važno je uzeti u obzir i angiogenezu koja se dešava u toku implantacije embiona. Neuspešna implantacija oplođenog embriona je jedan od glavnih problema IVF procedure, a javlja se čak u oko 70% slučajeva kod žena podvrgnutih ovom postupku. Postoje mnogi faktori koji mogu da utiču na uspešnost asistiranе reprodukcije, a neki od njih su: godine, prethodne uspešne trudnoće, bazalni nivo hormona, broj antralnih folikula pre stimulacije, debljina endometrijuma, pozicija i dužina uterusa, kao i tehnika embriotransfera koja se koristi (Templeton i sar., 1996; Egbase i sar., 2000; Ng i sar., 2000; Akande i sar., 2002; Kovacs i sar., 2003; Qublan i sar., 2005). Nasledna ili stečena trombofilija je takođe studirana i asocirana sa pojavom ranog gubitka ploda i neuspešne IVF procedure, jer je pokazano da ova stanja ometaju inicijalnu vaskularizaciju koja se dešava u toku implantacije, a neophodna je za uspešno začće i trudnoću (Azem i sar., 2004; Coulam i sar., 1997; Grandone i sar., 2001; Geva i sar., 1995; Martinelli i sar., 2003). Rezultati ovih ispitivanja, koji su pokazali da nasledna trombofilija može predstavljati rizik za neuspeh ART procedure, ukazali su na moguću ulogu markera nasledne trombofilije u etiologiji idiopatskog infertiliteta, dovodeći do poremećaja u mehanizmima uključenim u proces implantacije.

### 1.2.5. Terapija trombofilija u toku trudnoće

Antikoagulantna terapija u toku trudnoće danas se široko primenjuje kao prevencija i tretman venskog tromboembolizma, a u kombinaciji sa aspirinom koristi se i kao prevencija komplikacija tokom trudnoće kod žena sa antifosfolipidnim sindromom ili naslednom trombofilijom. Danas je dostupno nekoliko različitih antitrombotika u koje spadaju: indirektni inhibitori trombina (nefrakcionisani heparin, engl. *Unfractionated heparin* - UFH i heparin niske molekulske mase, engl. *Low Molecular Weight Heparin* - LMWH), direktni inhibitori trombina (oralni antikoagulansi, varfarin i kumarinski antikoagulansi), fibrinolitički lekovi (streptokinaze) i antiagregacijski lekovi (acetilsalicilna kiselina, klopidogrel). Direktni inhibitori trombina se ne preporučuju kao terapija kod trudnica jer mogu da prođu kroz placentu i da ugroze trudnoću (Chan i sar., 2000; Grandone i sar., 2002; De Santis i sar., 2006). Incidenca javljanja specifičnih embriopatija, usled korišćenja ove terapije, kreće se od 5 do 10% (Chan i sar., 2000). Neki autori veruju da je rizik posebno veliki kada je trudnica izložena ovom leku između šeste i devete nedelje. Terapija varfarinom u toku drugog i trećeg trimestra asocirana je sa mogućim neurološkim posledicama, koje uključuju napade, kašnjenje u razvoju i hipotoniju kod fetusa, stanja koja se mogu pripisati pojavi intrakranijalne mikrohemoragije (Yarrington i sar., 2015). Pored toga, pokazana je i povećana incidenca spontanih pobačaja kod žena koje su koristile kumarinske antikoagulanse u poređenju sa trudnicama koje su bile na terapiji UFH (34.6% vs. 9.5%, respektivno). Iz navedenih razloga danas se kao antikoagulantna terapija kod trudnica koristi heparin. Naime, zbog velike molekulske težine, UFH ne prolazi fetalno-placentalnu barijeru i ne može ispoljiti teratogene efekte i uzrokovati krvarenje kod fetusa. Takođe, kratak polu-život i lakoća reverzibilnosti čine ga veoma pogodnim za terapiju u trećem trimestru. Sposobnost da koriguje aktivisano parcijalno tromboplastinsko vreme (engl. *Activated Partial*

*Thromboplastin Time* - aPTT), indikator koji meri efikasnost i unutrašnjeg i spoljašnjeg puta koagulacije, a koristi se i kao marker za praćenje efikasnosti terapije heparinom, u roku od 4 sata nakon poslednje doze smanjuje stopu postporođajnog krvarenja i omogućava bezbedno korišćenje lokalne anestezije (Yarrington i sar., 2015). Neželjeni efekti ove terapije koji se javljaju kod majke uključuju: osteoporozu, trombocitopeniju, alergije i hemoragiju, sa prosečnom incidencom od oko 3% koja je slična kao kod žena koje nisu trudne (Grandone i sar., 2002). U profilaktičkom tretmanu trudnica danas se sve više koristi LMWH zbog svoje efektivnosti i sigurnosti jer, kao i nefrakcionisani heparin, ne prolazi placentalnu barijeru. Komparativne studije ove dve terapije pokazale su bolju bioraspoloživost, duži polu-život i prediktivnu antikoagulantnu aktivnost LMWH u odnosu na nefrakcionisani heparin. Ove karakteristike dozvoljavaju da doza leka koja se daje trudnici bude fiksna i da se zasniva na individualnoj telesnoj težini, tako da nije potrebno praćenje aPTT. Pored toga, smatra se da LMWH terapija ima manju incidencu trombocitopenije i smanjen risk za osteoporozu, a do sada nije zabeležena ni pojava fetalnog ili neonatalnog krvarenja kod trudnica koje su bile na terapiji LMWH (Greer i sar., 2005; Yarrington i sar., 2015). Sekundarna profilaksa antikoagulantnim lekovima nije preporučljiva u slučajevima kada se terapija davala usled prolaznih, kliničkih faktora rizika za tromboze, kao što su operacije, traume, upotreba oralnih kontraceptiva ili trudnoća (Cohoon i Heit, 2014). Sekundarna profilaksa se preporučuje u slučajevima ponovljenih tromboza, kao i prisustva antifosfolipidnih antitela, deficijencije proteina C i proteina S, hiperhomocisteinemije, ali i nosioca heterozigotne ili homozigotne mutacije *FVL* ili *FII 20210 G>A*. Benefit, ali i rizik od krvarenja koji nosi sekundarna profilaksa, mora se pažljivo razmatrati i evaluirati u odnosu na kliničke i biohemijske parametre (Cohoon i Heit, 2014).

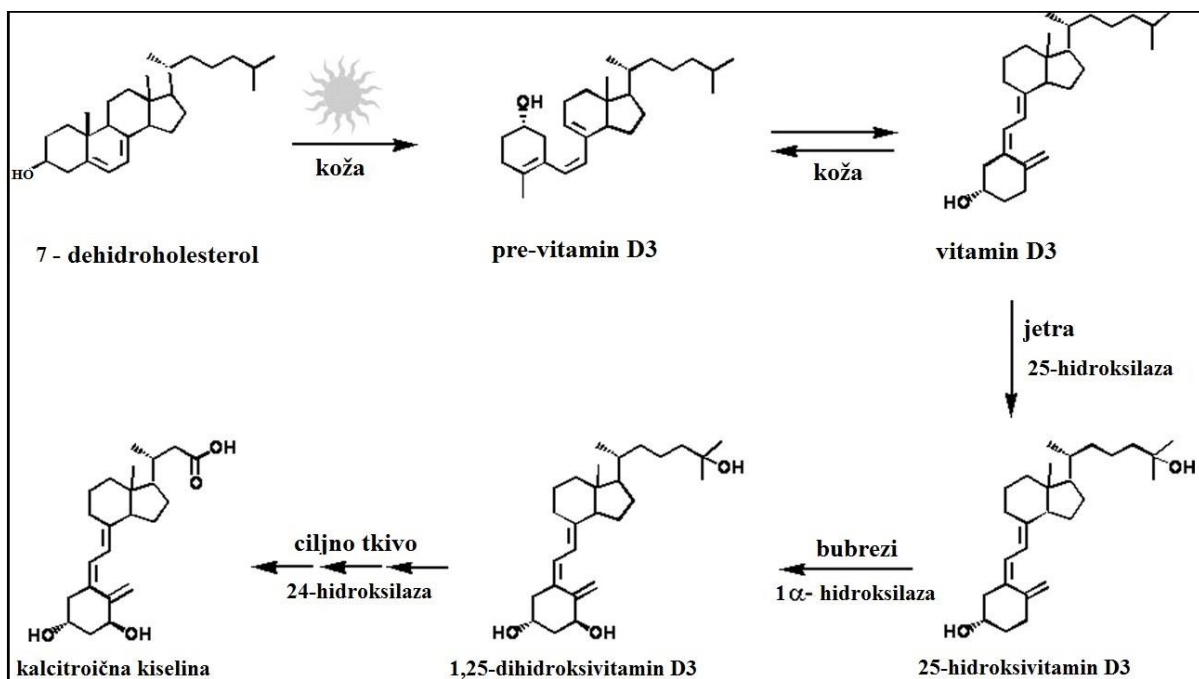
### 1.3. Vitamin D

Vitamin D (kalciferol) pripada grupi steroidnih hormona, a dva najvažnija oblika u kojima se javlja su vitamin D<sub>2</sub> (ergokalciferol) i vitamin D<sub>3</sub> (holekalciferol). Vitamin D<sub>3</sub> proizvodi se u koži izlaganjem sunčevim zracima, dok se vitamin D<sub>2</sub> unosi u organizam ishranom. Najveći prirodni izvor vitamina D nalazi se u masnim ribama (kao što su tuna i losos), dok se nešto manja količina može naći u žumancetu jaja, pečurkama i siru. U mnogim zemljama, uključujući i Srbiju, razne namirnice, kao što su mleko i mlečni proizvodi, žitarice i margarina, obogaćeni su vitaminom D, čime se povećava njegov unos (Davis i Milner, 2011). Drugi način sinteze ovog vitamina jeste izlaganjem kože sunčevim zracima, pri čemu UV zraci indukuju fotolitičku konverziju 7-dehidroholesterola do pre-vitamina D<sub>3</sub>. Adekvatno izlaganje sunčevim zracima dovodi do dovoljne sinteze vitamina D tako da nije potrebna dodatna suplementacija putem ishrane, a kako biološki aktivna forma vitamina D ima steroidnu strukturu, mnogi ovaj vitamin smatraju i hormonom. Ispitivanja nivoa vitamina D u serumu su ukazala na postojanje i značajnih interpopulacionih razlika u količini ovog vitamina, koje se objašnjavaju kako njihovim demografskim poreklom, tako i sredinskim faktorima kojima su bile izložene (izloženost sunčevim zracima i dostupnost hrane bogate vitaminom D). Prema trenutnim podacima, veliki deo svetske populacije ima deficijenciju ili insuficijenciju ovog vitamina, što je posledica nedovoljnog sunčanja ili korišćenja visokih zaštitnih faktora protiv sunčevih zraka, kao i konzumiranje hrane siromašne vitaminom D (Dusso i sar., 2005).

#### 1.3.1. Sinteza i metabolizam vitamina D

Vitamin D<sub>3</sub> se sintetiše iz 7-dihidroholesterola (derivata holesterola) koji se zatim fotolizira UV zracima i kao produkt ove reakcije nastaje pre-vitamin D<sub>3</sub>. Ova forma

izomerizuje do vitamina D<sub>3</sub> termo-senzitivnim procesom. Nastanak biološki aktivne forme uključuje višestepene kompleksne reakcije, prikazane na Slici 9.



**Slika 9. Sinteza aktivne forme vitamina D od 7-dehidroholesterola**  
(Dusso i sar., 2005-preuzeto, modificovano).

Konformaciona promena pre-vitamina D<sub>3</sub> omogućava da se vitamin D<sub>3</sub> veže za vitamin D vezujući protein (engl. *Vitamin D Binding Protein* - DBP) i da se krvotokom transportuje do jetre. Nivo DPB-a u plazmi je dvadeset puta viši nego što je potrebno za vezivanje ukupne količine metabolita vitamina D, tako da se preko 99% metabolita veže za ovaj protein i transportuje cirkulacijom do jetre (Dusso i sar., 2005). Po ulasku u ćeliju DBP se degraduje, pri čemu se vitamin D oslobađa za dalju metaboličku obradu. U jetri se vitamin D hidroksiluje na poziciji C-25 uz pomoć enzima iz superfamilije citohrom P450 (CYP2R1, CYP2D11 i CYP2D25) dovodeći do formiranja 25-hidroksivitamina D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>). Ova forma

vitamina D je glavna cirkulišuća forma koja se transportuje do bubrega uz pomoć DBP proteina (Christakos i sar., 2010). U bubrezima citohrom P450 monooksigenaza 25(OH)D<sub>3</sub> 1 $\alpha$  hidroksilaza (poznata i kao CYP27B1) metabolizuje 25(OH)D<sub>3</sub> do 1 $\alpha$ 25-dihidroksivitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>- kalcitriol). Iako obe forme vitamina D (D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub>) podležu ovim metaboličkim izmenama, veći deo ukupnog 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> potiče od D<sub>3</sub> forme. U ovom obliku, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, vitamin D je u svojoj aktivnoj formi i difuzijom ulazi u ciljne ćelije gde interaguje sa receptorom za vitamin D (engl. *Vitamin D receptor* - VDR) preko koga modifikuje transkripcionu aktivnost ciljnih gena (Zella i sar., 2008). DBP protein je važan za cirkulišući 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, ali nema uticaj na pul 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamina koji uđe u ćeliju i postaje biološki aktivan (Zella i sar., 2008). Zbog toga direktno merenje 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u krvi ne mora nužno da odražava količinu biološki dostupnog 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Bikle i sar., 1985). Ovo je jedan od razloga zbog čega je široko prihvaćeno da analiza serumskog nivoa 25(OH)D<sub>3</sub> predstavlja najbolji indikator individualnog vitamin D statusa. Iako se ove reakcije dešavaju predominantno u bubrezima, CYP27B1 eksprimiranje i u drugim organima, uključujući kožu, pluća, tanko crevo, a takođe se nalazi i u placenti, monocitima i makrofagima (Christakos i sar., 2010).

### 1.3.2. Biološke funkcije vitamina D

Steroidni hormon vitamin D, njegov receptor (VDR) i metabolički enzimi koji su uključeni u formiranje biološki aktivne forme ovog vitamina, zajedno igraju značajnu ulogu u vitamin D endokrinom sistemu. Primarna uloga vitamina D je održavanje homeostaze i konstantne koncentracije kalcijuma i fosfata u plazmi, tako što podstiče resorpciju ovih minerala iz creva i omogućava njihovo deponovanje u kostima. Neophodan je za pravilan rast kostiju i zuba, kao i za dobar rad mišića i nervnog tkiva. Nedostatak ovog vitamina dovodi do kliničke hipokalcenemije, hipofosfatemije, demineralizacije kostiju i spontanih fraktura,

bolova i slabosti mišića. Pored ovih klasičnih funkcija, vitamin D ima i širok spektar neklasičnih uloga u različitim procesima i sistemima u organizmu.

**Vitamin D i vaskularni sistem.** Pored glavne uloge koju ima u metabolizmu kalcijuma i fosfata, u poslednje vreme se sve više ispituje potencijalna uloga vitamina D u patofiziologiji kardiovaskularnih oboljenja (Beveridge i sar., 2013). Međutim, ispitivanje i asocijacija nivoa vitamina D i kardiovaskularnih bolesti je problematična zato što mnogi uzročnici CVD, kao što su godine, gojaznost, pušenje i fizička aktivnost, dovode i do smanjenja nivoa vitamina D (Beveridge i sar., 2013). Pokazana je asocijacija nivoa vitamina D i HDL holesterola (engl. *High Density Lipoprotein Cholesterol* - HDL holesterol), što sugerise da vitamin D može dovesti do smanjenog rizika za CVD. Uočeno je i postojanje inverzne asocijacije između nivoa vitamina D i LDL holesterola (engl. *Low Density Lipoprotein Cholesterol* - LDL holesterol), triglicerida i homocisteina, što sve ide dodatno u prilog hipotezi o ulozi vitamina D u smanjenju rizika za kardiovaskularna oboljenja (Glueck i sar., 2016, Wang i sar., 2016). Nizak nivo plazmatskog 25-hidroksivitamina D asociiran je sa povećanim arterijskim krvnim pritiskom i rizikom za hipertenziju (Tamez i Thadhani, 2012). *In vitro* studije su sugerisale da vitamin D može imati antitrombotičku aktivnost i moguću protektivnu ulogu u ovim bolestima (Glueck i sar., 2016; Saliba i sar., 2016). Studija Saliba i saradnika (2016) je pokazala da suplementacija vitaminom D može imati antitrombotički efekat kod pacijenata koji imaju insuficijenciju ovog vitamina, ali je zdravstvena korist ove suplementacije kod CVD pacijenata bila predmet intenzivnih debata proteklih godina (Autier i sar., 2014; Bolland i sar., 2014).

Studija Vimalleswaran i saradnika (2014) ispitala je asocijaciju genetičkog faktora sa cirkulišućom formom vitamina D, njegov uticaj na krvni pritisak i mogućí povećan rizik za hipertenziju. Geni koji su najznačajniji za ovu formu vitamina D su *CYP2R1* i *DHCR7* (koji kodira za 7-dehidroholesterol reduktazu) koji su



uključeni u vitamin D sintezu, kao i *GC*, *CYP24A1* i *CYP27B1* uključeni u njegov katabolizam. Za neke od polimorfizama u ovim genima pokazano je postojanje asocijacije sa koncentracijom 25(OH)D<sub>3</sub> (Berry i sar., 2012; Vimalleswaran i sar., 2013; 2014).

**Vitamin D i imunski sistem.** Receptor za vitamin D eksprimiran je u brojnim ćelijama imunskog sistema, uključujući limfocite, monocite i makrofage, što ga je činilo predmetom ispitivanja mnogih imuno-medijatorskih bolesti. Vitamin D deluje na funkciju i adaptivnog i urođenog imunskog sistema tako što, generalno govoreći, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> redukuje aktivnost adaptivnog, a poboljšava aktivnost urođenog imunskog sistema (Shin i sar., 2010). U adaptivnom imunskom sistemu, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> inhibira produkciju IgG anti-tela, proliferaciju i diferencijaciju B limfocita, i inhibira proliferaciju T limfocita. Pored toga, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> inhibira proliferaciju T pomoćnih 1 ćelija (engl. *T helper 1* - Th1), a samim tim i produkciju citokina od strane ovih ćelija, kao što su interferon gama (IFN-γ), interleukin 2 (IL-2) i faktor nekroze tumora-α (TNF-α). Suprotno tome, ovaj vitamin, indukuje stvaranje citokina od strane T regulatornih ćelija (engl. *Treg*) i T pomoćnih 2 ćelija (engl. *T helper 2* - Th2) ćelija, kao što su interleukini: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13 (Shin i sar., 2010). Zbog svoje sposobnosti da inhibira adaptivni imunski odgovor, vitamin D, kao i agonisti VDR receptora, se sve više koriste u supresiji autoimunoloških poremećaja u eksperimentalnim modelima bolesti kod životinja, kao što su reumatoidni artritis, dijabetes tip 1, encefalitis, sistemski lupus i alergijski encefalitis, a sve više se njegov uticaj ispituje i u lečenju ovih oboljenja kod ljudi (Cutolo 2010; Laverny i sar., 2010; Shin i sar., 2010).

**Vitamin D i ćelijska proliferacija i diferencijacija.** Još jedna od neklasičnih uloga vitamina D jeste i u ćelijskoj proliferaciji i diferencijaciji, a pokazano je da ima ulogu i u apoptozi (Shin i sar., 2010). Tokom poslednjih nekoliko decenija ispitivano je i pokazano da 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ima anti-proliferativnu i pro-

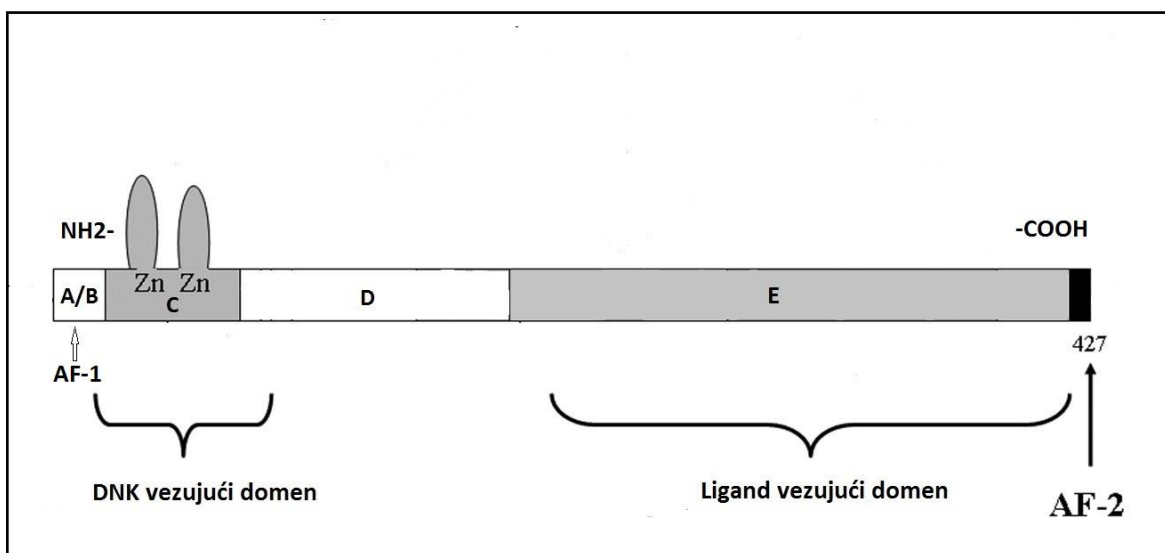
diferencirajuću aktivnost u različitim tipovima ćelija, kao što su keratinocite, osteoblasti, mezenhimske ćelije, neuralne ćelije, vaskularni endotel i ćelije imunološkog sistema (Shin i sar., 2010). Anti-proliferativni efekat se, barem jednim delom, ostvaruje preko indukcije inhibitora ćelijskog ciklusa koji sprečavaju prelazak iz G1 u S fazu ciklusa, a efekti na diferencijaciju se ostvaruju kroz promenu u ekspresiji faktora rasta i citokina. Međutim,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ne inhibira uvek proliferaciju i ne pokreće uvek diferencijaciju. U dendritskim ćelijama je pokazano da vitamin D ima ulogu u održavanju ovih ćelija u stanju nezrelosti, što ukazuje da je efekat ovog vitamina na proliferaciju i diferencijaciju veoma složen i razlikuje se u odnosu na tip ćelije (Shin i sar., 2010).

Pored navedenih uloga vitamina D, u poslednjih par godina se sve više ukazuje na njegov značaj u reproduktivnom sistemu i reproduktivnom uspehu, što će biti detaljno objašnjeno u posebnom poglavlju 1.3.5.

### **1.3.3. Receptor za vitamin D - VDR receptor**

Biološku aktivnu formu vitamin D ostvaruje kroz vezivanje za receptor za vitamin D koji pripada familiji steroidnih jedarnih receptora. VDR je eksprimiran u jedrima različitih ćelija imunskog sistema (T i B limfocitima, makrofagima i monocitima), endokrinog sistema (pankreasu, pituitarnoj i tiroidnoj žlezdi i adrenalnom kompleksu) i reproduktivnog sistema (ovarijumu, uterusu, placenti i endometrijumu) (Shahrokhi i sar., 2016). Prisustvo receptora za vitamin D u reproduktivnim tkivima, kao i postojanje polimorfizama u *VDR* genu, sugerise njegov potencijalni značaj u reproduktivnim procesima.

Humani VDR protein je, kao i većina jedarnih receptora, organizovan u nekoliko regiona (A-E) (Slika 10).



Slika 10. Šematski prikaz građe VDR receptora (Dusso i sar., 2005- preuzeto, modificovano)

Na COOH-terminusu u E regionu nalazi se ligand vezujući domen, dok se u C regionu, bliže NH<sub>2</sub>-terminusu, nalazi DNK vezujući domen sa motivom cinkanih prstiju. Da bi izmenio nivo transkripcije ciljnih gena, VDR se svojim ligand vezujućim domenom sa visokim afinitetom vezuje za jednu metaboličku formu kalцитriola-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. I druge metaboličke forme kalцитriola, kao što su 25(OH)D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, vezuju se za ovaj domen, ali sa mnogo manjim afinitetom. Afinitet za vezivanje liganda nije apsolutni pokazatelj transkripcione aktivnosti VDR proteina, jer intracelularni vezujući proteini, koji imaju ulogu da transportuju ligand do VDR receptora, mogu da menjaju stepen asocijacije liganda i VDR-a. Na COOH kraju ligand vezujućeg domena nalazi se ligand zavisni faktor funkcije 2 (AF2) koji ima glavnu ulogu u ostvarivanju konformacionih promena trodimenzionalne strukture receptora i koji je esencijalan za aktivaciju transkripcije. Ovaj korak je neophodan za pokretanje motornih proteina koji su odgovorni za brzo translociranje citoplazmatskog VDR molekula do jedra uz pomoć mikrotubula (Dusso i sar., 2005). Na N terminalnom kraju VDR proteina

nalazi se A/B domen u okviru koga se nalazi ligand zavisni transkripcioni domen AF1, koji ima bitnu ulogu u ostvarivanju tkivno specifične funkcije steroidnih receptora (Orlov i sar., 2012). Vezivanjem  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  za VDR dolazi do heterodimerizacije receptora za vitamin D sa retinoidnim X receptorom (RXR) pri čemu on postaje aktivirani transkripcioni faktor, koji dalje interaguje sa koregulatorima i preinicijacionim kompleksom transkripcije. DNK vezujući domen je visoko konzerviran i nalazi se u C regionu VDR proteina, a organizovan je u dva modula cinkanih prstiju. Ovaj motiv odgovoran je za visoko afinitetnu interakciju ovog kompleksa (kalcitriol-VDR/RXR) sa specifičnim DNK sekvencama, takozvanim VDRE elementima (engl. *Vitamin D Response Elements* - VDRE). VDRE se sastoje od dva heksanukleotidna ponovka koja su razdvojena varijabilnim brojem nukleotida, a ova sekvenca usmerava VDR/RXR heterodimer do promotorskog regiona ciljnih gena vitamina D (Orlov i sar., 2012). Ove sekvence se nalaze u promotorskom regionu ciljnih gena, što za ishod ima aktivaciju ili represiju transkripcije (Haussler i sar., 1998; Laverny i sar., 2010). Kontrola transkripcije zahteva dodatno regrutovanje koregulatora koji se mogu podeliti u tri funkcionalne grupe: oni koji regulišu transkripcionu aktivnost direktnom interakcijom sa transkripcionim faktorima i RNK polimerazom II, kompleks koregulatora koji učestvuje u modifikaciji histonskih repova acetilacijom i deacetilacijom i kompleks koji je uključen u ATP zavisno remodelovanje hromatina.

Aktivacija transkripcije uključuje koaktivatore SRC1, NcoA62-SKIP i histonske acetiltransferaze (CBP-p300 i PBAF-SW-SNF), koji vrše acetilaciju histona u nukleozomima i oslobađaju DNK za transkripciju. Kada se hromatin dekondezuje, VDR-interagujući proteini formiraju kompleks (od oko 15 proteina) koji se vezuje za AF2 domene VDR receptora. VDR-interagujući proteini predstavljaju vezu

između VDR-a i pokretanja transkripcije jer interaguju sa transkripcionim faktorima i RNK polimerazom II čime se inicira transkripcija (Dusso i sar., 2005).

Represija transkripcije započinje vezivanje VDR/RXR kompleksa za VDRE, regrutuju se korepresori VDR-interagujućih proteina iz familije histonskih deacetilaza koji sprečavaju izlaganje hromatina i posledično vezivanje proteina (TATA vezujućih proteina) za inicijacioni kompleks ciljnih gena (Dusso i sar., 2005).

Primenom metode masivnog paralelnog DNK sekvenciranja od strane Ramagopalan i saradnika (2010) identifikovano je 2 776 VDR vezujućih mesta i 229 gena čija se ekspresija značajno promenila nakon stimulacije kalцитriolom (Ramagopalan i sar., 2010). Identifikovana VDR vezujuća mesta bila su u blizini gena za koje je pokazana asocijacija sa kancerom i autoimunskim bolestima, kao što su *IRF8*, asociiran sa multiplom sklerozom i *PTPN2*, asociiran sa Kronovom bolešću (Ramagopalan i sar., 2010). Ovi elementi identifikovani su i u antitrombin genu uključenim u proces koagulacije, a takođe je pokazano da se na mnogim ovim VDR vezujućim mestima nalaze SNP-ovi asociirani sa određenim bolestima (Toderici i sar., 2016).

Pored toga što funkcioniše kao transkripcioni faktor, VDR je uključen i u posttranskripcione, mikro RNK molekulima posredovane, mehanizme regulacije genske ekspresije. Mikro RNK su mali, evoluciono konzervirani, nekodirajući RNK molekuli koji se sastoje od oko 20 nukleotida. Pokazano je da imaju uloge u različitim biološkim procesima, kao što su ćelijska proliferacija, diferencijacija, apoptoza i inicijacija i progresija razvoja kancera. Mikro RNK (miRNK) prepoznaju 3'UTR region ciljne informacione RNK (iRNK) i dovode do represije translacije ili iRNK degradacije (Mohri i sar., 2009). Kod čoveka je identifikovano preko 2500 zrelih miRNAK (Kozomara i Griffiths-Jones, 2014), a za više od 1/3 humanih gena

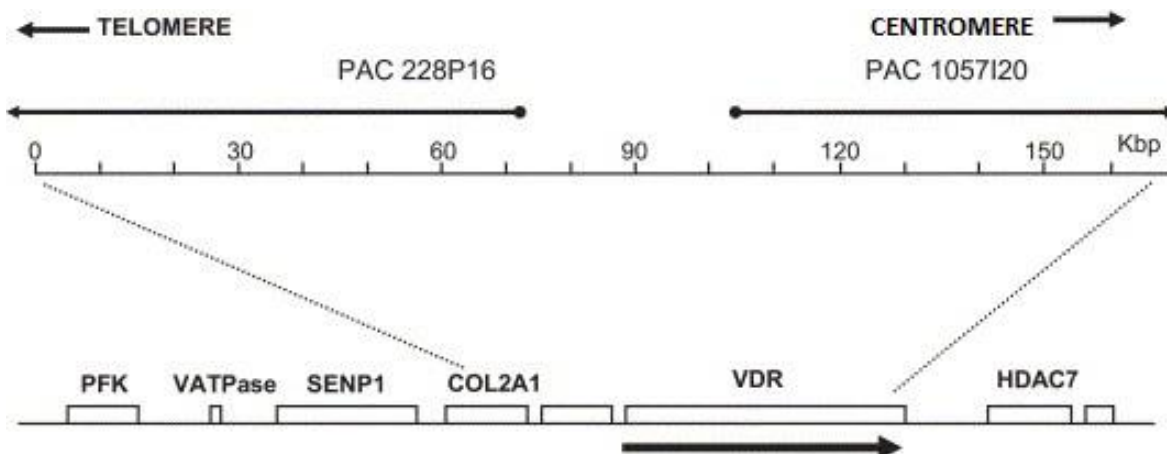
se smatra da predstavljaju targete za miRNK. Poslednjih godina ispitivano je da li neke od ovih miRNK mogu biti regulisane od strane VDR-a. Novija studija identifikovala je 111 miRNK u različitim ćelijskim linijama prostate čija je ekspresija regulisana VDR-om. Neke od ovih ćelijskih linija bile su ne-maligne, kao što su RWPE-1, HPr1, HPr1AR, dok su neke bile maligne i metastatske (RWPE-2, LNCaP, PC3). Ekspresija miRNK ispitivana je i upoređivana između dve grupe ćelija, jedne koja je tretirana sa  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , dok je druga kao kontrolna grupa tretirana sa etanolom (Singh i sar., 2015). Navedena studija je pokazala da se u nekim slučajevima javlja povećana ekspresija, dok se u nekim javlja snižena ekspresija miRNK kao odgovor na tretman vitaminom D. VDR vezujući regioni nalazili su se na udaljenosti od 5, 10, 50 i 100 kb od miRNK sekvence. Ovi rezultati sugerisali su da je direktno vezivanje VDR-a u blizini ovih miRNK funkcionalno značajno u obrazcu miRNK ekspresije kao odgovor na  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Dalja ispitivanja na ovim ćelijama pokazala su integrisanu vezu regulacije ekspresije ovih miRNK i njihovih targetnih iRNK (Singh i sar., 2015).

Sa druge strane, ispitivano je i da li sama ekspresija VDR gena može biti pod uticajem neke od miRNK. Utvrđeno je da nekoliko miRNK imaju komplementarnu sekvencu sa 3'-UTR regionom iRNK humanog VDR gena. Među njima, najkonzervativnija među vrstama miRNK, bila je *miR-125b* za koju je pokazano da posttranskripciono reguliše VDR receptor, dovodi do potiskivanja endogenog nivoa VDR-a, a utiče i na ekspresiju ciljnih gena (Mohri i sar., 2009). U mnogim tipovima kancera dolazi do izmenjene ekspresije miRNK. Neke studije sugerišu da je u tumorskim ćelijama smanjena miRNK ekspresija u odnosu na normalno tkivo, ali većina podržava koncept postojanja tumor-specifičnih obrazaca smanjene i povećane ekspresije miRNK gena. Sa druge strane, uočena je povećana ekspresija VDR gena kod nekoliko tipova kancera, što je asocirano sa boljom prognozom bolesti. Kako je ova studija pokazala negativnu regulaciju ekspresije VDR gena od

strane *miR-125b*, to je bio još jedan dokaz da je povećana ekspresije *VDR* gena u kancerima rezultat smanjene ekspresije *miR-125b*, što posledično može dovesti do poboljšanja antitumorskog efekta  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Mohri i sar., 2009). Pored navedene, kao značajna je uočena i *miR-22* koja doprinosi inhibitornom efektu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na proliferaciju i migraciju ćelija kancera kolona. Nivo ekspresije ove miRNK vremenski i dozno je zavisao od tretmana  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u određenim ćelijama kancera. Pokazano je da je smanjena ekspresija ove miRNK u velikom procentu ćelija tumora kolona i da je njena ekspresija direktno korelisana sa ekspresijom *VDR*. U saglasnosti sa ovom tumor supresivnom ulogom *miR-22* leži i podatak da je ekspresija ove miRNK značajno smanjena kod 39 od 50 kancera (78%) u odnosu na normalno tkivo, dok je ekspresija *VDR* gena bila smanjena kod 36 od 50 (72%) tumorskih u odnosu na normalno tkivo. Ovi podaci pokazali su da je *miR-22* target za  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  i da posreduje u njegovoj protektivnoj ulozi protiv kancera kolona, ali da je uključena i u regulaciju nekoliko ciljnih gena uključenih u metabolizam i fiziološku ulogu vitamina D (Alvarez-Diaz i sar., 2012).

#### 1.3.4. Gen za receptor za vitamin D - *VDR* gen

Receptor za vitamin D kodiran je *VDR* genom koji se nalazi na hromozomskoj lokaciji 12q13.1 i veličine je oko 100 kb (Uitterlinden i sar., 2004a). Za ovaj hromozomski region se smatra da je uključen u mnoge bolesti i hromozomske anomalije, kao što su keratin-asocirane bolesti, tripl-A sindrom, kongenitalna malformacija Milerovog kanala i druge (Lee i sar., 2000b). Gen za *VDR* nalazi se u ovom regionu nizvodno od gena za alfa 1 polipeptid kolagena tipa II (*COL2A1*). Ova dva gena lokalizovana su na dva odvojena PAC klona (P1057120 i P228P16) (Slika 11). Pored nekih već identifikovanih gena u ovom regionu, kao što su fosfofrutokinaza (*PFKM*), sentrin (SUMO specifična proteaza, *SENPI*) i histon deacetilaza (*HDAC7*), identifikovani su i neki geni još uvek nepoznate funkcije.

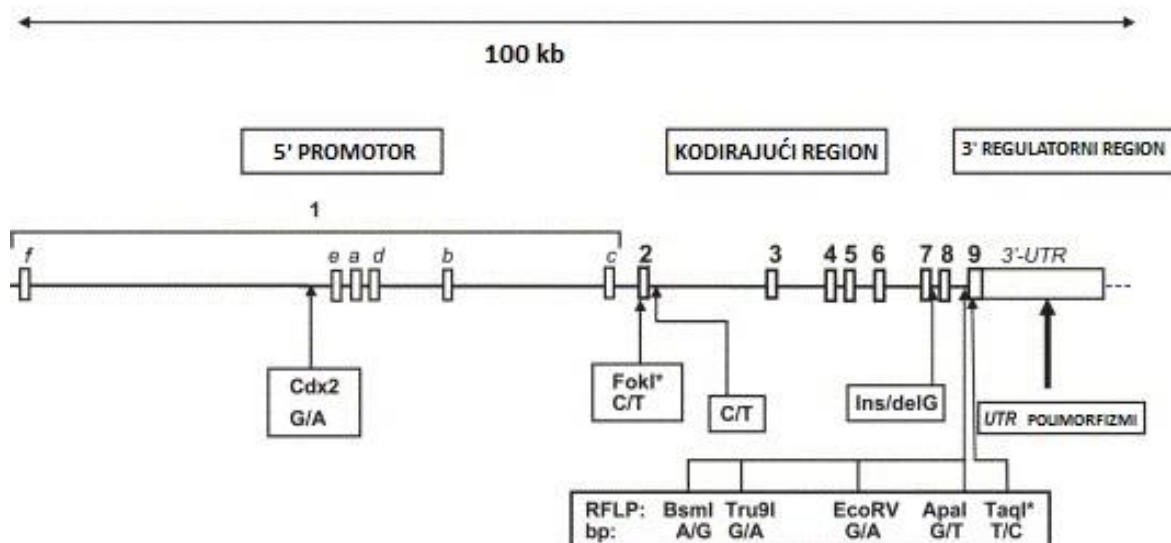


**Slika 11. Genomska struktura VDR-COL2A1 lokusa na hromozomu 12q13.1.** Strelica predstavlja pravac transkripcije VDR gena (Uitterlinden i sar., 2004a-preuzeto, modifikovano).

Najčešće proučavani polimorfizmi u *VDR* genu otkriveni su početkom devedesetih godina prošlog veka korišćenjem tehnika koje imaju nižu specifičnost i senzitivnost, kao što je skrining polimorfni obrazaca traka u Southern blot hibridizaciji. Ovaj skrining vršio se sa restrikcionim enzimima uz pomoć kojih su otkriveni polimorfizmi *ApaI*, *EcoRV*, *BsmI*, *TaqI* i *Tru9I* na 3' kraju *VDR* gena (prikazani na Slici 12) (Uitterlinden i sar., 2004a). Mnogo informativniji pristup za detekciju polimorfizama jeste analiza nukleotidnih sekvenci istog *VDR* regiona kod određenog broja individua. Ovu metodu primenili su Morrison i saradnici (1994) analizirajući 3.2 kb na 3' kraju UTR regiona *VDR* gena kod pacijenata sa poremećajem u mineralnoj koštanoj gustini (engl. *Bone Mineral Density* - BMD). Kada su sekvencirali ovaj lokus kod dve osobe koje su bile homozigoti za *BsmI*-*ApaI*-*TaqI* haplotip (BA<sub>T</sub>-BA<sub>T</sub> i ba<sub>T</sub>-ba<sub>T</sub>) ustanovili su da postoji 13 dodatnih polimorfni mesta u ovom 3.2kb dugačkom regionu. Sličan metodološki pristup primenili su i Brown i saradnici (2000) analizirajući kodirajuće regione *VDR* gena kod pacijenata sa paratiroidnim tumorom. Pored ranije opisanih polimorfizama,



TaqI i FokI, ovi autori nisu uočili postojanje dodatnih polimorfizama u kodirajućim regionima, ali su uočili dve intronske izmene u blizini egzona 2 i 8 (Slika 12).



**Slika 12.** Egzon-intron struktura VDR gena i pozicije najčešće ispitivanih polimorfizama. \*predstavlja polimorfizme koji se nalaze u kodirajućoj sekvenci. (Uitterlinden i sar., 2004a-preuzeto, modifikovano).

Od velikog broja otkrivenih polimorfizama u VDR genu, intenzivnije je studirano samo nekoliko: dva polimorfizma u intronu 8 ovog gena (rs1544410-BsmI i rs7975232-ApaI), i dva u egzonima 2 (rs2228570-FokI) i 9 (rs731236-TaqI). Polimorfizam FokI je, za sada, jedini otkriveni polimorfizam u kodirajućem regionu koji dovodi do izmene strukture VDR proteina, tako da će se u ovom radu razmatrati nezavisno, dok je za polimorfizme TaqI, ApaI i BsmI pokazano postojanje jake gametske neravnoteže vezanosti (engl. *Linkage disequilibrium* - LD), zbog čega će se oni razmatrati u jednom poglavlju.

#### 1.3.4.1. FokI rs2228570

Polimorfizam FokI (rs2228570) je, do sada, jedini opisani polimorfizam u VDR genu koji dovodi do funkcionalne izmene primarne strukture samog proteina.

Nalazi se u kodonu 2 na poziciji +27823, a naziv je dobio po restrikcionalnoj endonukleazi *FokI* koja može da se koristi za genotipizaciju. Usled supstitucije timina citozinom (ATG-ACG) dolazi do stvaranja drugog start mesta translacije, a u zavisnosti od start mesta sintetišu se i dve proteinske varijante VDR receptora. Postojanje T alela (poznatog i kao f alel) dovodi do sinteze duže varijante proteina (427 amino kiselina), koja se naziva i M1 forma, zbog metionina na prvoj poziciji. Ukoliko se na datoj poziciji nalazi C alel (poznat i kao F alel) dolazi do sinteze proteina kraćeg za 3 amino kiseline (424 amino kiseline), koja predstavlja M4 formu receptora, jer se metionin nalazi na 4 poziciji. Ove dve varijante receptora za vitamin D se ne razlikuju prema vezivanju za DNK, afinitetu za ligand, niti po heterodimerizaciji sa RXR-om, ali je pokazano da izmenjeni protein, u slučaju FF genotipa, ima 1.7 puta povećanu aktivnost (Uitterlinden i sar., 2004a). Kako se ovaj polimorfizam nalazi u egzonu 2, može se smatrati nezavisnim markerom VDR gena, budući da su analize LD blokova pokazale da nije u neravnoteži vezanosti sa drugim analiziranim polimorfizmima u ovom genu (Uitterlinden i sar., 2004a).

*FokI* polimorfizam dosta je proučavan u studijama asocijacije sa različitim kancerima. Značajno veća učestalost alela f *FokI* polimorfizma javlja se kod kancera dojke, prostate, kože, kolorektalnog i ovarijalnog kancera i različitih melanoma (Kostner i sar., 2009; Denzer i sar., 2011). Osim ovih ispitivanja, pokazano je da *FokI* polimorfizam ima značajan uticaj na imunološki sistem koji je mnogo aktivniji kod nosioca F alela (Van Etten i sar., 2007). Pokazano je da osobe sa HIV infekcijom imaju značajno bržu progresiju bolesti ukoliko su nosioci Ff genotipa *FokI* polimorfizma (Nieto i sar., 2004). Takođe je uočeno i postojanje asocijacije F alela sa razvojem autoimunskih oboljenja, kao što je Gravesova bolest i Hašimoto sindrom (Đurović i sar., 2015; Lin i sar., 2006). Iako dovodi do povećanog rizika za neka stanja, F alel u nekim situacijama može imati i protektivnu ulogu. Ispitivanje njegove veze sa aplastičnom anemijom pokazala su

da FF nosioci imaju blaži oblik bolesti i bolji odgovor na terapiju od ff nosioca (Yu i sar., 2016), a uočena je i protektivna uloga F alela u nastanku melanoma (Denzer i sar., 2011).

#### 1.3.4.2. BsmI rs1544410- ApaI rs7975232- TaqI rs731236

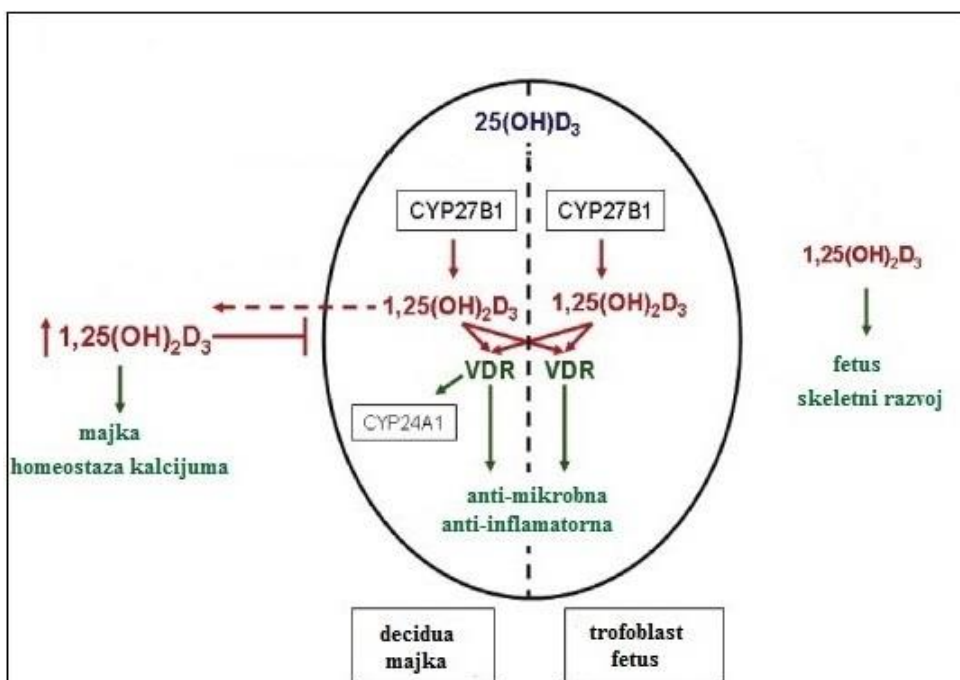
Za razliku od FokI polimorfizma, ostali proučavani polimorfizmi u ovom genu nemaju uticaj ni na nivo njegove ekspresije, niti na aktivnost samog VDR receptora, ali je u brojnim studijama pokazana njihova asocijacija sa različitim bolestima. Pojava ove asocijacije objašnjava se vezanošću ovih polimorfizama kako sa nekim, još uvek neidentifikovanim, funkcionalno važnim alelskim mestima unutar samog *VDR* gena, tako i sa polimorfizmima u nekim susednim genima na istom hromozomu, koji mogu imati funkcionalnu ulogu u ispoljavanju tih bolesti (Jurutka i sar., 2001). Polimorfizmi BsmI, ApaI i TaqI se nalaze blizu 3' kraja *VDR* gena (Slika 12). Izmene na ovim pozicijama ne dovode do promene u kodirajućoj sekvenci, pa samim tim ni do strukturnih modifikacija u receptoru, ali neki autori sugerišu da mogu uticati na stabilnost iRNK zbog svoje lokacije u blizini 3' UTR regiona. Ovi regioni poznati su po tome što sadrže sekvence koje mogu dovesti do destabilizacije iRNK i uticati na nivo genske ekspresije. BsmI, ApaI i TaqI polimorfizmi su često opisivani u jakoj gametskoj neravnoteži vezanosti, a sugerisano je postojanje i LD sa drugim polimorfizmima koji mogu uticati na funkciju *VDR* gena, što može biti jedno od objašnjenja pokazane asocijacije sa različitim patologijama (Uitterlinden i sar., 2004a). Merenje LD-a opisuje asocijaciju alela susednih polimorfizama jedan sa drugim. Ovo praktično znači da analizom jednog polimorfizma može da se predvide susedni, koji su vezani sa njim, zbog male stope rekombinacija između njih tokom mejoze. Iako ovi polimorfizmi nisu funkcionalni, uočeno je postojanje jake veze sa poli(A) mikrosatelitskim ponovcima na 3' UTR kraju, što može uticati na stabilnost iRNK (Ingles i sar., 1997). Studije asocijacije ispitivale su vezu ovih polimorfizma sa telesnom težinom i gojaznošću

(engl. *Body Mass Index* - BMI), gustinom kostiju, insulinski zavisnim dijabetesom, autoimunskim bolestima, aplastičnom anemijom i mnogim drugim bolestima i stanjima (Al-Daghri i sar., 2014; Cooper i sar., 1996; Đurović i sar., 2015; McDermott i sar., 1997; Vasilopoulos i sar., 2013). Međutim, rezultati ispitivanja pojedinačnih polimorfizama u ovom lokusu nisu konzistentni. Kada je otkriveno postojanje jakog LD-a između ovih pozicija, istraživačke studije su se više okrenule ispitivanjima haplotipova BsmI-ApaI-TaqI kako bi objasnile postojanje veze ovih blokova sa nekim bolestima (Denzer i sar., 2011; Ye i sar., 2001; Yu i sar., 2016). BsmI polimorfizam nalazi se u nešto slabijoj neravnoteži vezanosti sa preostala dva polimorfizma, dok se ApaI i TaqI nalaze jače vezani. Pretpostavlja se da se polimorfizmi u *VDR* genu nalaze u LD-u i sa nekim drugim, funkcionalno važnim, alelskim mestima unutar *VDR* gena ili nekog drugog gena u blizini, i da na taj način imaju ulogu u ispoljavanju bolesti.

### 1.3.5. Vitamin D i reprodukcija

Vitamin D je asociran sa fertižnošću i reprodukcijom na različitim nivoima. Prve studije na modelu pacova pokazale su da postoji specifično vezivanje aktivne forme vitamina D,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , za VDR receptor u reproduktivnim tkivima, kao što su uterus i testisi, što je kasnije potvrđeno i kod ljudi (Liu i sar., 2012). Takođe je pokazano da su enzimi CYP27B1 i CYP24A1, kao i receptori VDR i RXR, eksprimirani i funkcionalni u humanoj placenti, što sugeriše biološku ulogu aktivnog 1,25-dihidroksivitamina D i lokalno (Diaz i sar., 2000; Tanamura i sar., 1995). Metabolizam vitamina D, kao i ključni regulatorni koraci u maternalnom, placentalnom i fetalnom sistemu prikazani su šematski na Slici 13. Konverzija pre-vitamina  $25(\text{OH})\text{D}_3$  u vitamin  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u bubrezima majke katalizovana je enzimom CYP27B1 koji povećava izmereni nivo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vitamina u toku trudnoće. Ekspresija ovog enzima dešava se i u fetalnim trofoblastima i u maternalnim decidualnim ćelijama (koje predstavljaju mesto kontakta za razmenu

između majke i fetusa) odmah na početku rane gestacije. Pokazano je da je sinteza ovog enzima u decidualnim ćelijama 8 puta veća u prvom trimestru, u odnosu na treći trimestar trudnoće sugerišući značajnu ulogu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vitamina u toku rane trudnoće (Christakos i sar., 2010). Međutim, prolazak kroz placentu nije tako lak. Prisustvo CYP27B1 enzima i VDR receptora i u maternalnoj i u fetalnoj komponenti placente sugeriše ekstra-renalnu sintezu vitamina D. Pretpostavljena funkcija dodatne placentalne sinteze  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  tokom trudnoće ima imunomodulatornu ulogu (Liu i Hewison, 2012).



**Slika 13. Vitamin D metabolizam i njegova uloga tokom trudnoće**  
(Liu i sar., 2012-preuzeto, modifikovano).

U humanim sinciotrofoblastima je pokazano da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stimuliše sekreciju estradiola (Barrera i sar., 2007), a da on ima ulogu u angiogenezi i prokrvljenosti placente (Albrecht i sar., 1990; 2010). Još uvek ne postoje precizni podaci koji govore o ulozi vitamina D u vaskularizaciji placente kod ljudi, ali je uočeno postojanje asocijacije između niske koncentracije vitamina  $25(\text{OH})\text{D}$  i slabije vazodilatatorne funkcije na nivou endotela (Ertek i sar., 2012). Takođe je pokazano

da je povećan maternalni nivo vitamina D asociran sa smanjenim rizikom poremećaja u vaskularizaciji placente, kod trudnoće u kojoj je plod muškog pola (Gernand i sar., 2013). Ovo ukazuje na moguću protektivnu ulogu maternalnog nivoa vitamina D u fetalnoj restrikciji rasta, kod dečaka, ali ne i kod devojčica, što potvrđuje hipotezu da postoji razlika u odgovoru na maternalni nutritivni status, uključujući i vitamin D, u odnosu na pol ploda (Gernand i sar., 2013). Još jedna komponenta vaskularne funkcije placente, koja potencijalno može da bude pod uticajem vitamina D, je angiogeneza. *In vitro* studija (Grundmann i sar., 2012) je pokazala da vitamin D poboljšava angiogena svojstva proliferativnih ćelija endotela i da 1,25(OH)<sub>2</sub>D povećava sekreciju vaskularnog endotelnog faktora rasta u fibroblastima (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF), direktno kroz aktivaciju promotora VEGF i indukciju genske ekspresije (Levine i Teegarden., 2004). Takođe je pokazana i visoka prevalenca deficijencije ovog vitamina kod infertilnih žena u postupku asistiranе reprodukcije, podržavajući hipotezu uloge vitamina D u implantaciji embriona i ranim fazama trudnoće (Pagliardini i sar., 2015).

## 1.4. Vitamin D i trombofilija

Serumski nivo vitamina D asociran je sa gojaznošću, insulinskom rezistencijom i metaboličkim sindromom (Ford i sar., 2009; Chiu i sar., 2004), što je bio motiv za ispitivanja asocijacije ovog vitamina sa rizikom za kardiovaskularne bolesti (Anderson i sar., 2010; Beveridge i sar., 2013). Nizak nivo vitamina D je asociran sa povećanim rizikom za kardiovaskularne bolesti, kao što su hipertenzija, arterijske koronarne bolesti i tromboembolizam (Modarresi-Ghazani i sar., 2016). Iako većina studija nije pokazala postojanje asocijacije između vitamina D i hipertenzije, dok je asocijacija sa trombozama još uvek nedovoljno istražena, uočena je visoka prevalenca pacijenata sa CVD koji imaju deficijenciju vitamina D, što otvara vrata daljim istraživanjima (Modarresi-Ghazani i sar., 2016). Novije *in vitro* studije sugerisale su da vitamin D može imati antitrombotičku aktivnost i moguću protektivnu ulogu u različitim kardiovaskularnim oboljenjima. Pokazana je inverzna asocijacija ovog vitamina sa nivoom homocisteina, što je sugerisalo njegovu protektivnu ulogu u CVD bolestima i trombotičkim stanjima (Glueck i sar., 2016; Saliba i sar., 2016), kao i moguću interakciju gena uključenih u metabolizam i biološku dostupnost vitamina D i *MTHFR* gena. Pored toga, sugerisano je postojanje potencijalne uloge vitamina D u regulaciji nivoa antitrombina, preko VDR. Pokazano je da VDR *knock out* miševi imaju značajno smanjenu ekspresiju ATIII gena u jetri, kao i da je oko 20% niži plazmatski nivo ATIII proteina kod *vdr*<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na kontrolnu grupu (Aihara i sar., 2004). Regulacija antitrombina od strane vitamina D može objasniti konfliktne rezultate u postojanju veze između vitamina D i tromboze. Nekoliko studija pokazalo je inverznu relaciju između serumskog 25(OH)D<sub>3</sub> i predispozicije za venski tromboembolizam i aterotrombotičke bolesti, dok novije studije sugerišu da vitamin D ipak ne igra značajnu ulogu u patogenezi venskih tromboza (Targher i sar., 2012; Brodin i sar., 2013). Takođe, velika studija sprovedena na evropskim

populacijama pokazala je da suplementacija vitaminom D ima zanemarljiv efekat na smanjivanje rizika za tromboze (Vučković i sar., 2015), ali je ipak ukazano na moguću redukciju rizika za idiopatski venski tromboembolizam kod žena koje su primale kalcijum i vitamin D suplementaciju (Blondon i sar., 2015). Jedan od mogućih mehanizama jeste i preko efekta vitamina D na imunski sistem. Čelije ovog sistema imaju značajnu ulogu u vaskularnim bolestima koju ostvaruju preko produkcije citokina i posledične imunomodulacije i inflamacije, kao jedne od glavnih faktora koji su važni u patofiziologiji srčanog zastoja i ateroskleroze (Beveridge i sar., 2013). Studija Toderici i saradnika (2016) je ukazala na postojanje novog elementa koji može imati ulogu u ovoj patogenezi. Ovom studijom identifikovane su tri genske mutacije (c.42-1087-1068dup, c.42-1060-1057dupTTGA, c.42-1056G>A) u intronu 1, korišćenjem *in silico* predikcije u JASPAR softveru, koje se nalaze u VDRE sekvenci *ATIII* gena kod pacijenata koji imaju antitrombin deficijenciju, podržavajući koncept regulatorne uloge vitamina D u transkripcionoj kontroli ovog gena. Ista studija pokazala je da se polimorfizam u intronu 1-rs2227589 (Toderici i sar., 2016), koji je analiziran i u našoj studiji, ne nalazi u VDRE elementu *ATIII* gena. Genetičke varijante u VDRE sekvenci *ATIII* gena mogu pogoršati stanje deficijencije vitamina D. Jedno od mogućih objašnjenja je da deficijencija vitamina D može da dovede do povećanog rizika za tromboze kod osoba koje su nosioci specifičnih mutacija ili funkcionalnih polimorfizama u VDRE sekvencama različitih gena, kao i u VDR i RXR elementima koji su uključeni u metabolizam i aktivaciju vitamina D (Toderici i sar., 2016).



## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Rezultati ispitivanja pojedinačnih polimorfizama u genima za trombofiliju, i njihova asocijacija sa određenim patološkim stanjem, dosta su kontroverzni. Kako je put koagulacije veoma kompleksan, sa mnogobrojim faktorima koji učestvuju u uspostavljanju hemostatske ravnoteže, jedan od ciljeva ovog rada bio je ispitivanje interakcije polimorfizama u genima asociranim sa trombofilijom i detekcija potencijalnih visokorizičnih genotipova za pojavu infertiliteta.

Pored koagulacije, novija istraživanja sugerišu da procesi u organizmu čoveka u kojima učestvuje vitamin D mogu takođe dovesti do pojave različitih oboljenja, od autoimunskih, preko malignih, do ginekoloških (Colonese i sar., 2015). Osim osnovne uloge u metabolizmu kalcijuma i fosfata, pokazana je i potencijalna uloga vitamina D u imunskom, kardiovaskularnom i reproduktivnom sistemu. Prisustvo receptora za vitamin D u reproduktivnim tkivima, kao i postojanje polimorfizama u genu za receptor za vitamin D, sugeriše njegov potencijalni značaj u reprodukciji. Pored toga, novije *in silico* prediktorne studije ukazale su na značaj VDR, RXR i VDRE elemenata u genima asociranim sa trombofilijom, kao i potencijalnim mutacijama koje mogu objasniti ulogu vitamina D u povećanom riziku za trombotička stanja (Toderici i sar., 2016). Na osnovu svega toga postavljene su sledeće radne hipoteze:

- Visokorizični aleli u genima asociranim sa trombofilijom (*FV* 1691 G>A, *FII* 20210 G>A, *MTHFR* 677 C>T, *MTHFR* 1298 A>C, *PAI-1* -675 4G/5G, *ATIII* 786 G>A, *ACE* I/D и *ITGB3* 1565 T>C), kao i polimorfizmi u vitamin D receptor genu (FokI, ApaI, TaqI i BsmI) asocirani su sa pojavom primarnog i sekundarnog idiopatskog infertiliteta.
- Interakcija između gena asociranih sa trombofilijom, *VDR* gena, kao i svih analiziranih gena zajedno, može dovesti do formiranja multilokusnih genotipova koji mogu predstavljati rizik za reproduktivni neuspeh.

- Postojanje specifičnih haplotipova na 3' kraju *VDR* gena (BsmI-ApaI-TaqI) asocirani su sa pojavom infertiliteta, primarnog i sekundarnog.

U cilju ispitivanja radnih hipoteza, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Ispitati učestalost etioloških faktora infertiliteta u ispitivanim grupama i postojanje eventualnih razlika između ispitivanih grupa.
2. Utvrditi učestalost genotipova i alela polimorfizama u genima za trombofiliju, ispitati razlike u distribuciji genotipova i alela između ispitivanih grupa i izračunati rizik za nastanak idiopatskog infertiliteta u odnosu na ispitivani polimorfizam.
3. Analizirati multilokusne interakcije u genima asociranim sa trombofilijom i utvrditi da li ove interakcije formiraju visokorizične genotipove za pojavu infertiliteta.
4. Utvrditi učestalost genotipova i alela polimorfizama u *VDR* genu, ispitati razlike u dobijenim distribucijama između analiziranih grupa i izračunati rizik za nastanak idiopatskog infertiliteta.
5. Ispitati postojanje haplotipskog bloka i LD-a između polimorfizama u *VDR* genu i utvrditi da li postoje razlike u distribuciji haplotipova između analiziranih grupa.
6. Analizirati multilokusne interakcije u *VDR* genu i ispitati moguće postojanje visokorizičnih genotipova za nastanak infertiliteta.
7. Ispitati multilokusne interakcije svih ispitivanih polimorfizama u genima asociranim sa trombofilijama i *VDR* genu i utvrditi postojanje visokorizičnih genotipova za nastanak idiopatskog infertiliteta.

# **3. MATERIYAL I METODE**

### 3.1. Ispitivane grupe

Ispitanici koji su uključeni u ovu studiju bili su intervjuisani putem pismenog standardizovanog medicinskog upitnika koji je sadržao pitanja o komplikacijama tokom trudnoće (tip infertiliteta, prethodne trudnoće, ponovljeni gubici ploda, intrauterina smrt ploda, broj neuspešnih procedura vantelesne oplodnje), trenutnom i prethodnom zdravstvenom stanju (pojavi tromboza, kardiovaskularnih oboljenja ili drugih bolesti kod ispitanika), porodičnoj anamnezi (koja je uključivala pitanja o postojanju kardiovaskularnih oboljenja, infertiliteta i komplikacija tokom trudnoće u porodici), kao i informacije o životnim navikama (pušenje i fizička aktivnost). Kriterijumi za isključivanje iz studije bili su: prisustvo stečene trombofilije (deficijencija proteina C, proteina S, antifosfolipidni sindrom i lupus antikoagulans), kao i prisustvo poznatih mogućih uzročnika infertiliteta (muški faktor, kongenitalne anomalije uterusa otkrivene ginekološkim pregledom i ultrazvučnom dijagnostikom, sindrom policističnih jajnika, endometrioza i drugi). Svi testirani ispitanici dali su potpisani informisani pristanak za uključivanje u studiju. Etički komitet Medicinskog fakulteta u Beogradu je na sednici održanoj 25. septembra 2013. godine odobrio sprovođenje ove studije (broj 29/IX-19).

U studiju je uključeno 117 pacijenata ženskog pola sa idiopatskim infertilitetom, od kojih je 58 (49.57%) bilo sa primarnim, a 59 (50.43%) sa sekundarnim infertilitetom. Od žena sa sekundarnim infertilitetom 52 (88.14%) je imalo najmanje jedan spontani gubitak ploda, koji se kod 45 pacijentkinja dogodio u prvom trimestru trudnoće, dok se kod 7 od njih gubitak ploda dogodio u drugom trimestru. Od preostalih 7 (11.86%) pacijentkinja 5 je imalo biohemijski registrovanu trudnoću, jedna pacijentkinja je imala vanmateričnu trudnoću, a za jednu pacijentkinju nije bio dostupan podatak o vremenu gubitka ploda. Ispitanicama iz studijske grupe utvrđivani su biohemijski parametri hemostaze i antitela na stečenu trombofiliju, kako bi se selektovale osobe sa negativnim nalazom za stečenu trombofiliju.

Kontrolnu grupu činilo je 130 žena, sličnog geografskog porekla, koje imaju najmanje jedno rođeno dete bez komplikacija. Sve žene iz kontrolne grupe su bile sa negativnom ličnom anamnezom na tromboze i komplikacije pre, nakon ili u toku trudnoće.

### **3.2. Biološki uzorci i izolacija DNK**

Prikupljeni biološki uzorci pacijentkinja i kontrola bili su uzorci krvi (108 pacijentkinja, 30 kontrola) ili uzorci bukalne sluznice (9 pacijentkinja, 100 kontrola). Ispitanicama se uzimao uzorak pune krvi u vakuum epruvete sa EDTA, ukupne zapremine od 5ml. Za uzimanje bukalnog brisa koristio se plastični štapić (kolektor) kojim se nekoliko puta protrljala unutrašnja strana obraza. Iz prikupljenih uzoraka krvi i brisa izolovana je ukupna DNK za analizu, pomoću komercijalno dostupnog kita za neorgansku izolaciju (Qiagen, GmbH, Hilden, Nemačka).

### **3.3. Real Time PCR genotipizacija**

#### **3.3.1. Genotipizacija Real Time PCR metodom sa TaqMan probama**

Genotipizacija polimorfizama u genima za trombofiliju: *FV* 1691 G>A, *FII* 20210 G>A, *MTHFR* 677 C>T, *MTHFR* 1298 A>C, *PAI-1* -675 4G/5G, *ATIII* 786 G>A, *ACE* I/D i *ITGB3* 1565 T>C sprovedena je primenom metode lančane reakcije polimerizacije u realnom vremenu (engl. *Real Time PCR*) na Real-Time PCR ViiA7 instrumentu (Applied Biosystems, SAD). Za sve navedene polimorfizme, osim *PAI-1* 4G/5G, korišćeni su komercijalno dostupni eseji (TaqMan SNPs Genotyping Assay, Applied Biosystems, SAD), sa razblaženjima 40x za prajmere i probe i 2x za reakcioni rastvor (Universal TaqMan Master Mix, Applied Biosystems, SAD). Detalji o polimorfizmima analiziranim ovom metodom prikazane su u Tabeli 3. Polimorfizam *PAI-1* 4G/5G analiziran je primenom specifično dizajniranih prajmera i proba čije su sekvence navedene u Tabeli 4 (de Haas i sar., 2010). Pre

reakcije genotipizacije, rađena je kvantifikacija izolovane DNK sa komercijalno dostupnim prajmerima i TaqMan probom za hTERT (humana telomerazna reverzna transkriptaza) (Applied Biosystems, SAD), po istom protokolu kao i navedeni SNP polimorfizmi. Za reakcije genotipizacije je korišćena koncentracija DNK između 20 i 50 ng/ $\mu$ l u ukupnom volumenu reakcionog rastvora.

**Tabela 3. Genske pozicije i tipovi polimorfizama koji su analizirani TaqMan Assay-om.**

Gen	Polimorfizam	HGVS nomenklatura	rs broj	ID TaqMan Assay
<i>FV</i>	1691 G>A	NM_000130.4:c.1601G>A	rs6025	C__11975250_10
<i>FII</i>	20210 G>A	NM_000506.4:c.*97G>A	rs1799963	C___8726802_20
<i>MTHFR</i>	677 C>T	NM_001330358.1:c.788C>T	rs1801133	C___1202883_20
	1298 A>C	NM_001330358.1:c.1409A>C	rs1801131	C___850486_20
<i>ATIII</i>	786 G>A	NM_000488.3:c.41+141G>A	rs2227589	C__16180170_20
<i>ITGB3</i>	1565 T>C	NM_000212.2:c.176T>C	rs5918	C___818008_30

HGVS-engl. *Human Gene Variants Society*

Komercijalno dizajniran kit za TaqMan genotipizaciju sastojao se od *uzvodnog* (engl. *Forward* - F) i *nizvodnog* (engl. *Reverse* - R) prajmera i dve TaqMan probe koje su komplementarne sa ciljnom sekvencom u kojoj se nalazi SNP od interesa. TaqMan probe su na svom 5' kraju obeležene fluorescentnom bojom (FAM ili VIC) čije se oslobađanje i posledična fluorescencija prati u realnom vremenu. Različito obeležene TaqMan probe koje se koriste za detekciju tačkastih varijanti razlikuju se samo u jednom nukleotidu, u odnosu na to da li je sekvenca komplementarna divljem (wt) ili varijantnom alelu (mut). U intaktnom stanju probe ne fluoresciraju zato što se na 3' kraj probe nalazi „prigušivač“ (engl. *Quencher*) koji inhibira emitovanje fluorescentnog signala preko transfera energije fluorescentnom rezonancijom (engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer* - FRET). Kod ovog tipa fluorescencije, dva molekula koja su udaljena ne više od 10 nanometara, mogu da prenesu energiju bez zračenja, odnosno putem rezonancije. Energija fluorescencije sa fluorescentne hromofore se prebacije na prigušivač, ukoliko su i prigušivač i hromofora na bliskom rastojanju (na primer na istoj kratkoj probi). Hidroliza probe

razdvaja ove molekule, tako da se fluorescencija sa hromofore može detektovati. Nakon hibridizacije prajmera i probe sa ciljnom sekvencom, Taq polimeraza vrši ekstenziju i istovremeno hidrolizuje komplementarnu TaqMan probu sa 5' kraja, čime se fluorescentna boja oslobađa od *prigušivača* i emituje se fluorescencija u reakcionom rastvoru. Kod homozigotnog genotipa (bilo wt ili varijantnog) instrument detektuje samo jednu boju, dok će prisustvo heterozigota pokazivati obe fluorescentne boje (Brajušković, 2012). Alel-specifične fluorescentne krive detektovane su i analizirane uz pomoć QuantStudio Real Time PCR softvera, v. 3.2 (Applied Biosystems, SAD).

**Tabela 4. Sekvence uzvodnog (F) i nizvodnog (R) prajmera za ACE i PAI-1 polimorfizam.**

Gen	Polimorfizam	HGVS nomenklatura	Sekvence uzvodnog (F) i nizvodnog (R) prajmera
PAI-1	-675 4G/5G (rs1799889)	NM_000602.4:c.-816A>G	F:5'GCCAGACAAGGTTGTTGACACA 3' R:5' GCCGCCTCCGATGATACA 3'
			Sekvence TaqMan proba
			5' VIC-TCCCCACGTGTCCA-MGB 3' 5' FAM-CTCCCCCA CGTGTC-MGB 3'
ACE	I/D (rs1799752)	NM_000789.3:c.2306-119_2306-118insATACAGTCACTTTTTTT	F:5' CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT 3' R:5'GATGTGGCCATCACATTGTCAGAT 3'

HGVS-engl. *Human Gene Variants Society*



### 3.3.2. Genotipizacija HRM metodom

Rezultati za ACE I/D polimorfizam dobijeni su primenom HRM (engl. *High Resolution Melting* - HRM) PCR metode koja je razvijena i validirana u našoj laboratoriji (engl. *in house*). U reakciji je korišćen HRM Master Mix (Thermo Fisher Scientific, SAD) u totalnom volumenu reakcije od 20 $\mu$ L, dok je finalna koncentracija prajmera u reakciji iznosila po 0.45 $\mu$ M. Sekvence prajmera prikazane su u Tabeli 4 (preuzete iz Munhoz i sar., 2005). PCR amplifikacija i utvrđivanje krive topljenja amplikona rađeni su na ViiA 7 Real Time instrumentu (Applied Biosystems, SAD), a rezultati su analizirani korišćenjem QuantStudio Real Time PCR softvera, v. 3.2 (Applied Biosystems, SAD). Nakon 40 ciklusa amplifikacije (15 sekundi denaturacije na 95°C i 1 minut hibridizacije i ekstenzije prajmera na 62°C), dobijeni PCR produkti su denaturisani 10 sekundi na 95°C, zatim hibridizovani 1 minut na 62°C, nakon čega je rađen korak topljenja fragmenata na temperaturama od 62°C do 95°C, sa brzinom promene od 0.02°C/sekundi. Profili topljenja su analizirani korišćenjem HRM Softver Modula za ViiA7 System (Applied Biosystems, SAD), koji nam omogućava razlikovanje ACE genotipova (D ili I) na osnovu oblika krive topljenja i vrednosti tačke topljenja amplikona ( $T_m$  vrednost). Dobijeni genotipovi su provereni na podgrupi od 20 uzoraka, elektroforezom na gelu, pri čemu su dobijeni rezultati bili 100% konzistentni sa rezultatima HRM analize.

### 3.4. Genotipizacija RFLP metodom

Polimorfizmi u genu za receptor za vitamin D: FokI (rs2228570; NM\_000376.2:c.2T>C), BsmI (rs1544410; NM\_000376.2:c.1024+283G>A), ApaI (rs7975232; NM\_000376.2:c.1025-49G>T) i TaqI (rs731236; NM\_000376.2:c.1056T>C) tipizirani su analizom polimorfizama dužine restrikcioni fragmenta (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphisms* - RFLP). Segmenti DNK koji sadrže analizirane polimorfizme umnožavani su primenom PCR reakcije, korišćenjem Green Taq Master Mixa (Thermo Fisher Scientific, SAD) sa odgovarajućim uzvodnim i nizvodnim prajmerima (sekvence prajmera date su u Tabeli 5) u ekvimolarnoj koncentraciji od po 0.2 $\mu$ M, po sledećem termalnom profilu: 95°C - 3min, 10 ciklusa: 95°C-30sek, 65°C-30sek, 72°C -1min, 30 ciklusa: 95°C-30sek, 60°C-30sek i 72°C-1min, finalna elongacija 72°C-5min. Nakon dobijanja PCR produkta, ampliconi su digerirani pomoću odgovarajućih restrikcioni enzima: FokI, BsmI, ApaI i TaqI (New England Biolabs, SAD). Digestija za sva 4 analizirana polimorfizma vršena je preko noći, na optimalnoj temperaturi specifičnoj za svaki od primenjenih enzima: FokI na 25°C, ApaI na 37°C, a TaqI i BsmI na 65°C. Nakon završene digestije, restrikcioni fragmenti su analizirani na 2% agaroznom gelu bojenom etidijum bromidom. Elektroforeza se odvijala u 0.5xTBE puferu, pri konstantnom naponu od 200V, u trajanju od 30min. Gel je analiziran pod UV svetlošću transiluminatora (Vilber Lourmat, Francuska). Za utvrđivanje dužine restrikcioni fragmenta korišćen je Lonza 100bp DNA ladder (Lonza, SAD). Malim slovima (početno slovo naziva restrikcioni enzima) obeležavano je prisustvo restrikcioni mesta, dok je velikim slovima označavano odsustvo restrikcioni mesta u datom polimorfizmu. Informacije o analiziranim polimorfizmima, kao i dužinama restrikcioni fragmenta date su u Tabeli 5

Tabela 5. Detalji o polimorfizmima analiziranih RFLP metodom.

Gen	Polimorfizam	Pozicija	Sekvence uzvodnog (F) i nizvodnog (R) prajmera	Enzim	Restrikciono mesto	Produkt
<b>VDR</b>	rs2228570 T/C ili f/F	Egzon 2 +27823	F: 5' <i>GATGCCAGCTGGCCCTGGCACTG3'</i> R: 5' <i>ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC3'</i>	FokI	5'...GGATG(N) <sub>9</sub> ↓...3' 5'...GGATG(N) <sub>9</sub> ↑...3'	T (f): 198bp+75bp C (F): 273bp
	rs1544410 G/A ili b/B	Intron 8	F: 5' <i>CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA3'</i> R: 5' <i>AACCAGCGGAAGAGGTCAAGGG3'</i>	BsmI	5'...GAATGCN↓...3' 5'...CTTAC↑GN...3'	G (b): 648bp+175bp A (B): 823bp
	rs7975232 G/T ili a/A	Intron 8 +61888	F: 5' <i>AGAGCATGGACAGGGAGCAAG3'</i> R: 5' <i>GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTCA3'</i>	ApaI	5'...GGGCC↓C...3' 5'...C↑CCGGG...3'	G (a): 831bp+245bp T (A): 745bp
	rs731236 T/C ili T/t	Egzon 9 +61938		TaqI	5'...T↓CGA...3' 5'...AGC↑T...3'	T (T): 496bp+249bp C(t): 293bp+251bp+201bp

### 3.5. Statistička analiza

Za analizu distribucije učestalosti, kako genotipova tako i alela, korišćen je SPSS statistički program (v. 17.0 IBS SPSS Inc., SAD). Tablice kontigencije su analizirane primenom hi-kvadrat testa ( $\chi^2$ ), a u slučaju kada su dobijene učestalosti bile manje od 5% korišćen je Fišerov egzaktni test.

Rizik koji nosi određeni alel ili genotip za pojavu praćenog stanja (infertiliteta posmatranog kao jedinstven klinički entitet, odnosno primarnog ili sekundarnog infertiliteta, posmatranih zasebno) procenjivao se primenom logističke regresione analize, kojom je računat odnos šansi (engl. *Odds Ratio* - OR) sa intervalom poverenja (engl. *Confidance Interval* - CI) od 95%, korišćenjem statističkog paketa SPSS v. 17.0. Ukoliko su p vrednosti iznosile  $\leq 0.05$ , razlike su smatrane statistički značajnim. Regresiona analiza je metoda pomoću koje se analizira povezanost između zavisnih i nezavisnih promenljivih. Posebna forma regresione analize je logistička regresija koja se koristi kada zavisna varijabla može da uzima samo dve vrednosti (ređe više od dve), dok nezavisne promenljive mogu biti numeričke, kategorijalne ili njihova kombinacija. Zbog prirode zavisne promenljive, logistički regresioni model se naziva i binarni logistički regresioni model. Zavisna promenljiva se kodira tako što se jednom ishodu dodeljuje 1, a drugom 0. Da bi se dobio logistički regresioni model, potrebno je izvršiti određenu transformaciju zavisne promenljive, koja se naziva logit transformacija. Logit transformacija predstavlja prirodni logaritam unakrsnog odnosa varijabli. Unakrsni odnos ili odnos šansi daje meru povezanosti nezavisne promenljive sa ishodom od interesa. Šansa je odnos verovatnoća da se događaj desi prema verovatnoći da se događaj ne desi. Ukoliko je  $OR=1$ , ni jedna od grupa nema niti veću niti manju šansu za ostvarivanje ishoda. Ukoliko je OR veći od 1 to znači da ako se ta prediktorska varijabla poveća, rizik da binarna varijabla dobije vrednost 1 se takođe povećava. Ako je OR manje od 1 to znači da ako se ta prediktorska varijabla povećava

smanjuje se rizik da binarna varijabla dobije vrednost 1 (Peng et al, 2002; Sperandei, 2014).

Interakcija gena, odnosno ispitivanih polimorfizama, identifikovana je korišćenjem analize generalizovane multifaktorske redukcije dimenzionalnosti (engl. *Generalized Multifactor Dimensionality Reduction - GMDR*) (GMDR softver, v. 0.9). Ovaj neparametarski statistički pristup omogućava otkrivanje i opisivanje nelinearnih interakcija između diskretnih genetičkih faktora i sredinskih faktora, kako onih sa diskretnom, tako i onih sa kontinualnom distribucijom. Najbolji model odabran je prema parametrima CVC (engl. *Cross Validation Consistency*), TrBA (engl. *Training Balanced Accuracy*), TeBA (engl. *Testing Balanced Accuracy*) i p vrednosti. Vrednosti  $p \leq 0.05$  smatrane su statistički značajne. TrBA predstavlja preciznost „učenja“ programskog procesa na osnovu naših parametara (u ovom slučaju ispitivanih polimorfizama prisutnih kod osoba u različitim grupama), dok TeBA predstavlja preciznost testiranog procesa na osnovu prethodno „naučenog“ modela. Naime, ovaj statistički model najpre za svaku kombinaciju genotipova (na svakom nivou, tj. uzimajući u obzir dva lokusa, tri lokusa itd.) procenjuje rizik na osnovu toga da li se takva kombinacija češće javlja u grupi pacijentkinja ili u kontrolnoj grupi. Na taj način se više dimenzija (pri čemu je broj dimenzija određen brojem ispitivanih lokusa) svodi na jednu dimenziju (kombinaciju stanja na lokusima koji su definisani modelom). Ova selekcija rizičnih genotipova se ne obavlja na čitavom uzorku, već se čitav uzorak nasumično deli u deset grupa, a „učenje“ se obavlja na delu uzorka koji se sastoji od devet desetina celokupnog ispitivanog uzorka. Tokom učenja, odabira se onaj model (kombinacija genotipova) koji najmanje „greši“, odnosno koji u najvećem broju slučajeva klasifikuje jedinke u odgovarajuću grupu. Ukoliko se rizični genotip zaista otkrije kod pacijentkinje, rezultat za tu osobu se definiše kao „pravi pozitivni“, a ukoliko je pronađen u kontrolnoj grupi- kao „lažno pozitivni“. Preciznost modela (kako tokom „učenja“

tako i prilikom primene „naučenog“) predstavlja prosečnu vrednost senzitivnosti i specifičnosti ( $((\text{senzitivnost} + \text{specifičnost}) / 2)$ ), pri čemu je senzitivnost = pravi pozitivni / (pravi pozitivni + lažno pozitivni), dok je specifičnost = pravi negativni / (lažno pozitivni + pravi negativni). Oba parametra (balansirana preciznost učenja, engl. *Training Balanced Accuracy* i balansirana preciznost testiranja naučenog, engl. *Testing Balanced Accuracy*) mogu da imaju vrednosti od 0 do 1, pri čemu program „bira“ modele koji su uspešnji u predikciji kombinacije genotipova koji leže u osnovi infertiliteta (tj. kod kojih su njihove vrednosti veće-bliže broju 1). Nakon procesa „učanja“, u svakoj od 10 podgrupa se testira validnost modela pronađenog, odnosno „naučenog“ tokom procesa učenja, tj. procenjuje se prediktivna sposobnost modela. Parametar CVC označava u kom je broju eksperimenata unakrsne validacije (od mogućih 10) ispitivani polimorfizam uključen u analizu. Što su rezultati unakrsne validacije konzistentniji, to je pronađeni model pouzdaniji u predikciji analiziranog stanja na osnovu kombinacije genotipova. Dakle, multilokusni genotipovi se ovom analizom kalasifikuju u visokorizične i niskorizične klase, čineći da se veći broj genotipova redukuje sa n-dimenzija na jednu dimenziju (Lou i sar., 2008; Chen i sar., 2011).

Za analizu haplotipova polimorfizama u VDR genu korišćen je kompjuterski program Haploview v. 4.2. kojim se identifikuju haplotipski blokovi i izračunavaju vrednosti neravnoteže vezanosti između ispitivanih polimorfizama. Haploview je dizajniran tako da, na osnovu dobijenih genotipova za ispitivane polimorfizme, omogućava sveobuhvatnu analizu haplotipova za različite veličine podataka, koja obuhvata informacije o LD-u, haplotipskim blokovima, kao i asocijaciju pojedinačnih markera uključenih u analizu. Haploview takođe omogućava računanje učestalosti haplotipova u analiziranim grupama nesrodnih osoba (u našem slučaju pacijenti i kontrole), primenom matematičkog EM (engl. *Expectation Maximisation*) algoritma. Za identifikaciju haplotipskih blokova korišćena je opcija

*Solid Spine*, jer je najfleksibilnija sa najslabijim uslovima čime se povećava šansa da se na relativno maloj studijskoj grupi identifikuje haplotipski blok. Zasniva se na kriterijumima da su prvi i poslednji SNP u jakom LD-u, dok se SNP-ovi između mogu nalaziti u slabom LD-u ili čak nisu međusobno u LD-u (Barret i sar., 2005; Fallin i Schork, 2000).

# 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA



Rezultati dobijeni ovom studijom predstavljeni su u 4 poglavlja. U prvom delu prikazana je analiza zastupljenosti različitih etioloških faktora kod ispitivanih grupa i postojanje razlike između grupa (4.1). Nakon toga navedeni su rezultati analize polimorfizama u genima asociranim sa trombofilijom (4.2.), učestalosti alela i genotipova pojedinačnih lokusa (4.2.1.), kao i multilokusne interakcije ovih polimorfizama (4.2.2.). Rezultati analize polimorfizama u VDR genu prikazani su u narednom poglavlju kao pojedinačno analiziranu lokusi (4.3.1.), multilokusne SNP-SNP interakcije (4.3.2.) i analiza haplotipova (4.3.3.). U poslednjem poglavlju prikazani su rezultati ispitivanja interakcija između svih analiziranih polimorfizama, u genima asociranim sa trombofilijom i u VDR genu (4.4.).

#### **4.1. Analiza zastupljenosti etioloških faktora kod ispitivanih grupa**

Analiza zastupljenosti etioloških faktora (pozitivna porodična anamneza, sport i pušenje) u ispitivanim grupama, za ispitanike čiji su podaci bili dostupni za ovu analizu, prikazani su u Tabeli 6. Statistički značajna veza pokazana je između pozitivne porodične anamneze i infertiliteta, i to kako primarnog tako i sekundarnog ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2$  test). Naime, 45% ispitanica (54.2% u grupi sa primarnim infertilitetom i 41.9% u grupi sa sekundarnim infertilitetom) prijavilo je prisustvo nekog od praćenih parametara (prisustvo kardiovaskularnih oboljenja, infertiliteta ili komplikacija u trudnoći) kod članova svojih porodica, za razliku od samo 4% žena u kontrolnoj grupi. Pozitivna porodična anamneza bila je prisutnija kod pacijentkinja sa primarnim infertilitetom u odnosu na pacijentkinje sa sekundarnim infertilitetom ali ova razlika nije dostigla statističku značajnost. Zastupljenost pušenja i bavljenja sportom kod ispitanika u analiziranim grupama je bila bez značajne razlike ( $p > 0.05$ ). U Tabeli 7 prikazan je izračunat rizik u odnosu na etiološki faktor kod ispitivanih grupa. Ova analiza je pokazala da prisustvo

nekog od elemenata pozitivne porodične anamneze povećava rizik za infertilitet čak 20 puta (95% CI 6.8-62.7), i to 28 puta za primarni infertilitet i 17 puta za sekundarni infertilitet.

**Tabela 6. Učestalost etioloških faktora i njihova razlika između ispitivanih grupa.**

Faktor		Kontrola n (%)	Pacijenti n (%)	Primarni n (%)	Sekundarni n (%)	Kont. vs Pacijenti p	Kont. vs Prim. p	Kont. vs Sek. p	Prim vs Sek. p
Porodična anamneza	Pozitivna	4 (4.0)	31 (46.3)	13 (54.2)	18 (41.9)	<b>&lt;0.001*</b>	<b>&lt;0.001*</b>	<b>&lt;0.001*</b>	0.333
	Negativna	96 (96.0)	36 (53.7)	11 (45.8)	25 (58.1)				
Sport	Da	19 (29.7)	23 (33.8)	7 (29.2)	16 (36.4)	0.61	0.962	0.466	0.549
	Ne	45 (70.3)	45 (66.2)	17 (70.8)	28 (63.6)				
Pušenje	Da	22 (32.4)	14 (21.9)	3 (14.3)	11 (25.6)	0.177	0.107	0.447	0.305
	Ne/bivši	46 (67.6)	50 (78.1)	18 (85.7)	32 (74.4)				

\*za statističku značajnost  $p \leq 0.05$ , Kont.-kontrola, Prim.-primarni, Sek.-sekundarni

**Tabela 7. Etiološki faktori i rizik za nastanak infertiliteta.**

Faktor	Kontrola vs Pacijenti		Kontrola vs Primarni		Kontrola vs Sekundarni	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Porodična anamneza	20.667 (6.814-62.679)	<b>&lt;0.001*</b>	28.364 (7.866-102.281)	<b>&lt;0.001*</b>	17.280 (5.366-55.642)	<b>&lt;0.001*</b>
Pušenje	0.585 (0.268-1.278)	0.179	0.348 (0.093-1.309)	0.119	0.716 (0.306-1.686)	0.448
Sport	1.211 (0.581-2.524)	0.610	0.975 (0.348-2.734)	0.962	1.353 (0.599-3.059)	0.467

\*za statističku značajnost  $p \leq 0.05$

## 4.2. Analiza polimorfizama asociranih sa trombofilijom

Analiza pojedinačnih lokusa, distribucija alela i genotipova rađena je u SPSS statističkom programu. Dobijene učestalosti bile su u saglasnosti sa učestalostima očekivanim iz Hardi Vajnbergove proporcije (engl. *Hardy-Weinberg Equilibrium - HWE*), za sve polimorfizame, osim za *FVL* i *FII 20210 G>A* u grupi pacijenata, *FII 20210 G>A* u podgrupi sa primarnim infertilitetom i u podgrupi sa sekundarnim infertilitetom *FVL* i *ITGB3 1565 T>C*. U kontrolnoj grupi odstupanje od očekivanih učestalosti uočeno je kod *MTHFR 1298 A>C* i *ACE I/D* polimorfizma (Tabela 8). Nakon Bonferoni aproksimacije, koja postavlja novu graničnu vrednost na  $p \leq 0.00156$ , samo je *FVL* ostao sa značajnim odstupanjem od HWE u ukupnoj grupi pacijenata i podgrupi sa sekundarnim infertilitetom ( $p < 0.00156$ ) (Tabela 8).

**Tabela 8. Dobijene i očekivane učestalosti genotipova za ispitivane polimorfizme u genima asociраним sa trombofilijom u kontrolnoj grupi i grupama pacijentkinja sa infertilitetom.**

Gen SNP	Genotip	Kontrole n (%) dobijeno	Kontrole n (%) očekivano	Pacijenti n (%) dobijeno	Pacijenti n (%) očekivano	Primarni n (%) dobijeno	Primarni n (%) očekivano	Sekundarni n (%) dobijeno	Sekundarni n (%) očekivano	
<b>FV</b> <b>1691 G&gt;A</b>	GG	126 (96.9)	126.0 (97.0)	108 (92.3)	106.3 (90.8)	52 (89.7)	51.2 (88.3)	56 (94.9)	55.1 (93.4)	
	GA	4 (3.1)	3.9 (3.0)	7 (6.0)	10.5 (9.0)	5 (8.6)	6.6 (11.4)	2 (3.4)	3.9 (6.6)	
	AA	0 (0.0)	0.0 (0.0)	2 (1.7)	0.3 (0.2)	1 (1.7)	0.2 (0.3)	1 (1.7)	0.01 (0.02)	
	HWE p	0.86		<0.001*		0.07		<0.001*		
<b>FII</b> <b>20210 G&gt;A</b>	GG	129 (99.2)	129.0 (99.2)	109 (93.2)	108.2 (92.5)	53 (91.4)	52.2 (90.0)	56 (94.9)	56.0 (94.9)	
	GA	1 (0.8)	1.0 (0.8)	7 (6.0)	8.7 (7.4)	4 (6.9)	5.7 (9.8)	3 (5.1)	2.9 (4.9)	
	AA	0 (0.0)	0.0 (0.0)	1 (0.8)	0.2 (0.1)	1 (1.7)	0.2 (0.3)	0 (0.0)	0.0 (0.0)	
	HWE p	0.96		0.04*		0.02*		0.84		
<b>MTHFR</b>	<b>677 C&gt;T</b>	CC	51 (39.2)	53.63 (41.2)	50 (42.7)	49.4 (42.2)	25 (43.1)	25.6 (44.1)	25 (42.4)	23.8 (40.3)
		CT	65 (50.0)	59.73 (46.0)	52 (44.4)	53.3 (45.5)	27 (46.6)	25.9 (44.7)	25 (42.4)	27.3 (46.3)
		TT	14 (10.8)	16.63 (12.8)	15 (12.8)	14.4 (12.3)	6 (10.3)	6.6 (11.4)	9 (15.2)	7.8 (13.2)
		HWE p	0.31		0.80		0.74		0.51	
	<b>1298 A&gt;C</b>	AA	59 (45.4)	53.6 (41.2)	46 (39.3)	48.7 (41.6)	24 (41.4)	24.9 (42.9)	22 (37.3)	23.8 (40.3)
		AC	49 (37.7)	59.7 (46.0)	59 (50.4)	53.6 (45.8)	28 (48.3)	26.2 (45.2)	31 (52.5)	27.3 (46.3)
		CC	22 (16.9)	16.6 (12.8)	12 (10.3)	14.7 (12.6)	6 (10.3)	6.9 (11.9)	6 (10.2)	7.8 (13.2)
		HWE p	0.04*		0.27		0.60		0.30	
<b>PAI-1</b> <b>-675 4G/5G</b>	5G5G	20 (15.4)	20.8 (16.0)	22 (18.8)	19.3 (16.5)	13 (22.4)	10.3 (11.8)	9 (15.2)	9.0 (15.3)	
	5G4G	64 (49.2)	62.4 (48.0)	51 (43.6)	56.4 (48.2)	23 (39.7)	28.3 (48.8)	28 (47.5)	28.1 (47.6)	
	4G4G	46 (35.4)	46.8 (36.0)	44 (37.6)	41.3 (35.3)	22 (37.9)	19.3 (33.3)	22 (37.3)	22.0 (37.3)	
	HWE p	0.77		0.30		0.15		0.95		
<b>ATIII</b> <b>786 G&gt;A</b>	GG	107 (82.3)	106.2 (81.7)	95 (81.2)	96.0 (82.1)	43 (74.1)	44.2 (76.2)	52 (88.1)	52.2 (88.5)	
	GA	21 (16.2)	22.6 (17.4)	22 (18.8)	19.9 (17.0)	15 (25.9)	13.1 (22.6)	7 (11.9)	6.6 (11.2)	
	AA	2 (1.5)	1.2 (0.9)	0 (0.0)	1.0 (0.9)	0 (0.0)	1.0 (1.7)	0 (0.0)	0.2 (0.3)	
	HWE p	0.42		0.26		0.26		0.63		
<b>ACE</b> <b>I/D</b>	II	30 (23.1)	22.4 (17.2)	23 (19.7)	18.89 (16.1)	11 (19.0)	8.0 (13.8)	12 (20.3)	11.0 (18.6)	
	ID	48 (36.9)	63.1 (48.6)	48 (41.0)	56.2 (48.1)	21 (36.2)	27.1 (46.7)	27 (45.8)	29.0 (49.2)	
	DD	52 (40.0)	44.4 (34.2)	46 (39.3)	41.9 (35.8)	26 (44.8)	23.0 (39.7)	20 (33.9)	19.0 (32.2)	
	HWE p	0.006*		0.11		0.09		0.60		
<b>ITGB3</b> <b>1565 T&gt;C</b>	TT	89 (68.5)	88.89 (68.4)	87 (74.4)	84.6 (72.3)	41 (70.7)	40.6 (70.0)	46 (78.0)	44.1 (74.7)	
	TC	37 (28.5)	37.21 (28.6)	25 (21.4)	29.8 (25.4)	15 (25.9)	15.9 (27.4)	10 (16.9)	13.8 (23.4)	
	CC	4 (3.1)	3.89 (3.0)	5 (4.3)	2.6 (2.2)	2 (3.4)	1.6 (2.8)	3 (5.1)	1.1 (1.9)	
	HWE p	0.95		0.08		0.67		0.03*		

\*za statističku značajnost  $p \leq 0.05$

#### 4.2.1. Pojedinačno analizirani polimorfizmi asocirani sa trombofilijom

Rezultati analize učestalosti alela i genotipova u genima asociranim sa trombofilijom prikazani su u Tabeli 9 i Tabeli 10, respektivno. U ispitivanom polimorfizmu *FV* 1691 G>A uočena je statistički značajna razlika u učestalosti visokorizičnog alela između kontrolne i grupe infertilnih pacijentkinja (1.5% vs. 4.7%,  $p=0.036$ , Fišerov test), kao i između kontrolne i podgrupe pacijentkinja sa primarnim infertilitetom (1.5% vs. 6%,  $p=0.023$ , Fišerov test). Uočeno je povećanje učestalosti visokorizičnog alela 1691A kod podgrupe sa sekundarnim infertilitetom u odnosu na kontrolnu grupu (3.4% vs. 1.5%,  $p=0.215$ , Fišerov test), kao i razlika u učestalosti alela A između podgrupe sa primarnim i podgrupe sa sekundarnim infertilitetom (6.0% vs. 3.4%,  $p=0.373$ , Fišerov test). Analiza distribucije *FVL* genotipova (Tabela 10) pokazala je veću učestalost heterozigotnog i homozigotnog genotipa za mutaciju u grupi pacijentkinja nego u kontrolnoj grupi koja nije dostigla statistički značajnu razliku ( $p>0.05$ ,  $\chi^2$  test).

Sličan obrazac razlika između ispitivanih grupa uočen je i kod rezultata analize polimorfizma *FII* 20210 G>A. Ova analiza je pokazala da postoji statistički značajno veća učestalost visokorizičnog alela u ukupnoj grupi pacijenata (3.8%,  $p=0.0064$ , Fišerov test), kao i u podgrupi sa primarnim infertilitetom (5.2%,  $p=0.0041$ , Fišerov test), u odnosu na kontrolnu grupu (0.4%). U podgrupi pacijenata sa sekundarnim infertilitetom (2.5%) u odnosu na kontrolu (0.4%) povećanje učestalosti visokorizičnog alela nije dostiglo statističku značajnost ( $p>0.05$ ,  $\chi^2$  test i Fišerov test), dok u odnosu na primarni infertilitet nije bilo značajne razlike između dve podgrupe. Razlike u učestalostima genotipova između kontrolne grupe i ukupne grupe pacijenata, kao i između kontrolne grupe i podgrupe pacijenata sa primarnim infertilitetom, bile su značajne ( $p=0.038$ , odnosno  $p=0.017$ ,  $\chi^2$  test).

U drugim ispitivanim polimorfizmima asociranim sa trombofilijom (*MTHFR* 677 C>T i 1298 A>C, *ATIII* G>A, *PAI-1* 4G/5G, *ACE* I/D i *ITGB3* T>C) nije uočena statistički značajna razlika u učestalostima alela i genotipova između analiziranih grupa ( $p > 0.05$ ,  $\chi^2$  test) (Tabele 9 i 10).

Analizom polimorfizama u *MTHFR* genu nije pronađena osoba koja bi imala diplotipsku kombinaciju TT/CC na ova dva blisko postavljena lokusa. Naime, u ovom genu utvrđene su samo tri kombinacije alela za ove dve pozicije: 677C/1298A, 677C/1298C i 677T/1298A, dok su retki rekombinanti 677T/1298C isključeni, najverovatnije selekcijom. Ova tri haplotipa, čije su učestalosti prikazane u Tabeli 9, definišu ukupno šest mogućih diplotipova, sa učestalostima prikazanim u Tabeli 10. Najučestaliji diplotip u kontrolnoj grupi bio je CT/AA sa 26.2%, dok je u celokupnoj grupi pacijenata, kao i u podgrupi sa primarnim infertilitetom, najučestaliji bio diplotip CC/AC sa 25.6% i 25.9%, respektivno. U podgrupi pacijentkinja sa sekundarnim infertilitetom, najučestaliji diplotip bio je CT/AC sa 27.1%. Distribucije dobijenih diplotipova analizirane su  $\chi^2$  testom koji je pokazao da nema značajne razlike između analiziranih grupa ( $p > 0.05$ ).

**Tabela 9. Učestalost alela ispitivanih polimorfizama asociranih sa trombofilijom u kontrolnoj grupi, u grupi pacijenata sa infertilitetom, kao i u podgrupama sa primarnim i sekundarnim infertilitetom.**

Gen SNP	Alel	Kontrola n (%)	Pacijenti n (%)	Primarni n (%)	Sekundarni n (%)	Kontrola vs. Pacijenti p	Kontrola vs. Primarni p	Kontrola vs. Sekundarni p																																																																																																																	
<i>FV</i> 1691 G>A	G	256 (98.5)	223 (95.3)	109 (94.0)	114 (96.6)	<b>0.036*</b> <sup>1</sup>	<b>0.024*</b> <sup>1</sup>	0.215 <sup>1</sup>																																																																																																																	
	A	4 (1.5)	11 (4.7)	7 (6.0)	4 (3.4)				<i>FII</i> 20210 G>A	G	259 (99.6)	225 (93.2)	110 (94.8)	115 (97.5)	<b>0.006*</b> <sup>1</sup>	<b>0.004*</b> <sup>1</sup>	0.092 <sup>1</sup>	A	1 (0.4)	9 (3.8)	6 (5.2)	3 (2.5)	<i>MTHFR</i> 677 C>T	C	167 (64.2)	152 (65.0)	77 (66.4)	75 (63.6)	0.866	0.687	0.900	T	93 (35.8)	82 (35.0)	39 (33.6)	43 (36.4)	<i>MTHFR</i> 1298 A>C	A	167 (64.2)	151 (64.5)	76 (65.5)	75 (63.4)	0.945	0.810	0.900	C	93 (35.8)	83 (35.5)	40 (34.5)	43 (36.4)	<i>MTHFR</i> 677/1298	C/A	74 (28.4)	69 (29.5)	37 (31.9)	32 (27.1)	0.966	0.794	0.932	C/T	93 (35.8)	83 (35.5)	40 (34.5)	43 (36.45)	T/A	93 (35.8)	82 (35.0)	39 (33.6)	43 (36.45)	<i>PAI-1</i> -675 4G/5G	5G	104 (40.0)	95 (40.6)	49 (42.2)	46 (39.0)	0.865	0.662	0.874	4G	157 (60.0)	139 (59.4)	67 (57.8)	72 (61.0)	<i>ATIII</i> 786 G>A	G	235 (90.4)	212 (90.6)	101 (87.1)	111 (94.1)	0.936	0.335	0.233	A	25 (9.6)	22 (9.4)	15 (12.9)	7 (5.9)	<i>ACE</i> VD	I	108 (41.54)	94 (40.2)	43 (37.1)	51 (43.2)	0.758	0.414	0.759	D	152 (58.46)	140 (59.8)	73 (62.9)	67 (56.8)	<i>ITGB3</i> 1565 T>C	T	215 (82.7)	199 (85.0)	97 (83.6)	102 (86.4)	0.479	0.825	0.359	C
<i>FII</i> 20210 G>A	G	259 (99.6)	225 (93.2)	110 (94.8)	115 (97.5)	<b>0.006*</b> <sup>1</sup>	<b>0.004*</b> <sup>1</sup>	0.092 <sup>1</sup>																																																																																																																	
	A	1 (0.4)	9 (3.8)	6 (5.2)	3 (2.5)				<i>MTHFR</i> 677 C>T	C	167 (64.2)	152 (65.0)	77 (66.4)	75 (63.6)	0.866	0.687	0.900	T	93 (35.8)	82 (35.0)	39 (33.6)	43 (36.4)	<i>MTHFR</i> 1298 A>C	A	167 (64.2)	151 (64.5)	76 (65.5)	75 (63.4)	0.945	0.810	0.900	C	93 (35.8)	83 (35.5)	40 (34.5)	43 (36.4)	<i>MTHFR</i> 677/1298	C/A	74 (28.4)	69 (29.5)	37 (31.9)	32 (27.1)	0.966	0.794	0.932	C/T	93 (35.8)	83 (35.5)	40 (34.5)	43 (36.45)		T/A	93 (35.8)	82 (35.0)	39 (33.6)	43 (36.45)				<i>PAI-1</i> -675 4G/5G	5G	104 (40.0)	95 (40.6)	49 (42.2)	46 (39.0)	0.865	0.662	0.874	4G	157 (60.0)	139 (59.4)	67 (57.8)	72 (61.0)	<i>ATIII</i> 786 G>A	G	235 (90.4)	212 (90.6)	101 (87.1)	111 (94.1)	0.936	0.335	0.233	A	25 (9.6)	22 (9.4)	15 (12.9)	7 (5.9)	<i>ACE</i> VD	I	108 (41.54)	94 (40.2)	43 (37.1)	51 (43.2)	0.758	0.414	0.759	D	152 (58.46)	140 (59.8)	73 (62.9)	67 (56.8)	<i>ITGB3</i> 1565 T>C	T	215 (82.7)	199 (85.0)	97 (83.6)	102 (86.4)	0.479	0.825	0.359	C	45 (17.3)	35 (15.0)	19 (16.4)	16 (13.6)						
<i>MTHFR</i> 677 C>T	C	167 (64.2)	152 (65.0)	77 (66.4)	75 (63.6)	0.866	0.687	0.900																																																																																																																	
	T	93 (35.8)	82 (35.0)	39 (33.6)	43 (36.4)				<i>MTHFR</i> 1298 A>C	A	167 (64.2)	151 (64.5)	76 (65.5)	75 (63.4)	0.945	0.810	0.900	C	93 (35.8)	83 (35.5)	40 (34.5)	43 (36.4)	<i>MTHFR</i> 677/1298	C/A	74 (28.4)	69 (29.5)	37 (31.9)	32 (27.1)	0.966	0.794	0.932	C/T	93 (35.8)	83 (35.5)	40 (34.5)	43 (36.45)		T/A	93 (35.8)	82 (35.0)	39 (33.6)	43 (36.45)				<i>PAI-1</i> -675 4G/5G	5G	104 (40.0)	95 (40.6)	49 (42.2)	46 (39.0)	0.865	0.662	0.874	4G	157 (60.0)	139 (59.4)	67 (57.8)	72 (61.0)	<i>ATIII</i> 786 G>A	G	235 (90.4)	212 (90.6)	101 (87.1)	111 (94.1)	0.936	0.335	0.233	A	25 (9.6)	22 (9.4)	15 (12.9)	7 (5.9)	<i>ACE</i> VD	I	108 (41.54)	94 (40.2)	43 (37.1)	51 (43.2)	0.758	0.414	0.759	D	152 (58.46)	140 (59.8)	73 (62.9)	67 (56.8)	<i>ITGB3</i> 1565 T>C	T	215 (82.7)	199 (85.0)	97 (83.6)	102 (86.4)	0.479	0.825	0.359	C	45 (17.3)	35 (15.0)	19 (16.4)	16 (13.6)																				
<i>MTHFR</i> 1298 A>C	A	167 (64.2)	151 (64.5)	76 (65.5)	75 (63.4)	0.945	0.810	0.900																																																																																																																	
	C	93 (35.8)	83 (35.5)	40 (34.5)	43 (36.4)				<i>MTHFR</i> 677/1298	C/A	74 (28.4)	69 (29.5)	37 (31.9)	32 (27.1)	0.966	0.794	0.932	C/T	93 (35.8)	83 (35.5)	40 (34.5)	43 (36.45)		T/A	93 (35.8)	82 (35.0)	39 (33.6)	43 (36.45)				<i>PAI-1</i> -675 4G/5G	5G	104 (40.0)	95 (40.6)	49 (42.2)	46 (39.0)	0.865	0.662	0.874	4G	157 (60.0)	139 (59.4)	67 (57.8)	72 (61.0)	<i>ATIII</i> 786 G>A	G	235 (90.4)	212 (90.6)	101 (87.1)	111 (94.1)	0.936	0.335	0.233	A	25 (9.6)	22 (9.4)	15 (12.9)	7 (5.9)	<i>ACE</i> VD	I	108 (41.54)	94 (40.2)	43 (37.1)	51 (43.2)	0.758	0.414	0.759	D	152 (58.46)	140 (59.8)	73 (62.9)	67 (56.8)	<i>ITGB3</i> 1565 T>C	T	215 (82.7)	199 (85.0)	97 (83.6)	102 (86.4)	0.479	0.825	0.359	C	45 (17.3)	35 (15.0)	19 (16.4)	16 (13.6)																																		
<i>MTHFR</i> 677/1298	C/A	74 (28.4)	69 (29.5)	37 (31.9)	32 (27.1)	0.966	0.794	0.932																																																																																																																	
	C/T	93 (35.8)	83 (35.5)	40 (34.5)	43 (36.45)																																																																																																																				
	T/A	93 (35.8)	82 (35.0)	39 (33.6)	43 (36.45)				<i>PAI-1</i> -675 4G/5G	5G	104 (40.0)	95 (40.6)	49 (42.2)	46 (39.0)	0.865	0.662	0.874	4G	157 (60.0)	139 (59.4)	67 (57.8)	72 (61.0)	<i>ATIII</i> 786 G>A	G	235 (90.4)	212 (90.6)	101 (87.1)	111 (94.1)	0.936	0.335	0.233	A	25 (9.6)	22 (9.4)	15 (12.9)	7 (5.9)	<i>ACE</i> VD	I	108 (41.54)	94 (40.2)	43 (37.1)	51 (43.2)	0.758	0.414	0.759	D	152 (58.46)	140 (59.8)	73 (62.9)	67 (56.8)	<i>ITGB3</i> 1565 T>C	T	215 (82.7)	199 (85.0)	97 (83.6)	102 (86.4)	0.479	0.825	0.359	C	45 (17.3)	35 (15.0)	19 (16.4)	16 (13.6)																																																									
<i>PAI-1</i> -675 4G/5G	5G	104 (40.0)	95 (40.6)	49 (42.2)	46 (39.0)	0.865	0.662	0.874																																																																																																																	
	4G	157 (60.0)	139 (59.4)	67 (57.8)	72 (61.0)				<i>ATIII</i> 786 G>A	G	235 (90.4)	212 (90.6)	101 (87.1)	111 (94.1)	0.936	0.335	0.233	A	25 (9.6)	22 (9.4)	15 (12.9)	7 (5.9)	<i>ACE</i> VD	I	108 (41.54)	94 (40.2)	43 (37.1)	51 (43.2)	0.758	0.414	0.759	D	152 (58.46)	140 (59.8)	73 (62.9)	67 (56.8)	<i>ITGB3</i> 1565 T>C	T	215 (82.7)	199 (85.0)	97 (83.6)	102 (86.4)	0.479	0.825	0.359	C	45 (17.3)	35 (15.0)	19 (16.4)	16 (13.6)																																																																							
<i>ATIII</i> 786 G>A	G	235 (90.4)	212 (90.6)	101 (87.1)	111 (94.1)	0.936	0.335	0.233																																																																																																																	
	A	25 (9.6)	22 (9.4)	15 (12.9)	7 (5.9)				<i>ACE</i> VD	I	108 (41.54)	94 (40.2)	43 (37.1)	51 (43.2)	0.758	0.414	0.759	D	152 (58.46)	140 (59.8)	73 (62.9)	67 (56.8)	<i>ITGB3</i> 1565 T>C	T	215 (82.7)	199 (85.0)	97 (83.6)	102 (86.4)	0.479	0.825	0.359	C	45 (17.3)	35 (15.0)	19 (16.4)	16 (13.6)																																																																																					
<i>ACE</i> VD	I	108 (41.54)	94 (40.2)	43 (37.1)	51 (43.2)	0.758	0.414	0.759																																																																																																																	
	D	152 (58.46)	140 (59.8)	73 (62.9)	67 (56.8)				<i>ITGB3</i> 1565 T>C	T	215 (82.7)	199 (85.0)	97 (83.6)	102 (86.4)	0.479	0.825	0.359	C	45 (17.3)	35 (15.0)	19 (16.4)	16 (13.6)																																																																																																			
<i>ITGB3</i> 1565 T>C	T	215 (82.7)	199 (85.0)	97 (83.6)	102 (86.4)	0.479	0.825	0.359																																																																																																																	
	C	45 (17.3)	35 (15.0)	19 (16.4)	16 (13.6)																																																																																																																				

\*za statističku značajnost  $p \leq 0.05$ ;

<sup>1</sup>one tailed Fišerov egzaktni test, korišćen kada su očekivane učestalosti manje od 5



**Tabela 10. Učestalost genotipova ispitivanih polimorfizama asociranih sa trombofilijom u kontrolnoj grupi, u grupi pacijenata sa infertilitetom, kao i u podgrupama sa primarnim i sekundarnim infertilitetom.**

Gen SNP	Genotip	Kontrola n (%)	Pacijenti n (%)	Primarni n (%)	Sekundarni n (%)	Kontrola vs. Pac. p	Kontrola vs. Prim. p	Kontrola vs. Sek. p	
<i>FV</i> 1691 G>A	GG	126 (96.9)	108 (92.3)	52 (89.7)	56 (94.9)	0.171	0.08	0.327	
	GA	4 (3.1)	7 (6.0)	5 (8.6)	2 (3.4)				
	AA	0 (0.0)	2 (1.7)	1 (1.7)	1 (1.7)				
<i>FII</i> 20210 G>A	GG	129 (99.2)	109 (93.2)	53 (91.4)	56 (94.9)	<b>0.038*</b>	<b>0.017*</b>	0.056	
	GA	1 (0.8)	7 (6.0)	4 (6.9)	3 (5.1)				
	AA	0 (0.0)	1 (0.8)	1 (1.7)	0 (0.0)				
<i>MTHFR</i>	677 C>T	CC	51 (39.2)	50 (42.7)	25 (43.1)	25 (42.4)	0.668	0.881	0.531
		CT	65 (50.0)	52 (44.4)	27 (46.6)	25 (42.4)			
		TT	14 (10.8)	15 (12.8)	6 (10.3)	9 (15.2)			
	1298 A>C	AA	59 (45.4)	46 (39.3)	24 (41.4)	22 (37.3)	0.090	0.300	0.136
		AC	49 (37.7)	59 (50.4)	28 (48.3)	31 (52.5)			
		CC	22 (16.9)	12 (10.3)	6 (10.3)	6 (10.2)			
	677C>T/1298A>C diplotipske kombinacije	CC/AA	11 (8.5)	8 (6.8)	4 (6.9)	4 (6.8)	0.158	0.454	0.188
		CC/AC	18 (13.8)	30 (25.6)	15 (25.9)	15 (25.4)			
		CC/CC	22 (16.9)	12 (10.3)	6 (10.3)	6 (10.2)			
		CT/AA	34 (26.2)	23 (19.7)	14 (24.1)	9 (15.2)			
		CT/AC	31 (23.8)	29 (24.8)	13 (22.4)	16 (27.1)			
		TT/AA	14 (10.8)	15 (12.8)	6 (10.3)	9 (15.2)			
TT/AC		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)				
CT/CC		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)				
<i>PAI-1</i> -675 4G/5G	5G5G	20 (15.4)	22 (18.8)	13 (22.4)	9 (15.2)	0.629	0.369	0.967	
	5G4G	64 (49.2)	51 (43.6)	23 (39.7)	28 (47.5)				
	4G4G	46 (35.4)	44 (37.6)	22 (37.9)	22 (37.3)				
<i>ATIII</i> 786 G>A	GG	107 (82.3)	95 (81.2)	43 (74.1)	52 (88.1)	0.357	0.202	0.455	
	GA	21 (16.2)	22 (18.8)	15 (25.9)	7 (11.9)				
	AA	2 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)				
<i>ACE</i> ID	II	30 (23.1)	23 (19.7)	11 (19.0)	12 (20.3)	0.737	0.763	0.514	
	ID	48 (36.9)	48 (41.0)	21 (36.2)	27 (45.8)				
	DD	52 (40.0)	46 (39.3)	26 (44.8)	20 (33.9)				
<i>ITGB3</i> 1565 T>C	TT	89 (68.5)	87 (74.4)	41 (70.7)	46 (78.0)	0.411	0.930	0.210	
	TC	37 (28.5)	25 (21.4)	15 (25.9)	10 (16.9)				
	CC	4 (3.1)	5 (4.3)	2 (3.4)	3 (5.1)				

\*za statističku značajnost  $p \leq 0.05$ ; Pac.-pacijenti; Prim.-primarni infertilitet, Sek.-sekundarni infertilitet

Rezultati logističke regresione analize, OR i 95% CI, prikazani su u Tabeli 11. Ovom analizom pokazano je da nosioci A alela na poziciji 1691 *FV* gena imaju 4 puta povećan rizik (OR: 4.110,  $p=0.027$ ) za nastanak primarnog infertiliteta. U slučaju mutacije *FII* 20210 G>A visokorizični alel A nosi 10 puta veći rizik za nastanak infertiliteta bilo kog tipa (primarnog ili sekundarnog) (OR: 10.360,  $p=0.027$ ), dok je rizik za nastanak primarnog infertiliteta kod nosioca A alela povećan 14 puta u odnosu na kontrolnu grupu (OR: 14.127, 0.015). Heterozigotni *FII* 20210GA nosioci imaju povećan rizik 8 puta (OR: 8.284,  $p=0.050$ ) za nastanak infertiliteta, dok je za nastanak primarnog infertiliteta rizik nešto veći (OR: 9.736,  $p=0.044$ ). Rizik za pojavu infertiliteta u združenom modelu heterozigotnih i homozigotnih nosioca mutacije (GG *vs.* GA+AA) povećan je 9 puta (OR: 9.468,  $p=0.035$ ) kod ukupnog infertiliteta i 12 puta (OR: 12.170,  $p=0.024$ ) kod primarnog infertiliteta. Kod sekundarnog infertiliteta nije pokazano postojanje rizika u odnosu na navedene polimorfizme u *FV* i *FII* genu.

U ostalim analiziranim genima, u svim navedenim genetičkim modelima, nije uočeno postojanje povećanog rizika, niti protektivnog oblika za nastanak infertiliteta (Tabela 11).

Tabela 11. Polimorfizmi u genima asociranim sa trombofilijom i rizik za nastanak infertiliteta.

SNP	Genetički Model	Kontrola vs Pacijenti		Kontrola vs Primarni		Kontrola vs Sekundarni	
		OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
FV 1691 G>A	G vs A	3.157 (0.991-10.054)	0.052	4.110 (1.179-14.328)	<b>0.027*</b>	2.246 (0.552-9.137)	0.259
	GG vs GA	2.042 (0.582-7.162)	0.265	3.029 (0.985-13.413)	0.109	1.125 (0.200-6.322)	0.894
	GG vs AA	NR		NR		NR	
	GG vs GA+AA <sup>a</sup>	2.625 (0.786-8.763)	0.117	3.635 (0.985-13.413)	0.053	1.687 (0.366-7.791)	0.503
FII 20210 G>A	G vs A	10.360 (1.302-82.405)	<b>0.027*</b>	14.127 (1.681-118.727)	<b>0.015*</b>	6.757 (0.695-65.648)	0.100
	GG vs GA	8.284 (1.004-68.383)	<b>0.050*</b>	9.763 (1.063-89.151)	<b>0.044*</b>	6.911 (0.703-67.889)	0.097
	GG vs AA	NR		NR		NR	
	GG vs GA+AA <sup>a</sup>	9.468 (1.166-76.887)	<b>0.035*</b>	12.170 (1.389-106.663)	<b>0.024*</b>	6.911 (0.703-67.889)	0.097
MTHFR 677 C>T	C vs T	0.969 (0.670-1.402)	0.866	0.910 (0.573-1.442)	0.687	1.030 (0.655-1.619)	0.900
	CC vs CT	0.816 (0.470-1.392)	0.455	0.847 (0.440-1.633)	0.621	0.785 (0.404-1.525)	0.474
	CC vs TT	1.093 (0.478-2.497)	0.833	0.874 (0.300-2.547)	0.806	1.311 (0.500-3.440)	0.582
	CC vs CT+TT <sup>a</sup>	0.865 (0.520-1.438)	0.576	0.852 (0.617-1.596)	0.617	0.878 (0.470-1.640)	0.683
MTHFR 1298 A>C	A vs C	0.987 (0.683-1.427)	0.945	0.945 (0.597-1.496)	0.810	1.030 (0.655-1.619)	0.900
	AA vs AC	1.544 (0.900-2.651)	0.115	1.405 (0.723-2.729)	0.316	1.697 (0.873-3.266)	0.119
	AA vs CC	0.700 (0.314-1.560)	0.383	0.670 (0.242-1.859)	0.442	0.731 (0.262-2.042)	0.551
	AA vs AC+CC <sup>a</sup>	1.283 (0.773-2.129)	0.336	1.177 (0.629-2.202)	0.610	1.398 (0.744-2.626)	0.298
PAL-I -675 4G/5G	5G vs 4G	0.969 (0.676-1.389)	0.865	0.906 (0.581-1.412)	0.662	1.037 (0.664-1.618)	0.874
	5G5G vs 5G4G	0.724 (0.357-1.471)	0.373	0.553 (0.237-1.288)	0.169	0.972 (0.394-2.399)	0.951
	5G5G vs 4G4G	0.870 (0.418-1.810)	0.709	0.736 (0.310-1.745)	0.486	1.063 (0.417-2.711)	0.899
	5G5G vs 5G4G+4G4G <sup>a</sup>	0.785 (0.404-1.526)	0.476	0.629 (0.289-1.372)	0.244	1.010 (0.430-2.375)	0.982
ATIII 786 G>A	G vs A	0.975 (0.534-1.781)	0.936	1.396 (0.706-2.759)	0.337	0.593 (0.249-1.412)	0.238
	GG vs GA	1.180 (0.611-2.280)	0.622	1.777 (0.839-3.767)	0.133	0.686 (0.274-1.717)	0.420
	GG vs AA	NR		NR		NR	
	GG vs GA+AA <sup>a</sup>	1.077 (0.564-2.057)	0.821	1.623 (0.774-3.403)	0.200	0.626 (0.252-1.554)	0.313
ACE I/D	I vs D	1.508 (0.739-1.516)	0.758	1.206 (0.769-1.892)	0.414	0.933 (0.601-1.449)	0.759
	II vs ID	1.304 (0.664-2.561)	0.440	1.193 (0.505-2.821)	0.687	1.406 (0.620-3.189)	0.414
	II vs DD	1.154 (0.589-2.261)	0.677	1.364 (0.591-3.146)	0.467	0.962 (0.413-2.239)	0.982
	II vs ID+DD <sup>a</sup>	1.226 (0.665-2.261)	0.514	1.282 (0.592-2.777)	0.529	1.175 (0.553-2.497)	0.675
ITGB3 1565 T>C	T vs C	0.840 (0.519-1.361)	0.479	0.936 (0.520-1.684)	0.825	0.749 (0.404-1.389)	0.360
	TT vs TC	0.691 (0.384-1.243)	0.218	0.880 (0.435-1.781)	0.722	0.523 (0.239-1.145)	0.105
	TT vs CC	1.279 (0.332-4.921)	0.721	1.085 (0.191-6.167)	0.926	1.451 (0.311-6.760)	0.635
	TT vs TC+CC <sup>a</sup>	0.749 (0.429-1.305)	0.307	0.900 (0.459-1.769)	0.760	0.613 (0.299-1.258)	0.182

\* statistički značajne vrednosti  $p \leq 0.050$ ; <sup>a</sup> heterozigot i mutirani homozigot združeno; NR nije računato

#### **4.2.2. Analiza multilokusnih interakcija polimorfizama asociiranih sa trombofilijom**

Nakon pojedinačno analiziranih lokusa, ispitivan je aditivni efekat visokorizičnih alela u analiziranim genima asociiranim sa trombofilijom. Razlika između aritmetičkih sredina broja visokorizičnih alela po uzorku između ispitivanih grupa analizirana je Studentovim t-testom, dok je  $\chi^2$  test korišćen kako bi se utvrdilo eventualno postojanje razlike u distribuciji broja HRA između ispitivanih grupa. Uočena je veća srednja vrednost broja visokorizičnih alela po uzorku kod pacijenata u odnosu na kontrole, kao i kod primarnog infertiliteta u odnosu na kontrolnu grupu ( $p > 0.05$ , Tabela 12), a postojanje razlike u distribuciji broja HRA nije detektovano ( $p > 0.05$ , Tabela 12).

**Tabela 12. Analiza broja visokorizičnih alela (HRA) u analiziranim genima kod ispitivanih grupa i upoređivanje prosečnog broja HRA po ispitaniku između grupa.**

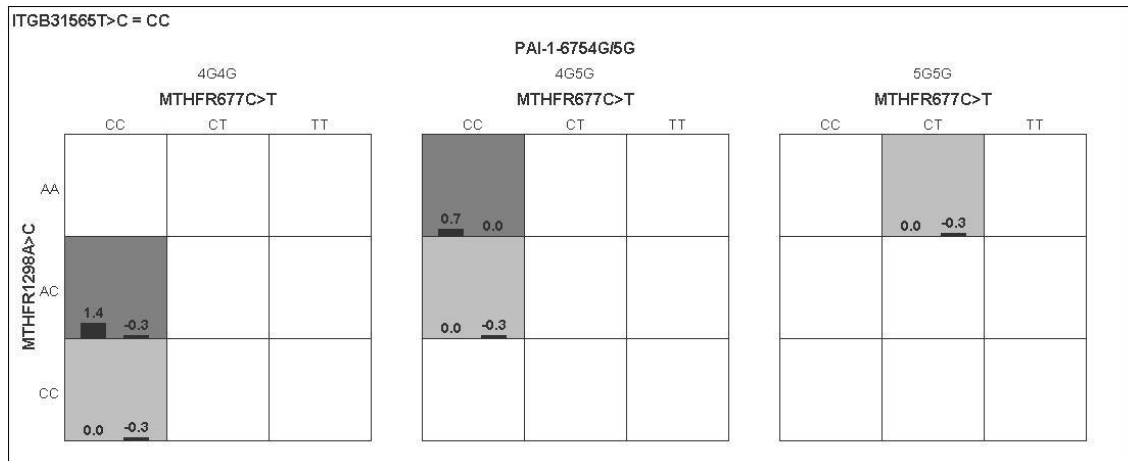
Broj HRA	Kontrola n (%)	Pacijenti n (%)	Primarni n (%)	Sekundarni n (%)
0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
1	2 (1.54)	2 (1.71)	1 (1.72)	1 (1.69)
2	9 (6.92)	5 (4.27)	1 (1.72)	4 (6.78)
3	29 (22.31)	27 (23.08)	12 (20.69)	15 (25.42)
4	31 (23.85)	22 (18.80)	10 (17.24)	12 (20.34)
5	27 (20.77)	38 (32.48)	23 (39.66)	15 (25.42)
6	23 (17.69)	13 (11.11)	6 (10.34)	7 (11.86)
7	7 (5.38)	8 (6.84)	4 (6.90)	4 (6.78)
8	2 (1.54)	2 (1.71)	1 (1.72)	1 (1.69)
9>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Ukupan broj HRA	569	521	266	255
Srednja vrednost	4.38	4.45	4.59	4.32
Standardna devijacija	1.469	1.423	1.351	1.491
	$p^1$		$p^2$	
Kont. vs. Pac.	0.680		0.452	
Kont vs. Prim.	0.357		0.198	
Kont vs. Sek.	0.813		0.970	

$p^1$ - studentov t test za analizu razlika u prosečnim vrednostima broja HRA;

$p^2$ -  $\chi^2$  test za analizu razlika u distribuciji broja HRA

Kont.-kontrola; Pac.-pacijenti, Prim.-primarni infertilitet, Sek.-sekundarni infertilitet

Gen-gen (SNP-SNP) interakcije ispitivanih lokusa i njihova asocijacija sa infertilitetom ispitivana je primenom statističkog modela generalizovane multifaktorske redukcije dimenzionalnosti (GMDR modela) i prikazana je u Tabelama 13-16. Rezultati analize kojom je pokušano da se utvrdi da li interakcija ispitivanih lokusa asociраних sa trombofilijom (od 1 do 8) može dovesti do infertiliteta, bez obzira da li se radi o primarnom ili sekundarnom infertilitetu prikazani su u Tabeli 13, dok su eventualne multilokusne kombinacije genotipova koje dovode do primarnog, odnosno sekundarnog infertiliteta prikazane u Tabelama 14 i 15, respektivno. Ovim analizama uočena je statistički značajna razlika između kontrole i ukupne grupe pacijenata za MTHFR 1298 lokus ( $p=0.001$ ). U ispitivanju interakcija između kontrole i podgrupe sa sekundarnim infertilitetom uočene su dve značajne interakcije ( $p<0.05$ ): jedna između lokusa MTHFR 677-MTHFR 1298-PAI-1-ITGB3 1565 ( $p=0.0107$ ), dok je u drugu značajnu interakciju, pored ovih navedenih gena bio uključen i polimorfizam u okviru ACE gena ( $p=0.0010$ ). Na Slici 14, koja prikazuje rezultat prve značajne interakcije (MTHFR 677-MTHFR 1298-PAI-1-ITGB3 1565), može se uočiti postojanje visokorizičnih multilokusnih kombinacija alela (genotipova), pri čemu tamnosiva boja predstavlja genotip karakterističniji za grupu pacijentkinja, a svetlosiva boja kvadratića označava kombinaciju karakterističnu za kontrolnu grupu. Beli kvadrati predstavljaju odsustvo navedene kombinacije genotipova u obe ispitivane grupe. Levi stubić predstavlja skor (relativnu meru rizika) za pojavu sekundarnog infertiliteta kod pacijenata, dok desni stubić predstavlja skor u kontrolnoj grupi. Na osnovu ove analize uočava se postojanje povećanog rizika u interakciji *MTHFR 677CC-MTHFR 1298AC-PAI-1 4G4G-ITGB3 1565CC* i *MTHFR 677CC-MTHFR 1298AA-PAI-1 4G5G-ITGB3 1565CC* genotipova (Slika 14). U drugoj interakciji, uočeni visokorizični genotip bila je kombinacija *MTHFR 677CC-MTHFR 1298CC-PAI-1 4G4G-ACE DD-ITGB3 1565CC*. Između kontrole i primarnog infertiliteta, kao i između primarnog i sekundarnog infertiliteta, nije uočeno postojanje značajne interakcije između ispitivanih lokusa (Tabele 14 i 16, respektivno).



Slika 14. Prikaz interakcije MTHFR 677-MTHFR 1298-PAI-1-ITGB3 lokusa

Tabela 13. Interakcija analiziranih polimorfizama između kontrolne grupe i grupe pacijenata.

N	Model	TrBA	TeBA	Sign test (p)	CVC
1	M2	0.5637	0.5638	10 ( <b>0.0010</b> )*	10/10
2	M2-PAI	0.5953	0.4768	5 (0.6230)	5/10
3	M2-PAI-ITGB3	0.6456	0.5139	5 (0.6230)	9/10
4	M1-M2-PAI-ITGB3	0.7017	0.4899	4 (0.8281)	4/10
5	M1-M2-PAI-ACE-ITGB3	0.7711	0.5233	6 (0.3770)	10/10
6	M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3	0.8078	0.5231	5 (0.6230)	10/10
7	FV-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3	0.8287	0.5159	6 (0.3770)	9/10
8	FV-FII-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3	0.8419	0.5448	7 (0.1719)	10/10

N-broj lokusa u modelu; TrBA-engl. *training balanced accuracy*, TeBA-engl. *testing balanced accuracy*;  
CVC-engl. *cross-validation consistency*, p- statistička značajnost testa; M1-MTHFR 677 lokus; M2-MTHFR 1298 lokus.



**Tabela 14. Interakcija analiziranih polimorfizama između kontrole i primarnog infertiliteta.**

N	Model	TrBA	TeBA	Sign test (p)	CVC
1	M2	0.5574	0.4955	6 (0.3770)	6/10
2	PAI-ACE	0.6111	0.4845	5 (0.6230)	7/10
3	M2-PAI-ACE	0.6671	0.4649	4 (0.8281)	6/10
4	M1-M2-PAI-ACE	0.7343	0.4433	3(0.9453)	3/10
5	M1-M2-PAI-ACE-ITGB3	0.8101	0.4583	2 (0.9893)	9/10
6	M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3	0.8654	0.4921	4 (0.8281)	10/10
7	FV-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3	0.8868	NaN	6 (0.3770)	10/10
8	FV-FII-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3	0.8868	NaN	5 (0.6230)	10/10

N-broj lokusa u modelu; TrBA-engl. *training balanced accuracy*, TeBA-engl. *testing balanced accuracy*;  
 CVC-engl. *cross validation consistency*, NaN-engl. *not a number*, p- statistička značajnost testa; M1-MTHFR 677 lokus;  
 M2-MTHFR 1298 lokus

**Tabela 15. Interakcija analiziranih polimorfizama između kontrole i sekundarnog infertiliteta.**

N	Model	TrBA	TeBA	Sign test (p)	CVC
1	M2	0.5743	0.5765	7 (0.1719)	10/10
2	M2-ITGB3	0.6252	0.5429	6 (0.1719)	9/10
3	M2-ACE-ITGB3	0.6871	0.6076	8 (0.0547)	9/10
4	M1-M2-PAI-ITGB3	0.7534	0.6353	<b>9 (0.0107)*</b>	9/10
5	M1-M2-PAI-ACE-ITGB3	0.8205	0.6414	<b>10 (0.0010)*</b>	10/10
6	M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3	0.8449	0.5639	4 (0.8281)	7/10
7	FV-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3	0.8577	0.5253	4 (0.8281)	7/10
8	FV-FII-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3	0.8660	0.5361	5 (0.6230)	10/10

N-broj lokusa u modelu; TrBA-engl. *training balanced accuracy*, TeBA-engl. *testing balanced accuracy*;  
 CVC-engl. *cross-validation consistency*, p- statistička značajnost testa; M1-MTHFR 677 lokus; M2-MTHFR 1298 lokus

**Tabela 16. Interakcija analiziranih polimorfizama između primarnog i sekundarnog infertiliteta.**

N	Model	TrBA	TeBA	Sign test (p)	CVC
1	ATIII	0.5774	0.4283	1 (0.9990)	6/10
2	M2-ATIII	0.6201	0.4333	3 (0.9453)	4/10
3	M1-PAI-ATIII	0.6954	0.5600	6 (0.3770)	9/10
4	M1-PAI-ATIII-ITGB3	0.7556	0.5392	6 (0.3770)	8/10
5	M1-M2-PAI-ATIII-ITGB3	0.8073	0.5558	6 (0.3770)	9/10
6	M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3	0.8401	0.3808	3 (0.9453)	9/10
7	FV-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3	0.8599	0.3392	3 (0.9453)	5/10
8	FV-FII-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3	0.8667	0.3183	3 (0.9453)	10/10

N-broj lokusa u modelu; TrBA-engl. *training balanced accuracy*, TeBA-engl. *testing balanced accuracy*;  
 CVC-engl. *cross-validation consistency*, p- statistička značajnost testa; M1-MTHFR 677 lokus; M2-MTHFR 1298 lokus

### 4.3. Analiza polimorfizama u VDR genu

Analiza učestalosti genotipova i alela ispitivanih polimorfizama u *VDR* genu (FokI, BsmI, TaqI i ApaI) rađena je u SPSS *v.* 17.0 statističkom programu, dok je analiza SNP-SNP interakcija rađena u GMDR programu. Za dobijanje predikcija o haplotipovima prisutnim kod pojedinih ispitanika na osnovu kombinacije polimorfnih lokusa u *VDR* genu, učestalostima tih haplotipova i njihovim razlikama između ispitivanih grupa, korišćen je Haploview program. Odstupanje od učestalosti očekivanih na osnovu pretpostavki iz Hardy Vajnbergove jednačine, uočeno je u kontrolnoj grupi za ApaI i BsmI polimorfizam (Tabela 17).

**Tabela 17. Dobijene i očekivane učestalosti genotipova ispitivanih polimorfizama u VDR genu, u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa infertilitetom, HW ravnoteža (HWE).**

SNP	Genotip	Kontrola n (%) dobijeno	Kontrola n (%) očekivano	Pacijenti n (%) dobijeno	Pacijenti n (%) očekivano	Primarni n (%) dobijeno	Primarni n (%) očekivano	Sekundarni n (%) dobijeno	Sekundarni n (%) očekivano
FokI rs2228570 T>C	TT/ff	12 (9.2)	14.9 (11.5)	21 (18.4)	22.4 (19.6)	9 (15.5)	10.3 (17.8)	12 (21.4)	12.1 (21.6)
	TC/Ff	64 (49.2)	58.2 (44.8)	59 (51.8)	56.3 (49.4)	31 (53.5)	28.3 (48.8)	28 (50.0)	27.9 (49.8)
	CC/FF	54 (41.5)	56.9 (43.8)	34 (29.8)	35.4 (31.0)	18 (31.0)	19.3 (33.3)	16 (28.6)	16.1 (28.7)
	HWE p	0.26		0.60		0.47		0.97	
BsmI rs1544410 G>A	GG/bb	11 (9.2)	18.6 (15.6)	27 (25.5)	25.5 (24.1)	13 (23.6)	11.8 (21.5)	14 (27.5)	13.8 (27.0)
	GA/Bb	72 (60.5)	56.9 (47.8)	50 (47.2)	53.0 (50.0)	25 (45.5)	27.4 (49.8)	25 (49.0)	25.5 (50.0)
	AA/BB	36 (30.3)	43.6 (36.6)	29 (27.4)	27.5 (25.9)	17 (30.9)	15.8 (28.7)	12 (23.5)	11.8 (23.1)
	HWE p	<b>0.003*</b>		0.56		0.52		0.90	
ApaI rs7975232 G>T	GG/aa	13 (10.1)	20.6 (16.0)	12 (10.5)	13.3 (11.7)	4 (6.9)	6.6 (11.4)	8 (14.3)	6.8 (12.1)
	GT/Aa	77 (59.7)	61.9 (48.0)	54 (47.4)	51.3 (45.0)	31 (53.4)	25.9 (44.6)	23 (41.1)	25.4 (45.4)
	TT/AA	39 (30.2)	46.6 (36.1)	48 (42.1)	49.3 (43.2)	23 (39.7)	25.6 (44.1)	25 (41.1)	23.8 (42.5)
	HWE p	<b>0.006*</b>		0.58		0.13		0.48	
TaqI rs731326 T>C	TT/TT	54 (42.2)	51.3 (40.1)	47 (41.2)	43.0 (37.7)	21 (36.2)	19.3 (33.3)	26 (46.4)	23.8 (42.5)
	TC/Tt	54 (42.2)	59.5 (46.5)	46 (40.4)	54.0 (47.4)	25 (43.1)	28.3 (48.8)	21 (37.5)	25.4 (45.4)
	CC/tt	20 (15.6)	17.3 (13.5)	21 (18.4)	17.0 (14.9)	12 (20.7)	10.3 (17.8)	9 (16.1)	6.8 (12.1)
	HWE p	0.30		0.11		0.19		0.19	

\*za statističku značajnost  $p \leq 0.050$

#### 4.3.1. Pojedinačno analizirani polimorfizmi u VDR genu

Rezultati ispitivanja učestalosti alela i genotipova definisanih polimorfizmima u VDR genu predstavljeni su u Tabeli 18 i Tabeli 19, respektivno. Analizirani polimorfizmi uključeni u biološku aktivnost vitamina D u ciljnim tkivima pokazali su da postoji statistički značajna razlika u distribuciji alela u FokI polimorfizmu između kontrolne grupe i podgrupe sa sekundarnim infertilitetom ( $p=0.021$ ,  $\chi^2$  test). Takođe je uočena i razlika u učestalostima genotipova u FokI polimorfizmu između kontrolne grupe i infertilnih pacijentkinja ( $p=0.045$ ,  $\chi^2$  test), kao i između kontrolne grupe i podgrupe sa sekundarnim infertilitetom ( $p=0.043$ ,  $\chi^2$  test). Naime, kod infertilnih žena u našem uzorku pokazana je znatno veća učestalost homozigotne varijante ff, dok je kod kontrola bila veća učestalost homozigotne kombinacije FF. Između podgrupe sa primarnim i podgrupe sa sekundarnim infertilitetom nije pokazano postojanje razlike niti u distribuciji alela niti u distribuciji genotipova definisanih FokI polimorfizmom ( $p>0.05$ ,  $\chi^2$  test).

Analiza BsmI polimorfizma u VDR genu pokazala je takođe da postoji statistički značajna razlika u učestalostima alela između kontrolne grupe i ukupne grupe pacijentkinja ( $p=0.041$ ,  $\chi^2$  test), kao i između kontrolne grupe i podgrupe sa sekundarnim infertilitetom ( $p=0.033$ ,  $\chi^2$  test), dok kod primarnog infertiliteta nije uočena značajno različita distribucija alela ni u odnosu na kontrolnu grupu, ni u odnosu na podgrupu sa sekundarnim infertilitetom ( $p>0.05$ ,  $\chi^2$  test). Analiza genotipova BsmI polimorfizma pokazala je postojanje značajne razlika u distribuciji genotipova između kontrolne grupe i grupe pacijentkinja ( $p=0.0046$ ,  $\chi^2$  test), između kontrolne grupe i podgrupe sa primarnim ( $p=0.0089$ ,  $\chi^2$  test), kao i između kontrolne grupe i podgrupe sa sekundarnim infertilitetom ( $p=0.0027$ ,  $\chi^2$  test). Ni u slučaju BsmI polimorfizma, kao i u slučaju FokI polimorfizma, nije uočeno postojanje značajne razlike u distribuciji genotipova između podgrupe sa primarnim i podgrupe sa sekundarnim infertilitetom.

Analiza TaqI i ApaI polimorfizma nije pokazala da postoji značajna razlika u distribuciji genotipova i alela između ispitivanih grupa ( $p > 0.05$ ,  $\chi^2$  test).

**Tabela 18. Učestalost alela VDR polimorfizama u kontrolnoj grupi, u grupi pacijenata sa infertilite tom, kao i u podgrupama sa primarnim i sekundarnim infertilite tom.**

SNP	Alel	Kontrola n (%)	Pacijenti n (%)	Primarni infertilitet n (%)	Sekundarni infertilitet n (%)	Kontrola vs. Pac. p	Kontrola vs. Prim. p	Kontrola vs. Sek. p	Prim. vs. Sek. p
FokI T>C rs2228570	T/f	88 (33.9)	101 (44.3)	49 (42.2)	52 (46.4)	0.447	0.118	<b>0.022*</b>	0.525
	C/F	172 (66.1)	172 (55.7)	67 (57.8)	60 (53.6)				
BsmI G>A rs1544410	G/b	94 (39.5)	104 (49.1)	51 (46.4)	63 (52.0)	<b>0.041*</b>	0.227	<b>0.033*</b>	0.415
	A/B	144 (60.5)	108 (50.9)	59 (53.6)	49 (48.0)				
ApaI G>T rs7975232	G/a	103 (40.7)	78 (34.2)	39 (33.6)	39 (34.8)	0.142	0.194	0.287	0.848
	T/A	150 (59.3)	150 (65.7)	77 (66.4)	73 (65.2)				
TaqI T>C rs731236	T/T	162 (63.3)	140 (61.4)	67 (57.8)	73 (65.2)	0.670	0.310	0.727	0.250
	C/t	94 (36.72)	88 (38.6)	49 (42.2)	39 (34.8)				

\*za statističku značajnost  $p \leq 0.05$ ; SNP-jednonukleotidni polimorfizam; Pac.-pacijenti, Prim.-primarni infertilitet, Sek.-sekundarni infertilitet

**Tabela 19. Učestalost genotipova VDR polimorfizama u kontrolnoj grupi, u grupi pacijenata sa infertilite tom, kao i u podgrupama sa primarnim i sekundarnim infertilite tom.**

SNP	Genotip	Kontrola n (%)	Pacijenti n (%)	Primarni n (%)	Sekundarni n (%)	Kontrola vs. Pac. p	Kontrola vs. Prim. p	Kontrola vs. Sek. p	Prim. vs. Sek. p
FokI rs2228570 T>C	TT/ff	12 (9.2)	21 (18.4)	9 (15.5)	12 (21.4)	<b>0.045*</b>	0.257	<b>0.043*</b>	0.717
	TC/Ff	64 (49.2)	59 (51.8)	31 (53.5)	28 (50.0)				
	CC/FF	54 (41.5)	34 (29.8)	18 (31.0)	16 (28.6)				
BsmI rs1544410 G>A	GG/bb	11 (9.2)	27 (25.5)	13 (23.6)	14 (27.5)	<b>0.005*</b>	<b>0.003*</b>	<b>0.009*</b>	0.687
	GA/Bb	72 (60.5)	50 (47.2)	25 (45.5)	25 (49.0)				
	AA/BB	36 (30.3)	29 (27.4)	17 (30.9)	12 (23.5)				
ApaI rs7975232 G>T	GG/aa	13 (10.1)	12 (10.5)	4 (6.9)	8 (14.3)	0.129	0.409	0.065	0.277
	GT/Aa	77 (59.7)	54 (47.4)	31 (53.4)	23 (41.1)				
	TT/AA	39 (30.2)	48 (42.1)	23 (39.7)	25 (44.6)				
TaqI rs731236 T>C	TT/TT	54 (42.2)	47 (41.2)	21 (36.2)	26 (46.4)	0.843	0.62	0.828	0.529
	TC/Tt	54 (42.2)	46 (40.4)	25 (43.1)	21 (37.5)				
	CC/tt	20 (15.6)	21 (18.4)	12 (20.7)	9 (16.1)				

\*za statističku značajnost  $p \leq 0.05$ ; SNP-jednonukleotidni polimorfizam; Pac.-pacijenti, Prim.-primarni infertilitet, Sek.-sekundarni infertilitet

Rezultati logističke regresione analize prikazani su u Tabeli 20. Ova analiza pokazala je postojanje protektivnih genotipova u ukupnoj grupi pacijenata, kao i u podgrupi sa sekundarnim infertilitetom. Analiza FokI polimorfizma ukazala je na protektivnu ulogu F alela u modelu *ff vs. FF* u grupi pacijenata (OR=0.360,  $p=0.016$ ), kao i u združenom modelu *ff vs. Ff+FF* (OR=0.450,  $p=0.040$ ). U podgrupi sa sekundarnim infertilitetom ovaj polimorfizam se pokazao kao protektivan u alelskom modelu *f vs. F*, kao i u modelima *ff vs. Ff*, *ff vs. Ff+FF* (OR<1,  $p<0.05$ ). Analiza Bsm polimorfizma je pokazala da B alel takođe ima protektivnu ulogu u grupi pacijenata i podgrupi sa sekundarnim infertilitetom u svim ispitivanim genetičkim modelima (OR<1,  $p<0.05$ ), dok je kod podgrupe sa primarnim infertilitetom protektivna uloga uočena u modelima *bb vs. Bb* i *bb vs. Bb+BB* (OR<1,  $p<0.05$ ).



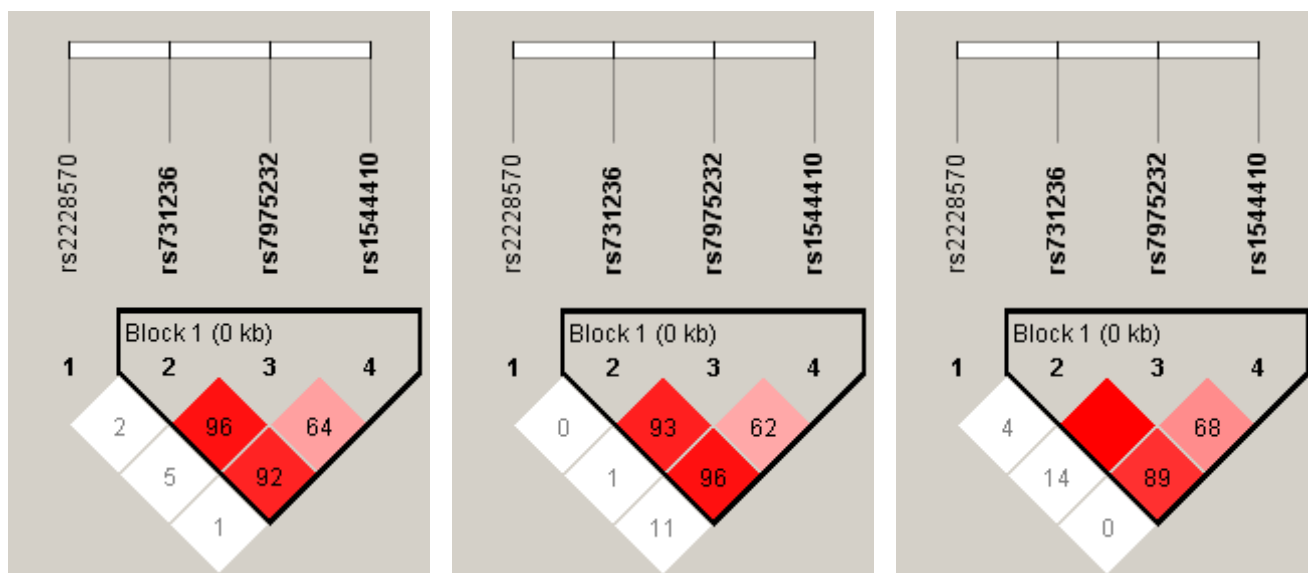
Tabela 20. Polimorfizmi u VDR genu i rizik za nastanak infertiliteta.

SNP	Model	Kontrola vs. Pacijenti		Kontrola vs. Primarni		Kontrola vs. Sekundarni	
		OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
FokI T>C (f/F)	f vs. F	0.871 (0.611-1.243)	0.447	0.700 (0.446-1.096)	0.119	0.590 (0.376-0.927)	<b>0.022*</b>
	ff vs. Ff	0.527 (0.238-1.164)	0.113	0.646 (0.246-1.695)	0.374	0.438 (0.175-1.092)	0.077
	ff vs. FF	0.360 (0.157-0.824)	<b>0.016*</b>	0.444 (0.161-1.227)	0.118	0.296 (0.112-0.786)	<b>0.015*</b>
	ff vs. Ff+FF <sup>a</sup>	0.450 (0.211-0.963)	<b>0.040*</b>	0.554 (0.219-1.398)	0.211	0.373 (0.156-0.892)	<b>0.027*</b>
BsmI G>A (b/B)	b vs. B	0.678 (0.466-0.986)	<b>0.042*</b>	0.755 (0.479-1.192)	0.227	0.604 (0.378-0.963)	<b>0.034*</b>
	bb vs. Bb	0.283 (0.129-0.622)	<b>0.002*</b>	0.294 (0.117-0.739)	<b>0.009*</b>	0.273 (0.110-0.679)	<b>0.005*</b>
	bb vs. BB	0.328 (0.140-0.772)	<b>0.011*</b>	0.400 (0.149-1.074)	0.069	0.262 (0.094-0.730)	<b>0.010*</b>
	bb vs. Bb+BB <sup>a</sup>	0.298 (0.140-0.636)	<b>0.002*</b>	0.329 (0.137-0.792)	<b>0.013*</b>	0.269 (0.112-0.645)	<b>0.003*</b>
ApaI G>T (a/A)	a vs. A	1.312 (0.911-1.914)	0.142	1.356 (0.856-2.147)	0.194	1.285 (0.809-2.041)	0.288
	aa vs. Aa	0.760 (0.322-1.792)	0.530	1.308 (0.396-4.325)	0.659	0.485 (0.179-1.315)	0.155
	aa vs. AA	1.333 (0.547-3.251)	0.527	1.917 (0.558-6.580)	0.301	1.042 (0.378-2.871)	0.937
	aa vs. Aa+AA <sup>a</sup>	0.953 (0.416-2.181)	0.909	1.513 (0.471-4.856)	0.487	0.672 (0.262-1.726)	0.409
TaqI T>C (T/t)	T vs. t	1.083 (0.750-1.566)	0.670	1.260 (0.806-1.972)	0.311	0.921 (0.579-1.465)	0.727
	TT vs. Tt	0.979 (0.562-1.704)	0.939	1.190 (0.596-2.378)	0.621	0.808 (0.406-1.607)	0.543
	TT vs. tt	1.206 (0.583-2.495)	0.613	1.543 (0.643-3.702)	0.332	0.935 (0.374-2.334)	0.885
	TT vs. Tt+tt <sup>a</sup>	1.040 (0.623-1.736)	0.880	1.286 (0.678-2.439)	0.442	0.842 (0.448-1.583)	0.594

\*za statističku značajnost  $p \leq 0.05$ <sup>a</sup> wilt type genotip vs. heterozigot i mutirani homozigot združeno

### 4.3.2. Analiza haplotipova polimorfizama u VDR genu

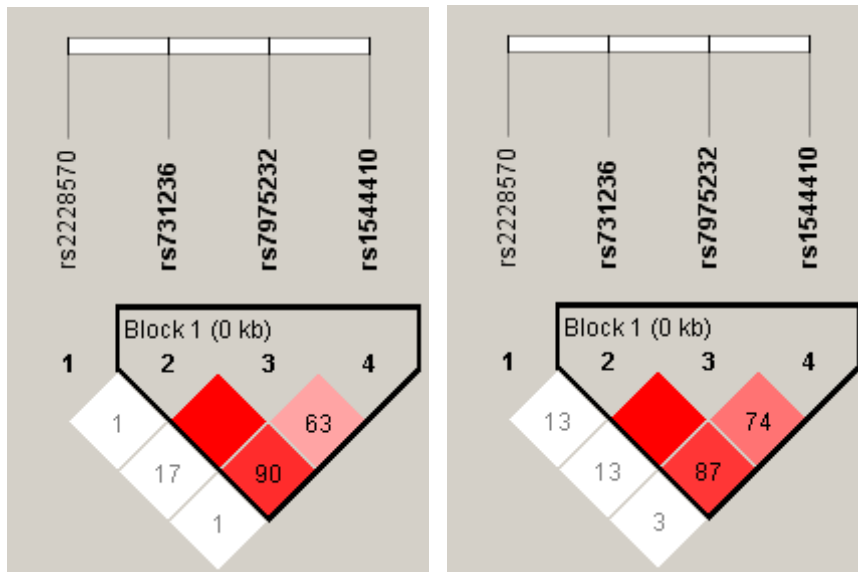
Analiza haplotipova definisanih polimorfizama u VDR genu rađena je pomoću programa Haploview v. 4.2. Parametri kojima se izražava jačina LD-a su najčešće  $r^2$  i  $D'$ , pri čemu su vrednosti za oba u rasponu od 0 (odsustvo vezanosti-neravnoteže) do 1 (potpuna vezanost-neravnoteža) (Wang i sar., 2005). Kao što je ranije navedeno, za definiciju haplotipskog bloka korišćena je opcija engl. *Solid Spine of LD*. Nivo neravnoteže vezanosti između parova analiziranih polimorfizama izražen je preko parametra  $D'$  i prikazan procentualno u kvadratićima, za celokupnu studijsku grupu, kao i za kontrolnu grupu i grupu pacijentkinja sa infertilitetom. Analizom je identifikovan jedan haplotipski blok (TaqI rs731236-ApaI rs7975232-BsmI rs1544410) u celoj ispitivanoj grupi, kao i u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata, odvojeno (Slika 15).



Slika 15. Haplotipski blok i neravnoteža vezanosti u celokupnoj ispitivanoj grupi (levo), kontrolnoj grupi (sredina) i grupi pacijentkinja (desno).

Nakon razdvajanja grupe pacijentkinja na podgrupe sa primarnim i sa sekundarnim infertilitetom, dobijen je isti haplotipski blok TaqI-ApaI-BsmI

(Slika 16), dok se FokI polimorfizam nije nalazio u LD-u sa ostalim ispitivanim polimorfizmima.



**Slika 16. Haplotipski blok i neravnoteža vezanosti u podgrupi sa primarnim (levo) i sekundarnim infertilitetom (desno).**

U celokupnoj studijskoj grupi, TaqI i ApaI su jače vezani ( $D'=0.96$ ), nego TaqI i BsmI ( $D'=0.92$ ) i ApaI i BsmI ( $D'=0.64$ ) (Slika 15, levo). U kontrolnoj grupi uočeno je da su nešto jače vezani TaqI i BsmI ( $D'=0.96$ ) u odnosu na TaqI i ApaI ( $D'=0.93$ ) i ApaI i BsmI ( $D'=0.62$ ), dok je u grupi pacijenata sa infertilitetom pokazana najjača vezanost TaqI i ApaI (Slika 15, desno). U podgrupama sa primarnim i sekundarnim infertilitetom uočeno je da su u podgrupi sa primarnim infertilitetom nešto jače vezani TaqI i BsmI nego u podgrupi sa sekundarnim ( $D'=0.90$  vs.  $D'=0.87$ ), dok su ApaI i BsmI nešto jače vezani kod sekundarnog u odnosu na primarni infertilitet ( $D'=0.74$  vs.  $D'=0.63$ ). U obe podgrupe najjače su vezani TaqI i ApaI polimorfizmi (kvadratić je bez broja jer označava 1, odnosno potpunu vezanost, Slika 16).

Test asocijacije haplotipova između analiziranih grupa prikazan je u Tabeli 21 između kontrole i pacijentkinja, Tabeli 22 između kontrole i podgrupe sa primarnim infertilitetom, Tabeli 23 između kontrole i podgrupe sa sekundarnim infertilitetom i Tabeli 24 između dve podgrupe. Pokazana je

značajna asocijacija haplotipa bAT između kontrole i ukupne grupe pacijenata ( $p=0.017$ ), koja je zadržala značajnost i nakon testa permutacija ( $p=0.033$ ) (Tabela 21). Ovaj haplotip ostao je značajan u podgrupi pacijenata sa sekundarnim infertilitetom ( $p=0.025$ ), a i nakon testa permutacija ( $p=0.037$ ) (Tabela 23).

**Tabela 21. Test asocijacije haplotipova između kontrole i ukupne grupe pacijenata.**

Haplotip	Učestalost	Pacijenti, kontrole odnos	$\chi^2$	p	p permutacija
BAt	0.363	0.361, 0.365	0.01	0.922	1.000
baT	0.289	0.293, 0.283	0.058	0.810	1.000
bAT	0.145	0.109, 0.185	5.6565	<b>0.017*</b>	<b>0.033*</b>
BAT	0.109	0.127, 0.088	1.954	0.162	0.421
BaT	0.079	0.098, 0.058	2.721	0.099	0.279
bAt	0.010	0.002, 0.020	3.584	0.058	0.146

\*za statističku značajnost  $p \leq 0.05$ **Tabela 22. Test asocijacije haplotipova između kontrole i podgrupe sa primarnim infertilitetom.**

Haplotip	Učestalost	Primarni, kontrole odnos	$\chi^2$	p	p permutacija
BAt	0.374	0.362, 0.403	0.571	0.45	0.911
baT	0.286	0.293, 0.272	0.174	0.677	1.000
bAT	0.129	0.109, 0.174	3.095	0.079	0.182
BAT	0.109	0.128, 0.068	2.894	0.089	0.209
BaT	0.088	0.099, 0.063	1.276	0.259	0.740
bAt	0.007	0.002, 0.019	3.405	0.065	0.209

\* za statističku značajnost  $p \leq 0.05$ **Tabela 23. Test asocijacije haplotipova između kontrole i podgrupe sa sekundarnim infertilitetom.**

Haplotip	Učestalost	Sekundarni, kontrole odnos	$\chi^2$	p	p permutacija
BAt	0.351	0.361, 0.327	0.386	0.534	0.938
baT	0.298	0.298, 0.298	0.0	0.991	1.000
bAT	0.130	0.104, 0.189	5.038	<b>0.025*</b>	<b>0.037*</b>
BAT	0.128	0.133, 0.115	0.225	0.635	1.000
BaT	0.080	0.093, 0.049	2.095	0.148	0.338
bAt	0.007	0.002, 0.020	3.624	0.057	0.145

\* za statističku značajnost  $p \leq 0.05$ **Tabela 24. Test asocijacije haplotipova između podgrupa sa primarnim i sekundarnim infertilitetom.**

Haplotip	Učestalost	Primarni, sekundarni odnos	$\chi^2$	p	p permutacija
BAt	0.365	0.327, 0.403	1.414	0.234	0.663
baT	0.280	0.291, 0.269	0.134	0.714	0.998
bAT	0.195	0.208, 0.183	0.228	0.633	0.993
BAT	0.076	0.095, 0.058	1.111	0.292	0.749
BaT	0.062	0.057, 0.067	0.093	0.761	1.000
bAt	0.021	0.022, 0.020	0.008	0.930	1.000

\* za statističku značajnost  $p \leq 0.05$

Distribucija analiziranih haplotipova prikazane su u Tabelama 25, 26 i 27. Najučestaliji haplotip, u kontrolnoj grupi (36.2%), kao i u grupi pacijenata (36.5%) bio je BAt, dok je najmanje učestao bio haplotip BaT (9.1% u kontrolnoj i 6.2% u grupi pacijenata). Haplotipovi Bat i bat javili su se samo u kontrolnoj grupi, oba sa učestalošću od 0.5%, dok se u grupi pacijenata javio haplotip bAt (2.1%) koji nije detektovan u kontrolnoj grupi. Analiza logističke regresije pokazala je značajno povećan rizik za pojavu infertiliteta u slučaju haplotipa bAT (OR:1.96, p=0.02), dok za ostale haplotipove nije pokazano da dovode do povećanog ili smanjenog rizika za stanje reproduktivnog neuspaha (Tabela 25). Kada su razdvojene pacijentkinje na podgrupe sa primarnim i sekundarnim infertilitetom, u podgrupi sa primarnim infertilitetom izdvojio se haplotip BAT kao mogući protektivni (OR:0.333, p=0.021) (Tabela 26), dok je u grupi sa sekundarnim infertilitetom, za haplotip bAT pokazano da dovodi do povećanog rizika za pojavu sekundarnog infertiliteta za nešto više od dva puta (OR:2.209, p=0.023), prikazano u Tabeli 27.

**Tabela 25. BsmI-TaqI-ApaI haplotipovi i rizik za pojavu infertiliteta.**

Haplotip	Kontrola 2n=260, n (%)	Pacijenti 2n=228, n (%)	OR (95% CI)	p
BAt	94 (36.2)	83 (36.5)	1	Ref.
baT	78 (30)	64 (28.0)	0.929 (0.597-1.447)	0.746
BAT	36 (13.7)	17 (7.6)	0.534 (0.280-1.022)	0.058
bAT	26 (10)	45 (19.5)	1.96 (1.113-3.452)	<b>0.020*</b>
BaT	24 (9.1)	14 (6.2)	0.661 (0.321-1.360)	0.261
Bat	1 (0.5)	/	NR	NR
bat	1 (0.5)	/	NR	NR
bAt	/	5 (2.1)	NR	NR

\* za statističku značajnost p≤0.050; NR-nije računato; Ref.-referentna vrednost

**Tabela 26. BsmI-TaqI-ApaI haplotipovi i rizik za pojavu primarnog infertiliteta.**

Haplotip	Kontrola 2n=260, n (%)	Primarni 2n=116, n (%)	OR (95% CI)	p
BAt	94 (36.2)	47 (40.3)	1	Ref.
baT	78 (30)	31 (26.3)	0.795 (0.461-1.369)	0.261
BAT	36 (13.7)	6 (5.0)	0.333 (0.131-0.847)	<b>0.021*</b>
bAT	26 (10)	22 (19.1)	1.692 (0.868-3.297)	0.122
BaT	24 (9.1)	8 (7.3)	0.667 (0.278-1.597)	0.363
Bat	1 (0.5)	/	NR	NR
bat	1 (0.5)	/	NR	NR
bAt	/	2 (2.0)	NR	NR

\* za statističku značajnost  $p \leq 0.050$ ; NR-nije računato; Ref.-referentna vrednost

**Tabela 27. BsmI-TaqI-ApaI haplotipovi i rizik za pojavu sekundarnog infertiliteta.**

Haplotip	Kontrola 2n=260, n (%)	Sekundarni 2n=112, n (%)	OR (95% CI)	p
BAt	94 (36.2)	36 (32.5)	1	Ref.
baT	78 (30)	33 (29.8)	1.105 (0.631-1.933)	0.727
BAT	36 (13.7)	12 (10.7)	0.870 (0.408-1.857)	0.720
bAT	26 (10)	22 (19.7)	2.209 (1.113-4.385)	<b>0.023*</b>
BaT	24 (9.1)	6 (5.0)	0.653 (0.247-1.728)	0.391
Bat	1 (0.5)	/	NR	NR
bat	1 (0.5)	/	NR	NR
bAt	/	3 (2.3)	NR	NR

\* za statističku značajnost  $p \leq 0.050$ ; NR-nije računato; Ref.-referentna vrednost

#### **4.3.3. Analiza multilokusnih interakcija polimorfizama u VDR genu**

GMDR analiza polimorfizama u *VDR* genu prikazana je u Tabeli 28 između kontrole i pacijenata, Tabeli 29 između kontrole i primarnog infertiliteta, Tabeli 30 između kontrole i sekundarnog infertiliteta, kao i u Tabeli 31 između primarnog i sekundarnog infertiliteta. Iz ove analize isključeni su uzorci za koje nisu utvrđeni genotipovi u odnosu na sve 4 analizirane pozicije. Rezultati nisu pokazali postojanje značajne SNP-SNP interakcije između polimorfizama analiziranih u *VDR* genu.



**Tabela 28. Interakcija analiziranih polimorfizama u VDR genu između kontrole i ukupne grupe pacijenata.**

N	Model	TrBA	TeBA	Sign test (p)	CVC
1	BsmI	0.5812	0.5371	6 (0.3770)	9/10
2	ApaI-BsmI	0.6228	0.5389	5 (0.6230)	7/10
3	FokI-ApaI-BsmI	0.6502	0.5513	7 (0.1719)	9/10
4	FokI-TaqI-ApaI-BsmI	0.6633	0.4772	3 (0.9453)	10/10

N-broj lokusa u modelu; TrBA-engl. *training balanced accuracy*, TeBA-engl. *testing balanced accuracy*; CVC-engl. *cross-validation consistency*, p-statistička značajnost testa

**Tabela 29. Interakcija analiziranih polimorfizama u VDR genu između kontrole i podgrupe sa primarnim infertilite tom.**

N	Model	TrBA	TeBA	Sign test (p)	CVC
1	BsmI	0.5790	0.5317	7 (0.1719)	10/10
2	FokI-BsmI	0.6169	0.5376	6 (0.3770)	9/10
3	FokI-TaqI-BsmI	0.6412	0.4574	2 (0.9893)	9/10
4	FokI-TaqI-ApaI-BsmI	0.6603	0.4481	4 (0.8281)	10/10

N-broj lokusa u modelu; TrBA-engl. *training balanced accuracy*, TeBA-engl. *testing balanced accuracy*; CVC-engl. *cross-validation consistency*, p- statistička značajnost testa

**Tabela 30. Interakcija analiziranih polimorfizama u VDR genu između kontrole i podgrupe sa sekundarnim infertilite tom.**

N	Model	TrBA	TeBA	Sign test (p)	CVC
1	ApaI	0.5995	0.4692	4 (0.8281)	5/10
2	ApaI-BsmI	0.6612	0.6432	8 (0.0547)	10/10
3	FokI-ApaI-BsmI	0.7058	0.6192	8 (0.0547)	10/10
4	FokI-TaqI-ApaI-BsmI	0.7268	0.5487	6 (0.3770)	10/10

N-broj lokusa u modelu; TrBA-engl. *training balanced accuracy*, TeBA-engl. *testing balanced accuracy*; CVC-engl. *cross-validation consistency*, p-statistička značajnost testa

**Tabela 31. Interakcija analiziranih polimorfizama u VDR genu između podgrupa sa primarnim i sekundarnim infertilite tom**

N	Model	TrBA	TeBA	Sign test (p)	CVC
1	ApaI	0.5725	0.4450	3 (0.9453)	6/10
2	FokI-BsmI	0.6289	0.4617	4 (0.8281)	6/10
3	FokI-ApaI-BsmI	0.6907	0.5258	6 (0.3770)	10/10
4	FokI-TaqI-ApaI-BsmI	0.7125	0.4625	4 (0.8281)	10/10

N-broj lokusa u modelu; TrBA-engl. *training balanced accuracy*, TeBA-engl. *testing balanced accuracy*; CVC-engl. *cross-validation consistency*, p-statistička značajnost testa

#### **4.4. Analiza multilokusnih interakcija svih ispitivanih polimorfizama**

Analiza interakcije gena svih ispitivanih lokusa zajedno (8 lokusa asociranih sa trombofilijom i 4 lokusa u *VDR* genu) nije pokazala postojanje značajne interakcije između gena, kao ni značajne razlike između ispitivanih grupa, kontrola *vs.* pacijenti, kontrola *vs.* primarni, kontrola *vs.* sekundarni, kao ni između primarnog i sekundarnog infertiliteta (prikazano na Tabelama 32, 33, 34 i 35). U ovu analizu nisu bili uključeni uzorci za koje nije dobijen genotip svih 12 lokusa.

**Tabela 32. Interakcija analiziranih polimorfizama gena za trombofilije i VDR gena između kontrole i ukupne grupe pacijenata.**

N	Model	TrBA	TeBA	Sign test (p)	CVC
1	BsmI	0.5818	0.5498	8 (0.0547)	6/10
2	PAI-BsmI	0.6356	0.5012	5 (0.6230)	7/10
3	PAI-FokI-BsmI	0.6993	0.5531	8 (0.0547)	5/10
4	M2-PAI-Fok-BsmI	0.7669	0.5174	6 (0.3370)	7/10
5	M2-PAI-ACE-FokI-TaqI	0.8498	0.5382	6 (0.3370)	6/10
6	M1-M2-PAI-ACE-FokI-TaqI	0.9020	0.4550	3 (0.9453)	3/10
7	M2-PAI-ACE-ITGB3-FokI-TaqI-BamI	0.9388	0.4443	3 (0.9453)	3/10
8	M1-M2-PAI-ACE -FokI-TaqI-ApaI-BsmI	0.9600	0.4685	3 (0.9453)	3/10
9	M1-M2-PAI-ATIII-ACE-FokI-TaqI-ApaI-BsmI	0.9767	NaN	3 (0.9453)	5/10
10	M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3-FokI-TaqI-ApaI-BsmI	0.9843	NaN	3 (0.9453)	7/10
11	FV-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3-FokI-TaqI-ApaI-BsmI	0.9843	NaN	3 (0.9453)	7/10
12	FV-FII-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3-FokI-TaqI-ApaI-BsmI	0.9843	NaN	5 (0.6230)	10/10

N-broj lokusa u modelu; TrBA-engl. *training balanced accuracy*, TeBA-engl. *testing balanced accuracy*; CVC-engl. *cross-validation consistency*, NaN- engl. *not a number*, p-statistička značajnost testa, M1-MTHFR 677 lokus, M2- MTHFR 1298 lokus.

**Tabela 33. Interakcija analiziranih polimorfizama gena za trombofilije i VDR gena između kontrole i podgrupe sa primarnim infertilitetom.**

N	Model	TrBA	TeBA	Sign test (p)	CVC
1	BsmI	0.5816	0.4506	3 (0.9453)	5/10
2	PAI-BsmI	0.6521	0.5291	7 (0.1719)	8/10
3	M2-ACE-BsmI	0.7178	0.4373	3 (0.9453)	4/10
4	M2-PAI-ACE-BsmI	0.8020	0.4082	4 (0.8281)	5/10
5	M1-M2-PAI-ACE-BsmI	0.8860	0.4766	5 (0.6230)	4/10
6	M2-PAI-ACE-FokI-TaqI-BsmI	0.9339	0.4668	3 (0.9453)	6/10
7	M1-M2-PAI-ACE-FokI-TaqI-BsmI	0.9630	NaN	4 (0.8281)	6/10
8	M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3-ApaI-BsmI	0.9782	0.4567	4 (0.8281)	2/10
9	FII-M1-M2-PAI-ACE-FokI-TaqI-ApaI-BsmI	0.9862	NaN	4 (0.8281)	4/10
10	FII-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-FokI-TaqI-ApaI-BsmI	0.9886	NaN	6 (0.3770)	5/10
11	FV-FII-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-FokI-TaqI-ApaI-BsmI	0.9886	NaN	6 (0.3770)	7/10
12	FV-FII-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3-FokI-TaqI-ApaI-BsmI	0.9886	NaN	6 (0.3770)	10/10

N-broj lokusa u modelu; TrBA-engl. *training balanced accuracy*, TeBA-engl. *testing balanced accuracy*; CVC-engl. *cross-validation consistency*, NaN- engl. *not a number*, p- statistička značajnost testa, M1-MTHFR 677 lokus, M2- MTHFR 1298 lokus.

**Tabela 34. Interakcija analiziranih polimorfizama gena za trombofilije i VDR gena između kontrole i podgrupe sa sekundarnim infertilitetom.**

N	Model	TrBA	TeBA	Sign test (p)	CVC
1	ApaI	0.6049	0.4484	3 (0.9453)	4/10
2	ApaI-BsmI	0.6648	0.5432	6 (0.3770)	7/10
3	PAI-FokI-BsmI	0.7292	0.4309	3 (0.9453)	3/10
4	M2-PAI-FokI-BsmI	0.8111	0.5806	7 (0.1719)	9/10
5	M2-PAI-ACE-FokI-TaqI	0.8953	0.5234	6 (0.3770)	9/10
6	M1-M2-PAI-ACE-FokI-TaqI	0.9396	NaN	3 (0.9453)	8/10
7	M1-M2-PAI-ACE-ITGB3-FokI-TaqI	0.9729	NaN	3 (0.9453)	5/10
8	M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3-FokI-TaqI	0.9862	NaN	3 (0.9453)	6/10
9	M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3-FokI-TaqI-ApaI	0.9934	NaN	3 (0.9453)	5/10
10	FII-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3-FokI-TaqI-BsmI	0.9962	NaN	0 (1.0000)	2/10
11	FV-FII-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3-FokI-TaqI-ApaI	0.9962	NaN	0 (1.0000)	2/10
12	FV-FII-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3-FokI-TaqI-ApaI-BsmI	0.9962	NaN	4 (0.8281)	10/10

N-broj lokusa u modelu; TrBA-engl. *training balanced accuracy*, TeBA-engl. *testing balanced accuracy*; CVC-engl. *Cross-validation consistency*, NaN- engl. *not a number*, p- statistička značajnost testa, M1-MTHFR 677 lokus, M2- MTHFR 1298 lokus.

**Tabela 35. Interakcija analiziranih polimorfizama gena za trombofilije i VDR gena između podgrupa sa primarnim i sekundarnim infertilitetom**

N	Model	TrBA	TeBA	Sign test (p)	CVC
1	ACE	0.5932	0.5050	6 (0.3770)	8/10
2	M1-FokI	0.6550	0.3783	0 (1.0000)	3/10
3	M1-PAI-FokI	0.7224	0.3233	0 (1.0000)	2/10
4	M1-ACE-FokI-ApaI	0.8229	0.4392	4 (0.8281)	5/10
5	M1-PAI-ATIII-FokI-ApaI	0.8975	0.3850	3 (0.9453)	4/10
6	M1-M2-PAI-ATIII-FokI-ApaI	0.9502	NaN	6 (0.3770)	5/10
7	FV-M1-M2-PAI-ACE-FokI-BsmI	0.9826	NaN	4 (0.8281)	2/10
8	FV-M1-M2-PAI-ACE-ITGB3-FokI-TaqI	0.9980	NaN	5 (0.6230)	2/10
9	FV-FII-M1-M2-PAI-ATIII-FokI-ApaI-BsmI	1.000	NaN	6 (0.3770)	8/10
10	FV-FII-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3-FokI-BsmI	1.000	NaN	5 (0.6230)	8/10
11	FV-FII-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3-FokI-TaqI-BsmI	1.000	NaN	4 (0.8281)	8/10
12	FV-FII-M1-M2-PAI-ATIII-ACE-ITGB3-FokI-TaqI-ApaI-BsmI	1.000	NaN	4 (0.8281)	10/10

N-broj lokusa u modelu; TrBA-engl. *training balanced accuracy*, TeBA-engl. *testing balanced accuracy*; CVC-engl. *Cross-validation consistency*, NaN engl. *not a number*, p- statistička značajnost testa, M1-MTHFR 677 lokus, M2- MTHFR 1298 lokus.

## 5. DISKUSIJA

## 5.1. Etiološki faktori i infertilitet

Imajući u vidu da venske tromboze imaju i genetičku i sredinsku osnovu, porodična anamneza pacijenta može da bude značajan faktor pri proceni individualnog rizika za reproduktivni neuspeh. Iako članovi porodice dele kako zajedničke genetičke, tako ponekad i zajedničke sredinske faktore, pozitivna porodična anamneza može da sugeriše postojanje jednog ili više naslednih faktora rizika, a najznačajnije informacije za ova stanja su postojanje krvarenja, tromboza ili komplikacija tokom trudnoće (Reich i sar., 2003). Naša studija pokazala je da pozitivna porodična anamneza može biti značajan prediktivni faktor za komplikacije tokom trudnoće. Naime, u našoj studiji uočeno je postojanje značajne razlike u javljanju pozitivne porodične anamneze za tromboze, kardiovaskularna oboljenja, spontane pobačaje i druge komplikacije tokom trudnoće, između kontrolne grupe i grupe pacijenata, kao i između kontrolne grupe i podgrupa sa primarnim i sekundarnim infertilitetom ( $p < 0.001$ ). Iako se razlozi za činjenicu da su naše ispitanice češće prijavljivale zdravstvene probleme kod članova svoje porodice, u odnosu na kontrolnu grupu, mogu tražiti delom i u specifičnom psihološkom stanju pacijentkinja suočenih sa reproduktivnim neuspehom, pozitivna porodična anamneza može biti značajan indikator reproduktivnog neuspeha i treba je uzeti u obzir prilikom razmatranja mogućeg naslednog uzroka idiopatskog infertiliteta. Ona može ukazati na značaj genetičkog testiranja kako bi se objasnio idiopatski infertilitet nastao usled poremećaja hemostaze i VDR regulisane transkripcije gena uključenih u reprodukciju.

Jedan od značajnih sredinskih faktora koji može uticati na začecje je i pušenje koje je najviše štetno za jajnike, a stepen oštećenja zavisi od količine i dužine vremena tokom kojih žena puši, ali i izloženosti duvanskog dima u okruženju. Nikotin i druge štetne hemikalije u cigaretama ometaju sposobnost tela da stvori estrogen, jedan od glavnih hormona koji regulišu folikulogenezu i ovulaciju. Takođe, pušenje utiče na folikule, embrionalni transfer, receptivnost



endometrijuma, angiogenezu endometrijuma, ali i na miometrijum materice i protok krvi u njoj (Dechanet et al, 2011). Međutim, naša studija nije uočila značajnu razliku u distribuciji pušača i nepušača između analiziranih grupa, što se može objasniti delom i činjenicom da je stopa konzumiranja duvana bila relativno visoka kako u ispitivanoj tako i u kontrolnoj grupi. Relativno, ali ne i značajno, niža stopa pušača u ispitivanoj grupi žena sa reproduktivnim problemima može se objasniti činjenicom da prilikom definisanja nepušačkog statusa nismo pravili razliku između pravih nepušača i bivših pušača, a da se žene, suočene sa reproduktivnim neuspehom, najpre odriču ove navike.

Pored toga, za fizičku aktivnost tokom trudnoće pokazano je da ima nekoliko pozitivnih efekata na majku, fetus i novorođenčad. Pregledom revijskih radova zaključuje se da fizička aktivnost majke nema uticaj na varijabilnost srčanog rada majke, ali može imati efekat na povećanje srčanog rada kod fetusa i novorođenčadi (Dietz i sar., 2016). Naša studija nije uočila značajnu razliku u učestalostima bavljenja sportom između ispitivanih grupa.

## 5.2. Nasledna trombofilija

Hemostaza i koagulacija krvi vrlo su važni mehanizmi, kako za začeće tako i za uspešnu trudnoću i porođaj. Mnogobrojni podaci podržavaju koncept da abnormalna koagulacija krvi, generano definisana kao prisustvo protrombotičnog stanja (uzrokovan naslednim ili stečenim faktorima), igra veoma važnu ulogu u reproduktivnom ishodu i može se naći u 40-70% slučajeva ponovljenih spontanih abortusa ili klinički neobjašnjelog infertiliteta (La Farina i sar., 2016). Pored toga, pojava mnogih komplikacija u toku trudnoće, kao što su: preeklampsija, intrauterina restrikcija rasta, prevremeni porođaj, prevremena ruptura membrane i smrt fetusa, mogu se objasniti istim mehanizmom (Liatsikos i sar., 2016; Mastrolia i sar., 2015). Izračunato je da se oko 25% začeća i oko 15% klinički potvrđenih trudnoća završavaju spontanim pobačajem, dok se tri i više uzastopnih gubitaka ploda dešavaju kod oko 1-2% žena reproduktivnih godina. Identifikovano je nekoliko mogućih uzroka ovih gubitaka ploda, ali oko 38% njih ostaje neobjašnjeno (Liatsikos i sar., 2016). Sugerisano je da trombofilija može biti jedan od faktora za ovu pojavu. Dosadašnji rezultati genetičkih studija asocijacije sa ponovljenim gubicima ploda u prvom trimestru trudnoće su raznoliki. Novija meta-analiza, koju su sprovedli Rodger i saradnici (2010), je ukazala na povećan rizik za RPL kod nosioca *FVL* mutacije, dok ovaj rizik nije uočen u odnosu na *FII* protrombin izmenu. Iako su rezultati nekonzistentni, većina studija sugerise postojanje asocijacije između mutacija *FVL* i *FII* mutacije i ranog gubitka ploda (Liatsikos i sar., 2016). Kontradiktornost rezultata uočava se i u studijama asocijacije *FVL* i *FII* mutacije sa preeklampsijom, intrauterinom restrikcijom rasta i abrupcijom placente, dok je jasna asocijacija pokazana između nasledne trombofilije i pojave venskih tromboza u toku trudnoće (Tabela 36, Liatsikos i sar., 2016). Pored majčinog genotipa, novije studije okreću se i analizi fetalnog genotipa kao značajnog faktora za pojavu mnogih komplikacija i neželjenih ishoda. Studija Yalcintepe i saradnika (2015) je ukazala da određeni polimorfizmi u

genetičkom materijalu fetusa mogu da budu uzročnici spontanog pobačaja jer se učestalije javljaju kod abortiranog fetusnog materijala u odnosu na genotipove majke i zdrave fertilne kontrole. Njihova studija je sugerisala da ukoliko fetalni genotip može da dovede do spontanog pobačaja, to znači da ne samo genotip majke nego i genotip oca može da predstavlja faktor rizika za gubitak ploda i treba se testirati. Ova saznanja mogu pomoći u objašnjavanju nekonzistentnosti rezultata u dosadašnjoj literaturi ukazujući na kompleksnost procesa koagulacije ne samo kod majke, nego i kod ploda. Osim toga, jako malo istraživačkih studija u humanoj populaciji mogu da se sprovedu na homogenim uzorcima, pogotovo kada je u pitanju tako kompleksan fenomen kao što je trudnoća, što takođe može biti jedan od faktora koji dovodi kontradiktornih zaključaka.

**Tabela 36. Asocijacija nasledne trombofilije sa gubitkom ploda i drugim komplikacijama tokom trudnoće (Laitsikos i sar., 2016-preuzeto, modifikovano).**

Kliničko stanje	<i>FVL</i>	<i>FII</i>	PC def.	PS def.	AT def.
Ponovljeni neuspeh implantacije	-/+	-	0	0	0
Gubitak ploda u 1. trimestru	+	+	0	0	0
Gubitak ploda u 2. i 3. trimestru	+	+	0	+	0
Preeklampsija	-/+	-/+	0	0	0
IUGR	-/+	-/+	0	0	0
Abrupcija placente	-/+	-/+	0	0	0
VTE	++	++	+	+	+

*FVL* 1961 G>A mutacija, *FII* 20210 G>A mutacija, PC def. Protein C deficijencija, PS def. Protein S deficijencija, AT def. Antitrombin deficijencija, PNI-ponovljeni neuspeh implantacije, 0 nedovoljan broj podataka, - nema asocijacije, +/- kontradiktorni rezultati asocijacije, + slaba asocijacija, ++ jaka asocijacija

Osim analiza trombofilija, koje se danas široko primenjuju kod pacijenata sa simptomatskim trombozama ili komplikacijama uzrokovanim poremećajima hemostaze, sve više se ove analize sprovode i kod žena, ne samo u postupku asistirane reprodukcije, nego i pre sprovođenja same procedure, kako bi se smanjili mogući negativni ishodi. Studija Qublan i saradnika (2006) je pokazala

da nasledna trombofilija može biti značajan faktor za ponovljene neuspešne IVF procedure. Ova studija je uočila da se *FVL* mutacija nalazi u homozigotnom obliku sa učestalošću od 4.4% (4/90) u grupi pacijentkinja sa 3 ili više neuspešnih IVF postupaka, dok se u zdravoj kontrolnoj grupi, kao i u kontrolnoj grupi koju su činile žene sa uspešnom IVF procedurom, nije detektovao ni jedan uzorak u homozigotnom obliku. Takođe je pokazana veća učestalost heterozigotnih nosioca (10%) kod žena sa neuspešnim IVF procedurama u odnosu na zdravu kontrolnu grupu (1.1%) i grupu žena sa uspešnim IVF procedurama (2%). Homozigotna izmena na poziciji 677 *MTHFR* lokusa pokazala se kao statistički značajno učestalija kod žena sa višestrukim IVF neuspehom ( $p < 0.05$ ) (Qublan i sar., 2006). Međutim, relativno niska prijavljena učestalost izmene C>T na poziciji 677 *MTHFR* gena u svim ispitivanim grupama u ovoj studiji na jordanskoj populaciji, u odnosu na rezultate drugih studija na istoj etničkoj grupi (Al-Motassem i sar., 2015), može ukazivati na razlike u preciznosti genotipizacije u ovim studijama. Saznanje da nasledna trombofilija može predstavljati rizik za ponovljene neuspehe implantacije prilikom IVF procedure ukazalo je da ovi markeri mogu imati ulogu u mehanizmima uključenim u proces implantacije embriona i potencijalno uzrokovati idiopatski infertilitet. Rezultati ovih studija nisu konzistentni. Studija Coulam i saradnika (2009) u američkoj populaciji ukazala je na moguću asocijaciju *MTHFR* 677 polimorfizma sa idiopatskim infertilitetom, dok u evropskim studijama ova asocijacija nije potvrđena (Casadei i sar., 2010). U populaciji Italijana nije uočeno postojanje asocijacije između nasledne trombofilije (*FVL*, *FII* 20210 G>A i *MTHFR* 677 C>T) i neuspeha asistirane reprodukcije, pa samim tim ni rutinske antikoagulantne terapije kod žena koje su u procesu IVF-a (Martinelli i sar., 2003). U kontrastu sa dobijenim rezultatima, meta analiza, koja je uključila 10 studija asocijacije nasledne trombofilije sa neuspehom implantacije na evropskim populacijama, pokazala je da je jedino *FVL* mutacija asocirana sa ovom pojavom (Di Nisso i sar., 2011).

Prethodna istraživanja gena asociranih sa trombofilijom u Srbiji pokazala su da postoji asocijacija između polimorfizma *FVL*, *FII* 20210 G>A i *MTHFR* 677 C>T i pojave dubokih venskih tromboza, kao i između navedenih polimorfizama i komplikacija tokom trudnoće (Đorđević i sar., 2011; Đurović i sar., 2017a; Kovač i sar., 2010; Mitić i sar., 2010). Najveća značajnost pokazana je između *FVL* mutacije i pojave venskih tromboza u toku trudnoće, sa povećanim rizikom za ova stanja od 17.9 puta. Takođe, značajno veća učestalost *FVL* mutacije dobijena je kod žena sa ponovljenim gubicima ploda, u odnosu na zdravu kontrolnu grupu (Kovač i sar., 2010). Nasledna trombofilija nađena je mnogo češće u grupi žena sa gubitkom ploda pre 12. gestacione nedelje, nego u grupi pacijentkinja koje su kasnije izgubile plod (Mitić i sar., 2010). U grupi pacijentkinja sa intrauterinom smrtnošću ploda, najučestalija trombofilija bila je *FII* 20210A koja dovodi do 7.1 puta većeg rizika za ovu patologiju u odnosu na kontrolnu grupu (Kovač i sar., 2010). I kod pacijenata sa dubokim venskim trombozama, polimorfizmi *FVL* i *FII* protrombin su se pokazali kao značajni faktori rizika (Đorđević i sar., 2011). Velika studija koja je sprovedena na populaciji Srbije, a delom i u našoj laboratoriji, u koju je bilo uključeno 1631 pacijentkinja sa infertilitetom i komplikacijama tokom trudnoće, pokazala je značajnu asocijaciju *FVL* mutacije sa ovom pojavom (Đurović i sar., 2017a). Ovakvi rezultati ukazivali su na moguću ulogu ovih polimorfizama i kod idiopatskog infertiliteta što do sada nije bilo ispitivano u našoj etničkoj grupi. Naši rezultati potvrdili su značaj testiranja pojedinačnih genskih lokusa 1691 u *FV* genu, kao i lokusa 20210 u *FII* genu kod žena sa idiopatskim infertilitetom. Pored toga, rezultati naše studije su prvi ukazali i na moguću SNP-SNP interakciju između analiziranih polimorfizama koja može da dovede do formiranja visokorizičnih genotipova ukazujući na značaj testiranja panela polimorfizama u genima asociranim sa trombofilijom, što će biti diskutovano u narednim poglavljima.

### 5.2.1. Pojedinačni lokusi u genima asociiranim sa trombofilijom

Ispitivanja pojedinačnih lokusa u našem radu pokazala su odstupanje od očekivanih proporcija u kontrolnoj grupi za polimorfizme *MTHFR* 1298 A>C, *ACE* I/D, kao i za *Apal* i *BsmI* u *VDR* genu. U ukupnoj grupi pacijenata uočeno je odstupanje za polimorfizme *FV* 1691 G>A i *FII* 20210 G>A, u podgrupi sa primarnim infertilitetom za *FII* 20210 G>A, a u podgrupi sa sekundarnim infertilitetom za polimorfizme *FV* 1691 G>A i *ITGB3* 1565 T>C. Ostali analizirani lokusi u ispitivanim grupama bili su u skladu sa očekivanim proporcijama iz HWE. Odstupanje koje se javlja u kontrolnoj grupi, a koje se uočava i u drugim studijama asocijacije polimorfizama i bolesti, može biti objašnjeno greškom pri genotipizaciji ili raznolikosti populacije, kao i greškom prilikom prikupljanja uzoraka, a rezultate treba razmatrati pažljivo jer možda ne oslikavaju stvarne učestalosti u zdravoj populaciji (Kocsis i sar., 2004). Odstupanje od očekivanih učestalosti u grupi pacijenata uočeno je i u nekim drugim studijama (D' Amico i sar., 2013; 2015), a može biti još jedan dokaz o mogućoj patološkoj ulozi ovih mehanizama u nastanku tromboza. Ukoliko postoji odstupanje u ispitivanoj grupi to može biti dodatni dokaz o postojanju asocijacije između genotipa i ispitivane bolesti. Čak i u situacijama kada nije uočeno postojanje značajne razlike u učestalostima alela i genotipova između ispitivane i kontrolne grupe, odstupanje od očekivanih učestalosti u ispitivanoj grupi može predstavljati moguću asocijaciju (Kocsis i sar., 2004). Povećanje homozigotnih nosilaca za mutaciju i smanjenje heterozigotnosti dovelo je do odstupanje od HW ravnoteže u našoj grupi pacijentkinja. Ovakvo odstupanje od očekivanih učestalosti dodatno je ukazivalo na moguću asocijaciju ovih polimorfizama sa idiopatskim infertilitetom, što je i potvrđeno za *FVL* i *FII* protrombin mutaciju u narednim analizama koje su sprovedene u našoj studiji.

U narednim odeljcima biće pojedinačno diskutovani polimorfizmi asociirani sa naslednom trombofilijom koji su ispitivani u našoj studiji.

➤ **FV 1691 G>A**

Testiranje na *FVL* mutaciju je jedno od najčešćih genetičkih testiranja proteklih godina. Jedna od prvih studija asocijacije nakon otkrića *FVL* mutacije pokazala je da APC rezistencija uzrokovana ovom izmenom predstavlja značajan faktor rizika za nastanak dubokih venskih tromboza. Ova izmena ustanovljena je kod oko 20-25% pacijenata sa VTE i kod oko 50% pacijenata sa porodičnom trombofilijom (Kujovich, 2011). Rizik za VTE uvećan za 6.5-8.0 puta (u zavisnosti od starosne dobi) kod osoba koje su heterozigotni nosioci ove mutacije, dok je rizik kod homozigotnih nosioca povećan od 30 do 140 puta u odnosu na zdravu kontrolnu grupu (Rosendaal i sar., 1995). Ova mutacija pokazala se kao značajna i u studijama asocijacija sa različitim trombozama (D'Amico i sar., 2013; Liatsikos i sar., 2016), ali rezultati u dosadašnjoj literaturi nisu konzistentni sugerišući da rutinsko testiranje nije uvek opravdano (Margaglione i sar., 2001; Young i sar., 2009; Mansilha i sar., 2005). Ova mutacija ispitivana je i analizirana i u velikom broju studija asocijacije sa reproduktivnim poremećajima. Neke studije pokazale su da je *FVL* glavni nasledni faktor rizika asociiran sa RPL pojavom (Finan i sar., 2002), dok su neke ukazale na postojanje srednjeg rizika ili su kod RPL žena ustanovile povećanu učestalost ove mutacije, koja nije dostigla statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (Yenicesu i sar., 2010). Nasuprot ovim rezultatima, studija Preston i saradnika (1996), koja je ispitivala asocijaciju gubitka ploda sa naslednom trombofilijom, nije uočila postojanje povećanog rizika za gubitak ploda kod žena koje su bile nosioci *FVL* mutacije. Meta analize (Biron-Andreani i sar., 2009; Rodger i sar., 2010) pokazale su da postoji asocijacija između gubitka ploda i homozigota za *FVL* mutaciju, sa 11 puta povećanim rizikom u odnosu na žene koje nisu nosioci ove izmene. Iako su rezultati nekonzistentni, većina studija sugeriše postojanje asocijacije između *FVL* i *FII* protrombin mutacije i ranog gubitka ploda (Liatsikos i sar., 2016). Kontradiktornost rezultata uočava se i u studijama asocijacije *FVL* mutacije i sa nekim drugim komplikacijama

tokom trudnoće, kao što su abrupcija placente, preeklampsija i intrauterina restrikcija rasta. Jedan od mogućih razloga za ove nekonzistentne rezultate može biti prisustvo visokorizičnog alela u drugim genima kod ispitivanih pacijenata (Coulam i sar., 2006b; Dissanayake i sar., 2012).

U našoj studiji, 13 identifikovanih ispitanika sa *FVL* mutacijom (4 u kontrolnoj i 7 u grupi pacijentkinja kao heterozigotni nosioci i 2 pacijentkinje kao homozigotni nosioci mutacije) imale su APCR vrednost ispod granice (podaci nisu prikazani) što je bilo u saglasnosti sa predhodno pokazanom asocijacijom ove mutacije i povećane rezistencije na APC protein (Bertina i sar., 1994). Utvrđeno je da postoji značajna razlika u učestalosti mutiranog A alela između kontrolne grupe i ukupne grupe pacijentkinja, kao i između kontrole grupe i podgrupe sa primarnim infertilitetom. Proračunat rizik za nastanak infertiliteta u ukupnoj grupi pacijentkinja uključenih u našu studiju bio je na granici statističke značajnosti (OR: 3.157,  $p=0.054$ ), dok je rizik za nastanak primarnog infertiliteta izračunat kao 4 puta veći u odnosu na kontrolnu grupu (OR: 4.110,  $p=0.027$ ). Rezultati dosadašnjih ispitivanja ukazali su na to da osobe koje su nosioci *FVL* mutacije, u situacijama povećanog rizika za trombotička stanja, kao što su putovanja, operacije i trudnoća, treba da primaju profilaktičke doze antikoagulantne terapije. Rezultati naše studije jedni su od prvih rezultata koji ukazuju na značaj testiranja *FVL* mutacije, ne samo kod žena koje su imale spontane pobačaje i druge komplikacije tokom trudnoće, nego i kod asimptomatskih žena sa primarnim infertilitetom. Potencijalno uključivanje profilaktičke doze antikoagulantne terapije kod žena sa idiopatskim infertilitetom koje su nosioci ove izmene, može dovesti do poboljšanja mikro cirkulacije na nivou reproduktivnih organa i potencijalno do olakšane fertilizacije i uterusne implantacije oplođenog embriona. Ovakva saznanja otvaraju vrata daljim ispitivanjima da li profilaktička terapija antikoagulansima može biti efikasna u tretmanu infertiliteta pre započinjanja ART procedura, kako bi se dala šansa prirodnom začeću.



➤ **FII 20210 G>A**

U populaciji belih ljudi pokazano je da nosioci *FII* varijantnog alela A imaju 1.87 puta povećan rizik za nastanak venskih tromboza u odnosu na nosioce wt G alela, što se objašnjava dokazanom povećanom koncentracijom protrombina u plazmi kod nosioca alela A (Folsom i sar., 2002). Međutim, kao i za ostale polimorfizme asocirane sa trombofilijom, rezultati ispitivanja nisu konzistentni. Studija Bosler i saradnika (2006) je u svojoj ispitivanoj grupi, identifikovala 36.7% nosioca *FII* mutacije koji su bili asimptomatski. Jedno od mogućih objašnjenja za ovu pojavu, kao i za nekonzistentnost rezultata u literaturi, su dodatni faktori rizika (kao što su operacije, pušenje, putovanja, imobilizacija, oralni kontraceptivi, trudnoća...). U navedenoj studiji (Bosler i sar., 2006) i drugi faktori rizika su bili prisutni kod 75.6% identifikovanih osoba, što ukazuje na značajnost dodatnih faktora koji mogu biti okidači u patologiji trombotičkih događaja kod nosioca *FII* izmene.

Ova izmena ispitivana je i asocirana sa različitim stanjima u toku trudnoće. Novija meta analiza (Liatsikos i sar., 2016) utvrdila je postojanje visoke asocijacije *FII* protrombin mutacije i venskih tromboza u toku trudnoće ali je ukazala i na postojanje kontroverznih rezultata asocijacije ove izmena sa preeklampsijom, intrauterinom restrikcijom rasta i abrupcijom placente, dok nije uočena njegova veza za neuspehom implantacije (De Maat i sar., 2004). Studija Pileri i saradnika (2010) ukazala je da ne postoji značajna veza između maternalne nasledne trombofilije i IUGR ali je pokazala značajnu asocijaciju između IUGR i prisustva *FII* protrombin mutacije kod fetusa u slučaju kada nije prisutna maternalna preeklampsija ili hipertenzija. Ovakvi rezultati sugerisali su da prisustvo fetalne trombofilije može dovesti do zastoja u razvoju fetusa. Takođe, rezultati velike studije sprovedene u Finskoj nisu pokazali postojanje asocijacije ovog polimorfizma sa prevremenim rođenjem deteta, kao jednim od glavnih uzročnika neonatlanog morbiditeta i mortaliteta (Hiltunen i sar., 2011).

Naša studija uočila je postojanje značajne razlike u distribuciji alela i genotipova između kontrolne grupe i ukupne grupe pacijentkinja, kao i između kontrolne i podgrupe sa primarnim infertilitetom. Rizik za nastanak primarnog infertiliteta kod nosioca A alela povećan je 14 puta u odnosu na kontrolnu grupu (OR: 14.127,  $p=0.015$ ), dok je kod heterozigotnih nosioca rizik povećan 10 puta (OR: 10.360,  $p=0.027$ ) u odnosu na kontrolnu grupu. Kao i u slučaju *FVL* mutacije, ovi rezultati ukazuju na značajnost testiranja ovih izmena kod žena sa primarnim infertilitetom. Kod podgrupe pacijenata sa sekundarnim infertilitetom koje su, većinom imale gubitak ploda u prvom trimestru trudnoće (45 od 59 ispitanica), u našem radu nije pokazana značajna prevalenca ove mutacije. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodnim ispitivanjima u Srbiji, koja su pokazala da je nasledna trombofilija (*MTHFR* 677, *FVL* i *FII* polimorfizmi) asocirana sa gubitkom ploda koji se desio posle 12. gestacione nedelje, dok u slučajevima kada se gubitak desio pre 12. nedelje nije uočeno postojanje asocijacije sa naslednom trombofilijom (Mitić i sar., 2010). Međutim, rezultati prikazani u revijskom radu su pokazali da *FII* 20210 G>A izmena dovodi do povećanog rizika za gubitak ploda kako u prvom, tako i u drugom i trećem trimestru trudnoće (De Santis i sar., 2006; Liatsikos i sar., 2016). U našoj studiji podela grupe ispitanika na podgrupe primarnog i sekundarnog infertiliteta dovela je do formiranja manjih podgrupa, što bi mogao biti uzrok izostanka značajnih razlika kod podgrupe sa sekundarnim infertilitetom. Međutim, i kod ove grupe u svim poređenjima u odnosu na *FII* polimorfizam u našoj studiji, se ističe trend ka približavanju granici značajnosti ( $p=0.056$ ;  $p=0.092$ ;  $p=0.097$ ; Tabela 9, 10 i 11).

➤ ***MTHFR* 677 C>T i 1298 A>C**

Dve polimorfne varijante *MTHFR* gena, 677 C>T i 1298 A>C, otkrivene su pre nešto više od 20 godina i od tada su bile predmet ispitivanja i asocijacije sa različitim medicinskim stanjima (Kang i sar., 1988; Weisberg i sar., 2001.; Levin i Varga, 2016). Ispitivanje funkcionalnih posledica izmena na ovim pozicijama su

uglavnom konzistentna, ukazuju na termolabilnost, kao i na smanjenu funkciju MTHFR enzima. Međutim, rezultati studija asocijacije *MTHFR* polimorfizama i različitih patologija, posebno komplikacija tokom trudnoće, dosta su raznoliki. Objašnjenje za to može biti mali broj uzoraka u pojedinačnim studijama, ali i zavisnost ishrane i unetih nutrijenata na folatni put i nivo homocisteina u plazmi. Naši rezultati bili su u saglasnosti sa prethodnim studijama u Srbiji u kojima nije uočena asocijacija između maternalnog *MTHFR* 677 lokusa i venskih tromboza, gubitaka ploda ili hronične mijeloidne leukemije (Đorđević i sar., 2011; Jakovljević i sar., 2012; Kovač i sar., 2010). Studija Tiwari i saradnika (2015) je pokazala da postoji veza između ove mutacije i prevremenog porođaja, fetalne smrti i manje težine deteta na rođenju. Studije koje su testirale obe pozicije zajedno, 677 C>T i 1298 A>C, su pokazale da prisustvo varijantnog alela na oba lokusa dovodi do povećane redukcije specifične aktivnosti MTHFR enzima, povećanog nivoa homocisteina u plazmi, kao i smanjenog nivoa folata (Weisberg i sar., 2001). Ispitivanja oba lokusa pokazala su da postoji njihova asocijacija sa pojavom RPL-a i ranog gubitka ploda (Parveen i sar., 2013; Yang i sar., 2016), kao i da kombinovani heterozigotni genotip može biti značajan faktor rizika za intrauterinu restrikciju rasta (Coriu i sar., 2014b). Ovakvi rezultati sugerisali su da *MTHFR* 1298 lokus može predstavljati dodatni faktor rizika za stanja zavisna od homocisteina i folatnog metabolizma (Van der Put i sar., 1998). Skorašnji rezultati meta analiza Yang i saradnika (2016) ukazali su na postojanje asocijacije između maternalnog i paternalnog genotipa na 677 i 1298 lokusu *MTHFR* gena, a takođe je uočena i asocijacija između fetalnog 1298 A>C polimorfizma i rizika za gubitak ploda. Velika meta analiza Cao i saradnika (2013a), u kojoj je uključeno 37 populacija širom sveta, pokazala je postojanje asocijacije *MTHFR* 677 genotipa i neobjašnjenih gubitaka ploda u Azijskoj grupi i ukupnoj grupi ispitanika, dok asocijacija nije uočena u populaciji belih ljudi. Ista studija nije pokazala postojanje asocijacije polimorfizma na poziciji 1298 *MTHFR* gena ni u jednoj ispitivanoj grupi.

Jedna od hipoteza ispitivanja ove dve pozicije u okviru *MTHFR* genskog lokusa bila je da se visokorizične varijante javljaju uvek u *trans* konfiguraciji, definišući tri moguća haplotipa 677C-1298A, 677T-1298A i 677C-1298T (Ogino i Wilson, 2003; Ulvik i sar., 2007). Mnoge studije koje su citirane u analizi Ogino i Wilson (2003), nisu detektovale ni jednu osobu sa više od dva visokorizična alela na ova dva *MTHFR* lokusa, što je u saglasnosti i sa našim dobijenim rezultatima. Sa druge strane, 677CT/1298CC i 677TT/1298CC genotipovi (kombinacije sa 3 ili 4 visokorizična alela) detektovani su u abortiranom fetalnom materijaju, dok takav genotip nije pronađen u neonatalnoj grupi (Isotalo i sar., 2000). Ovakvi rezultati ukazivali su na moguću ulogu ovih genotipova u fetalnoj vijabilnosti. Ista studija identifikovala je nosioce 677TT/1298AC genotipa ali sa veoma malom učestalošću, i u neonatalnoj i u grupi abortiranog fetalnog materijala sugerišući mogućnost postojanja *cis* konfiguracije ovih visokorizičnih varijanti. U studiji Weisberg i saradnika (1998) identifikovano je jedno dete sa NTD koje je bilo nosilac *MTHFR* 677TT/1298AC genotipa, podržavajući teoriju postojanja *cis* konfiguracije. Međutim, meta analiza Ogino i Wilson (2003) sugerisala je da ekstremno retki diplotipovi CT/CC, TT/AC, TT/CC u analiziranim studijama mogu biti objašnjeni pogrešnom genotipozacijom usled nedetekcije jednog alela (Blais i sar., 2015) i da se *cis* konfiguracija *MTHFR* mutacija dešava ili *de novo* ili kroz rekombinaciju, ali da ovi događaji dovode do pojave teških nevijabilnih patologija, NDT-a ili spontanih pobačaja. U saglasnosti sa drugim istraživačima (Van der Put i sar., 1998; Hanson i sar., 2001) naša studija nije detektovala ni jedan uzorak sa homozigotnom mutacijom na oba lokusa (677TT/1298CC), niti kombinacije sa tri visokorizična alela. Pored toga, kod oko 400 analiziranih žena u Srbiji, nije detektovan ni jedan ovakav genotip (Đurović i sar., 2017b), podržavajući teoriju o *trans* konfiguraciji ispitivanih lokusa.

Naša studija nije uočila postojanje značajne asocijacije u distribuciji pojedinačnih genotipova i alela za oba ispitivana polimorfizma u *MTHFR* genu, niti kombinacije genotipova dobijenih ispitivanjem oba lokusa zajedno. Iako je

asocijacija između homozigotnih mutacija 677TT i 1298CC, kao i dvostrukih heterozigota na obe pozicije, smanjene aktivnosti enzima i posledično povećanog nivoa homocisteina dosta dobro opisana, varijabilnost u kliničkom efektu ovih mutacija i izostanak asocijacija u pojedinim studijama, među kojima su i rezultati našeg rada, može biti objašnjena postojanjem nekih drugih faktora (kao što je povećan nivo folata i unosa vitamina B). Još uvek nije dovoljno jasno da li žene sa homozigotnom mutacijom u *MTHFR* genu treba da budu na antikoagulantnoj terapiji, mada je pokazano da kod ovih pacijentkinja folatna suplementacija dovodi do snižavanja homocisteina, čime se smanjuje rizik za neželjena stanja (Malinow i sar., 1997). Bez obzira na kontroverzne rezultate u literaturi u vezi sa postojanjem asocijacije *MTHFR* polimorfizama i komplikacija tokom trudnoće, ove analize sve više postaju deo rutinske i dijagnostičke prakse kod žena sa reproduktivnim neuspehom, pružajući značajne informacije lekarima o mogućim poremećajima folatnog metabolizma. Osim toga, neke studije sugerisale su da izmene u *MTHFR* genu, uz postojanje visokorizičnih alela i na nekim drugim genskim lokusima asociраним sa trombofilijom, mogu dovesti do povećanog rizika za neželjena stanja. Rezultati naše studije pokazali su da *MTHFR* 677 i *MTHFR* 1298 lokus stupaju u SNP-SNP interakciju sa *PAI-1*, *ACE* i *ITGB3* ispitivanim polimorfizmima i dovode do povećanog rizika za nastanak sekundarnog infertiliteta, što će biti diskutovano u zasebnom poglavlju (poglavlje 5.2.2.).

➤ ***PAI-1 -675 4G/5G***

Rezultati ispitivanja učestalosti alela i genotipova u *PAI-1* genu u našoj studiji bili su slični sa prethodno dobijenim učestalostima u populaciji Srbije i zemljama u regionu, kao što su Hrvatska, Makedonija, Grčka i Italija (Đorđević i sar., 2011; Đorđević i sar., 2013). Smanjena fibrinoliza, nastala kao posledica povećane plazmatske koncentracije ovog proteina, predstavlja značajan faktor rizika za nastanak tromboza (D' Amico i sar., 2013; 2015; Sartori i sar., 1998), a nekoliko studija pokazalo je da nosioci 4G alela imaju povećan rizik za infarkt

miokarda (Eriksson i sar., 1995; Ossei-Gerning i sar., 1997) ukazujući na značajnu ulogu ovog polimorfizma u hemostatskom balansu. Zanimljivo je napomenuti da se, iako dovodi do hipofibrinolize, 4G alel nalazi sa visokom učestalošću u populaciji (oko 50%) što ukazuje na mogući koristan efekat ove izmene. U nekim radovima ukazano je na postojanje protektivne uloge 4G4G genotipa u nastanku stabilne koronarne arterijske bolesti, moždanog udara i cerebrovaskularnih bolesti (Jood i sar., 2005; Onalan i sar. 2008; Roest i sar., 2000) što može biti jedan od razloga zbog čega se ova varijanta održava u populaciji sa ovako visokom učestalošću.

Polimorfizam 4G/5G u *PAI-1* genu ispitivan je i asociiran u različitim stanjima tokom trudnoće. Rezultati naše studije nisu pokazali postojanje značajne razlike u učestalostima genotipova i alela između kontrole i ukupne grupe pacijenata, kao ni između kontrole i ispitivanih podgrupa ali dosadašnji rezultati su pokazali da ova izmena može biti značajan faktor rizika za rani gubitak ploda (Dossenbach-Glaninger i sar., 2003), ali i za neuspešnu embrio implantaciju ukazujući na značaj testiranja ovog polimorfizma kod žena sa idiopatskim infertilitetom. Hipofibrinoliza koja nastaje usled 4G izmene u ovom genu može biti značajna u kombinaciji sa dodatnim faktorima za poremećaje u koagulacionoj kaskadi. Naši rezultati ukazali su na moguću interakciju *PAI-1* 4G/5G polimorfizam sa lokusima *MTHFR* 677 i 1298, *ITGB3* i *ACE*, dovodeći do formiranja visokorizičnih genotipova za pojavu sekundarnog infertiliteta, što će biti diskutovano u zasebnom poglavlju (5.2.2.).

#### ➤ **ATIII 786 G>A**

Antitrombin je prirodni antikoagulans koji ima značajnu ulogu u toku trudnoće. Studije ispitivanja nivoa antitrombina u toku trudnoće pokazale su da je ukupni antitrombin smanjen za oko 20% od svoje bazične vrednosti, što je u saglasnosti sa povišenim faktorima koagulacije u toku trudnoće, kako bi se smanjio rizik od krvarenja i mogućeg gubitka ploda usled krvarenja. Takođe je pokazano da je od 25 nedelje do porođaja nivo ATIII negativno korelisano sa

gestacionom nedeljom, opadajući za oko 13% tokom ovog vremena (James i sar., 2014). Neonatusi imaju manju količinu ATIII proteina, koji dostiže adultni nivo do 6 meseca života. Ustanovljeno je da žene koje koriste oralne kontraceptive imaju niži nivo ATIII, ali se smatra da ovo smanjenje nije klinički značajno (Patnaik i Moll, 2008). Uočeno je postojanje značajne asocijacije između nasledne deficijencije ovog proteina i razvoja tromboembolizma u toku trudnoće (Patnaik i Moll, 2008). Ovaj rizik je još veći ukoliko trudnica nije na profilaktičkoj, antikoagulantnoj terapiji. Smatra se da je kod žena koje imaju ATIII deficijenciju, a nisu predhodno imale VTE, šansa za pojavu VTE u toku trudnoće 31%, dok je kod žena koje su imale predhodno epizodu VTE ta šansa još veća i iznosi 49% (Patnaik i Moll, 2008). Rizik za gubitak ploda je nešto malo povećan kod žena koje imaju ATIII deficijenciju. Studija Preston i saradnika (1996) je pokazala da je 19.2% trudnica koje su imale ATIII deficijenciju izgubilo plod, u odnosu na 12.2% žena bez nasledne trombofilije. Ova studija je pokazala da se gubitak ploda kod žena koje su imale ATIII deficijenciju dogodio u 2.3% slučajeva posle 28 nedelje, dok je taj procenat iznosio 16.9% u grupi sa gubitkom ploda pre 28 nedelje (Preston i sar., 1996).

Izmena u intronu 1 *ATIII* gena (rs2227589) ispitivana je u studijama asocijacije sa trombozama, deficijencijom antitrombina i komplikacijama tokom trudnoće. Pokazano je da je ova izmena asociirana sa trombozama, ali da nije uzročnik nasledne antitrombin deficijencije (Bezemer i sar., 2008; Sharma i sar., 2015). U studiji asocijacije ovog polimorfizma i ATIII deficijencije, pokazano je da je od 25 pacijenata sa ATIII deficijencijom, 11 imalo heterozigotni GA genotip, dok je samo jedan pacijent imao homozigotni AA genotip ove izmene (Sharma i sar., 2015). Uočena razlika u učestalosti mutiranog alela nije dostigla statističku značajnost tako da se ova mutacija ne smatra uzročnikom ATIII deficijencije. Ispitivanja asocijacije ovog polimorfizma sa trudnoćom i ponovljenim gubicima ploda su malobrojna. Asocijacija rs2227589 polimorfizma u *ATIII* genu sa ponovljenim gubicima ploda prvi put je pokazana 2012. godine od strane

Guerra-Shinohara i saradnika. Ova studija sugerisala je da postoji povećan rizik za gubitak ploda kod žena koje su nosioci AG ili GG genotipa, dok kasnije studije nisu uočila postojanje ove asocijacije (Cao i sar., 2013b; Sharma i sar., 2015).

U našoj studiji izostaje značajna asocijacija ove mutacije sa infertilitetom, kako sa primarnim tako i sa sekundarnim, što je u saglasnosti sa prethodnim studijama ispitivanja asocijacije ovog polimorfizma sa ponovljenim gubicima ploda (Cao i sar., 2013b; Sharma i sar., 2015). Takođe, naša studija je pokazala za ovaj polimorfizam da ne stupa u značajnu interakciju sa drugim ispitanim polimorfizmima. Ako sumiramo, naši rezultati i podaci iz literature bi mogli isključiti opravdanost testiranja *ATIII* 786 G>A polimorfizma kod žena sa primarnim ili sekundarnim infertilitetom.

#### ➤ *ACE I/D*

Angiotenzin konvertujući enzim je ključni enzim renin-angiotenzin sistema. Uticaj I/D polimorfizma, kroz aktivnost ACE enzima, ispitan je i povezivan sa različitim bolestima i stanjima (Nawaz i Hasnain, 2009). Inserciono-delecioni polimorfizam u *ACE* genu ispitan je i kod različitih komplikacija tokom trudnoće. Intrauterina sredina može imati uticaj na ekspresiju *ACE* gena kod ploda, pa posledično uticati i na trudnoću i na težinu novorođenčadi na rođenju. Uočena je povezanost II genotipa kod ploda sa kraćim trajanjem trudnoće i većom težinom novorođenčadi. Kod ovih osoba je kasnije pokazano da u odraslom dobu imaju manju verovatnoću za razvoj koronarne bolesti srca, šećerne bolesti tipa 2, insulinske rezistencije i metaboličkog sindroma (Kajantie i sar., 2004). Pored toga, ACE enzim je aktivan u placenti. Njegova aktivnost povećana je u slučaju preeklampsije, vrlo čestog poremećaja u toku trudnoće koji može da dovede i do fetalnog zastoja u razvoju (Khong i sar., 1986). Prethodni eksperimentni (Morgan i sar., 1998) sugerisali su da je fiziološko remodeliranje spiralne arterije u toku trudnoće posredovano renin-angiotenzin sistemom (RAS) koji je jedan od glavnih faktora koji regulišu krvni pritisak i



balans fluida i elektrolita (Fleming, 2006; Sayed-Tabatabaei i sar., 2006). U toku trudnoće dolazi do stimulacije RAS sistema i povećanja nivoa angiotenzinogena, vazokonstriktora angiotenzin II i aldosterona (Langer i sar., 1998). Aktivacija ACE enzima ima ulogu u redistribuciji placentalne cirkulacije i na taj način može redukovati transfer nutrijenata do fetusa (Ito i sar., 2002), a pokazano je da je polimorfizam *ACE* I/D uključen u modulaciju maternalnog uteroplacentalnog i fetalnog protoka krvi (Mello i sar., 2003). U nekim od prethodnih studija u američkoj i finskoj populaciji ispitanika pokazano je da ne postoji veza između *ACE* polimorfizma i preklampsije (Morgan i sar., 1999; Heiskanen i sar., 2001), dok su ista ispitivanja u italijanskoj populaciji ukazala da postoji značajna asocijacija između DD genotipa i povećanog rizika za preeklampsiju, restrikciju fetalnog rasta i abnormalnu uteroplacentalnu cirkulaciju (Mello i sar., 2003). Zbog mogućeg uticaja na reproduktivni uspeh mnoge studije su ispitivale asocijaciju *ACD* I/D sa ponovljenim gubicima ploda ali ni u slučaju ove patologije rezultati nisu konzistentni. U grupi naših ispitanika, kada se posmatra samo *ACD* I/D polimorfizam, izostaje značajna asocijacija I/D polimorfizma sa infertilitetom, kako sa primarnim tako i sa sekundarnim, što je u saglasnosti sa prethodnim studijama sprovedenim na populaciji Poljske i Indije (Vettriselvi i sar., 2008, Kurzawinska i sar., 2016). Međutim, studije ispitivanja *ACE* I/D polimorfizma u evropskim populacijama (Nemačka, Italija), ali i u Iranskoj populaciji (Buchholz i Thaler, 2003; Fatini i sar., 2000; Fazelnia i sar., 2016) uočile su značajnu vezu sa pojavom RPL što ukazuje da RAS sistem može biti značajan u reproduktivnim procesima opravdavajući njegovo testiranje (de Carvalho i sar., 2016). Takođe, pokazana interakcija između RAS i fibrinolitičkog sistema ukazuje na moguće interakcije gena uključenih u ove procese. U našoj studiji sprovedana je GMDR analiza genskih interakcija koja je pokazala da DD genotip *ACE* polimorfizma interaguje sa *PAI-1* 4G/5G, *ITGB3* 1565 T>C i *MTHFR* 677 C>T i 1298 A>C lokusima i dovodi do povećanog rizika za sekundarni infertilitet, što će biti diskutovano u zasebnom poglavlju (5.2.2.).

➤ ***ITGB3* 1565 T>C**

Polimorfizam *ITGB3* 1565 T>C je proučavan i asociran sa različitim bolestima i stanjima. Pokazano je da 1565C varijanta dovodi do povećanog rizika za trombozna stanja i ponovljene trombotičke događaje (Komsa-Penkova i sar., 2016; Pourgheysari i sar., 2013; Weiss i sar., 1996). Dosadašnja ispitivanja na evropskim populacijama pokazala su asocijaciju *ITGB3* C alela sa ishemičnim šlogom (Floyd i sar., 2014a) i miokardijalnom infarkcijom (Floyd i sar., 2014b; Pastinen i sar., 1998) ukazujući na značajnu ulogu ovog polimorfizma u formiranju koaguluma. Međutim, rezultati ispitivanja ovog polimorfizma nisu konzistentni. U Austriji nije uočeno postojanje asocijacije C alela i dubokih venskih tromboza (Renner i sar., 2001), što je bilo u saglasnosti sa velikom američkom studijom koja nije pokazala postojanje veze između ovog polimorfizma i venskih tromboza, infarkcije miokarda i šloga (Ridker i sar., 1997b).

Ova izmena u *ITGB3* genu asocirana je i sa ranim gubitkom ploda (Ruzzi i sar., 2005). U kontrastu sa potvrđenim studijama asocijacije ovog polimorfizma i određenih bolesti, studija Torabi i saradnika (2012) je čak sugerisala mogući protektivni efekat C alela kod žena sa RPL-om ukazujuću na izraženu varijabilnost dobijenih rezultata između studija. Pretraživanje postojećih baza podataka nije rezultiralo radovima asocijacije ovog polimorfizma i infertiliteta. Naša studija je pokazala da ne postoji značajna razlika u učestalostima alela i genotipova između ispitivanih grupa, niti je pokazano postojanje povećanog rizika za nastanak infertiliteta, kako primarnog tako ni sekundarnog. Međutim, analiza multilokusnih polimorfizama asociranih sa trombofilijom pokazala je značajnu interakciju ovog gena sa drugim lokusima i postojanje multilokusnih genotipova koji nose povećan rizik za sekundarni infertilitet (poglavlje 5.2.2.).

### 5.2.2. Analiza asocijacije infertiliteta sa kombinacijama multilokusnih polimorfizama gena udruženih sa trombofilijom

Za razliku od malog broja bolesti koje su uzrokovane promenama u jednom genu (kao što su srpasta anemija ili cistična fibroza), većina oboljenja i kliničkih stanja su rezultat kompleksnih interakcija između gena, sredinskih faktora, ali i interakcije gena i sredine. Zbog složenosti patoloških procesa, molekularna biologija se sve više okreće ispitivanju interakcije gena ili visokorizičnih alela kao ključnom faktoru odgovornom za razvoj bolesti. Rezultati ispitivanja aditivnog efekta u našoj studiji nisu pokazala značaj zbira visokorizičnih alela na ispitivanim lokusima i postojanje asocijacije između broja visokorizičnih alela po uzorku i pojave infertiliteta. Zbog toga je jedna od hipoteza u našem radu bila i mogući efekat interakcije između analiziranih polimorfizama. Jedna od metoda koja se u poslednje vreme intenzivno koristi za analizu različitih bioloških interakcija je MDR metoda (engl. *Multifactor dimensionality reduction*) koja se zasniva na redukciji dimenzionalnosti multilokusnih podataka, kako bi se povećala mogućnost prepoznavanja genetičkih kombinacija koje predstavljaju rizik za određenu bolest. MDR analiza sumira ispitivane genotipove u visokorizične ili niskorizične grupe kako bi multidimenzionalnost podataka redukovao na jednu dimenziju (Motsinger i Ritchie, 2006). U našoj studiji smo, za analizu interakcije između ispitivanih lokusa, primenili metodu GMDR koja predstavlja generalizovanu multidimenzionalnu redukciju. Ovakav neparametarski statistički pristup je za ovu vrstu analize pogodniji od klasičnih, parametarskih statističkih modela, kakva je logistička regresija, budući da GMDR ne zavisi od pretpostavke o vrsti genskih interakcija koje leže u osnovi eventualno utvrđenih asocijacija. Naime, određene kombinacije gena se mogu asociirati sa nekim stanjem iz različitih razloga. Najpre, dva genska lokusa se mogu fizički naći blizu jedan drugog na istom hromozomu, tako da asocijaciju određene kombinacije gena sa nekim stanjem može uzrokovati vezanost ta dva genska lokusa, od kojih je samo jedan funkcionalno povezan sa praćenim

stanjem. Pored toga, interakcije gena mogu biti aditivne, ukoliko svaki rizični alel dodaje po malo verovatnoću oboljevanja. Na kraju, interakcije između genskih lokusa mogu biti i epistatičke, kada različiti geni, kao što je to slučaj i kod gena uključenih u koagulaciju krvi, učestvuju u jednom istom fiziološkom procesu čije promene leže u osnovi nekog patološkog stanja. Ova metoda se zasniva na istom principu kao i MDR metoda, redukujući n-broj dimenzija (u našem slučaju ispitivanih polimorfizama) na 1, odnosno redukujući više različitih kombinacija genotipova na jedan, visokorizični ili niskorizični genotip. Zbog toga se GMDR analiza gen-gen ili SNP-SNP interakcija u poslednje vreme učestalo primenjuje u studijama asocijacije različitih bolesti, ali i metaboličkih puteva (cervikalni kancer, oralni kancer, tip 2 dijabetes, kancer dojke, metabolizam homocisteina...) kako bi se objasnili kompleksni metabolički i fiziološki putevi u organizmu (Jamshidi i sar., 2015; Pu i sar., 2016; Zeljić i sar., 2014; Zhou i sar., 2015). GMDR analiza ispitivanja gen-gen interakcije polimorfizama u različitim genima asociranim sa metabolizmom homocisteina (*MTHFR* 677 C>T i 1298 A>C, *MTR* 2756 A>G i *MTRR* 66 A>G) pokazala je značajno povećan rizik od folatne deficijencije u odnosu na broj visokorizičnih genotipova u ispitivanim polimorfizmima (Li i sar., 2015). U poređenju sa nosiocima wt alela, pacijenti sa 3 rizična genotipa imaju veći rizik od folatne deficijencije koji se dramatično povećava sa povećanjem broja rizičnih genotipova. Iako svaki od ovih polimorfizama na određen način utiče na folatni put i moguću folatnu deficijenciju, ovi rezultati sugerišu da višestruki genetički defekti dovode do pogoršanja folatne deficijencije sa svakim dodatnim izmenjenim genotipom (Li i sar., 2015). Novije studije sugerisale su da multilokusne kombinacije visokorizičnih alela mogu dovesti do povećanog rizika za trombotička stanja (Yalcintepe i sar., 2015). Multilokusna regresiona analiza pokazala je da postoji značajna asocijacija polimorfizama: *FVL*, *FV* 5279 A>G, *FXIII* 614 A>T, *ITGB3* 1565 T>C, *BF* -455 G>A sa ponovljenim gubicima ploda, od kojih je jedino za *ITGB3* polimorfizam pokazan mogući protektivni efekat (OR:0.127; 95%CI= 0.051-0.319) (Torabi i sar., 2012). Studija Qublan i

saradnika (2006) je sugerisala da kombinacija dva ili više faktora za trombofiliju mogu biti uzročnici ponovljenih neuspješnih IVF procedura i da se javljaju značajno učestalije ( $p < 0.05$ ) u grupi pacijentkinja nego u kontrolnoj grupi. Takođe je pokazano da se više od 3 mutacije u 10 analiziranih gena javljaju sa učestalošću od 74% kod žena sa neuspješnom implantacijom u odnosu na 20% koliko se javljaju u kontrolnoj grupi ( $p < 0.001$ ) (Coulam i sar., 2006b). Ovakvi dosadašnji rezultati ukazivali su na mogući značaj ispitivanja više varijantnih lokusa u genima koji kodiraju za faktore uključene u hemostatske procese. U našem radu ispitivane su gen-gen interakcije u 8 prethodno navedenih polimorfizama asociranih sa trombofilijom. GMDR analizom ustanovljeno je postojanje značajne interakcije *MTHFR* 677 i 1298 polimorfizama sa drugim lokusima, koja dovodi do formiranja visokorizičnih genotipova za pojavu infertiliteta. U našoj studiji *MTHFR* 1298 A>C polimorfizam se  $\chi^2$  testom i analizom logističke regresije nije pokazao kao značajno različit između ispitivanih grupa, ali je GMDR analizom pokazana njegova značajna distribucija u asocijaciji sa infertilitetom ( $p = 0.001$ , Tabela 13). Dobijene analize ukazuju da se ispitivani *MTHFR* 1298 polimorfizam ne sme odbaciti kao mogući faktor rizika za pojavu infertiliteta, nego ga treba uvrstiti u dalje analize. Isti je slučaj sa *MTHFR* 677, *PAI-1*, *ACE* i *ITGB3* lokusima koji pojedinačno analizirani nisu ukazali na postojanje asocijacije sa infertilitetom, ali analiziranjem njihove interakcije uočeno je da u različitim kombinacijama mogu da formiraju visokorizični genotip za pojavu sekundarnog infertiliteta (Tabela 15). Ovom analizom dobijene su dve značajno različite interakcije između kontrolne grupe i podgrupe sa sekundarnim infertilitetom. U prvoj značajnoj interakciji između lokusa: *MTHFR* 677-*MTHFR* 1298-*PAI-1* 4G/5G-*ITGB3* 1565 dobijeno je nekoliko visokorizičnih kombinacija, koje se mogu videti na Slici 14. Najveći rizik imale su kombinacije *MTHFR* 677CC-*MTHFR* 1298AC-*PAI-1* 4G4G-*ITGB3* 1565CC i *MTHFR* 677CC-*MTHFR* 1298AA-*PAI-1* 4G5G-*ITGB3* 1565CC (tamnija siva boja na Slici 14), dok je nešto manji rizik bio u slučaju kombinacija *MTHFR* 677CC-*MTHFR* 1298CC-*PAI-1* 4G4G-*ITGB3*

1565CC, *MTHFR* 677CC-*MTHFR* 1298AC-*PAI-1* 4G5G-*ITGB3* 1565CC i *MTHFR* 677CT-*MTHFR* 1298AA-*PAI-1* 5G5G-*ITGB3* 1565CC (svetlija siva boja na slici 14). U slučaju druge značajne interakcije (Tabela 15), dobijen je samo jedan visokorizični genotip za nastanak sekundarnog infertiliteta koji je imao kombinaciju *MTHFR* 677CC-*MTHFR* 1298CC-*PAI-1* 4G4G-*ACE* DD-*ITGB3* 1565CC. Ove vrste interakcija ne pokazuju uvek postojanje visokorizičnih alela u svakom polimorfizmu koji stupa u interakciju sa drugim lokusima, što može dovesti do razumevanja i interpretacije ovih rezultata. Kada su u pitanju ove analize važno je razumeti da se statističke interakcije ne zasnivaju na uzročno-posledičnim vezama nego na distribuciji varijabli (u našem slučaju polimorfizama) i skorovima koje program dodeljuje, za razliku od bioloških interakcija koje počivaju na biološkim mehanizmima, zasnivajući se na uzročno-posledičnim vezama i epistatičkim interakcijama. Zbog toga se ova vrsta analize ne može koristiti kao dijagnostički metod, niti se može uvrstiti u kliničku praksu, ali nam može ukazati na moguće mehanizme i interakcije koje treba ispitati u daljim analizama. Iako nije uočena značajna asocijacija polimorfizama *MTHFR* 677 C>T, *MTHFR* 1298 A>C, *PAI-1* 4G/5G, *ACE* I/D i *ITGB3* 1565 T>C sa pojavom infertiliteta, GMDR analiza u našoj studiji je pokazala da ispitivani lokusi stupaju u interakciju formirajući visokorizične genotipove koji posledično mogu biti uzročnici sekundarnog infertiliteta kroz stanje poremećene hemostaze i povećane koagulacije. Ovakav pristup analiziranja i grupisanja pojedinačnih visokorizičnih alela u visokorizične genotipove može biti dobar način da se reše kontraverze u literaturnim podacima i da se adekvatnije razumeju kompleksni procesi u organizmu, kao i njihovi poremećaji koji dovode do određenih kliničkih stanja. Naša studija je primenom GMDR analize ukazala na značaj testiranja šireg panela polimorfizama u genima asociраним sa trombofilijom i definisala moguće visokorizične genotipove za nastanak sekundarnog infertiliteta.

### 5.3. VDR polimorfizmi

FokI, BsmI, ApaI i TaqI polimorfizmi u VDR genu ispitivani su i asocirani sa različitim fenotipovima, kao što su varijabilnost u cirkulišućem osteokalcinu (Morrison i sar., 1992), gustini kostiju (Cooper i sar., 1996), koronarnim bolestima (Van Schooten i sar., 1998), dijabetesom tipa 1 (McDermott i sar., 1997; Pani i sar., 2000) i različitim kancerima (Kostner i sar., 2009; Liu JJ i sar., 2013; Liu SL i sar., 2013). Specifično vezivanje aktivne forme vitamina D za VDR receptor u reproduktivnim tkivima, kao i eksprimiranje enzima CYP27B1 i CYP24A1 i receptora VDR i RXR u humanoj placenti sugerisali su moguću biološku ulogu ovih polimorfizama u reproduktivnom uspehu. Dosadašnja, nama dostupna, literatura veoma je ograničena sa podacima asocijacije polimorfizama u VDR genu sa pojavom komplikacija tokom trudnoće tako da naši rezultati analize FokI, BsmI, ApaI i TaqI polimorfizma u VDR genu predstavljaju prve rezultata asocijacije sa idiopatskim infertilitetom.

#### 5.3.1. FokI kao nezavisan prognostički faktor

Jedini, do sada, opisani funkcionalni polimorfizam u VDR genu jeste FokI. Usled izmene T>C (f>F) dolazi do stvaranja drugog start mesta translacije i do sinteze dve varijante proteina. Prisutvo f alela ima za posledicu sintezu duže varijante proteina (427 amino kiselina), dok je u slučaju F alela proteinski produkt nešto kraći (424 amino kiseline). Pokazano je da nosioci FF genotipa imaju 1.7 puta povećanu aktivnost VDR receptora što može biti preduslov za razvoj određenih bolesti (Uitterlinden i sar., 2004b). Pored toga, izmerena je i povećana transkripciona aktivnost ovog gena kod nosioca F alela u odnosu na f alel (Arai i sar., 1997; Whitfield i sar., 2001). Van Etten i saradnici (2007) ispitivali su *in vitro* ulogu FokI polimorfizma u autoimunosti i funkcionalne posledice ovog polimorfizma na ćelije imunskog sistema. Ova studija opisala je da monociti i dendritske ćelije koje nose FF genotip proizvode veći nivo IL-12 (i iRNK i proteina) u odnosu na ff FokI genotip. Takođe je pokazano da kod FF

genotipa postoji povećanje transkripcionih faktora koji su ko-regulatori imunskih reakcija, kao što su NF- $\kappa$ B i NFAT. Saznanje da NF- $\kappa$ B aktivnost može biti povezana sa mnogim imunološki posredovanim bolestima (reumatoidni artritis, inflamatorna bolest creva, multipla skleroza, astma) povezuje ovaj polimorfizam sa mogućim uticajem na razvoj autoimunskih poremećaja (Li i Verma, 2002). Za VDR FokI polimorfizam pokazano je da dovodi do 18 puta većeg rizika za razvoj tiroidne disfunkcije kod pacijenata sa dijabetesom tip 1, a pokazano je i da F alel može biti uzročnik pokretanja autoimunosti i razvoja Hašimoto sindroma (Đurović i sar., 2015; Lin i sar., 2006; Mory i sar., 2016). Pored uloge u povećanom riziku za razvoj određenih bolesti, F alel nekada može imati i protektivnu ulogu koja je pokazana u studiji asocijacije ovog polimorfizma sa aplastičnom anemijom (Yu i sar., 2016). Rezultati naše studije takođe su ukazali na moguću protektivnu ulogu F alela (OR:0,590;  $p < 0.05$ ) u pojavi sekundarnog infertiliteta i ranog gubitka ploda. Pojedine studije sugerišu da vitamin D suplementacija dovodi do redukovanje moguće infekcije tokom trudnoće (Shin i sar., 2010). Uticaj vitamina D na imunološki sistem i citokine mogu biti značajni u regulaciji bakterijske flore. Povećana aktivnost VDR receptora kod nosioca F alela može dovesti do povećane aktivnosti imunološkog odgovora i smanjene mogućnost za infekcije. Ranije studije pokazale su da vitamin D može imati uticaj na infektivne bolesti tokom trudnoće. Mali broj studija pokazao je da nizak nivo vitamina D kod HIV pozitivnih majki povećava incidencu mortaliteta i transmisije HIV infekcije sa majke na dete (Mehta i sar., 2010; 2009). Polimorfizam FokI u VDR genu, u heterozigotnom Ff obliku, asociran je sa povećanom učestalošću HIV i AIDS progresije (Nieto i sar., 2004). Povećana aktivnost imunološkog sistema, koja se javlja i u slučaju prisustva F alela, može biti protektivna u toku trudnoće, štiteći plod, a i majku od mogućih infekcija. U toku prvog trimestra pokazana je povećana incidenca bakterijske vaginoze kod žena sa niskim 25(OH)D nivoom (Bodnar i sar., 2009). Studija asocijacije bakterijske vaginoze i gubitka ploda pokazala je da postoji asocijacija sa gubitkom u prvom i drugom trimestru



trudnoće (Isik i sar., 2016; Nelson i sar., 2015). Tokom trudnoće maternalni imunski sistem se modifikuje kako bi dostigao imunološku toleranciju na paternalna antitela prezentovana na fetalnim ćelijama. Ove modifikacije dešavaju se i na metarnalno-fetalnom kontaktu, ali i u sistemsnoj cirkulaciji (Zen i sar., 2010). Maternalni imunski sistem je dosta kompleksan i u toku trudnoće mora da uspostavi fini balans između povećane tolerancije na paternalna antitela ali i dovoljne aktivnosti imunskog sistema kako bi zaštitila fetus od različitih patogena i infekcija (Bonney, 2016). Protektivna uloga F alela u nastanku sekundarnog infertiliteta, koja je pokazana u našoj studiji, može ukazivati na bolje uspostavljen balans imunskog sistema u situacijama kada dođe do trudnoće, smanjujući rizik za gubitak ploda.

### 5.3.2. BsmI, ApaI i TaqI - pojedinačno analizirani lokusi

Različite studije ispitivale su pojedinačne polimorfizme u *VDR* genu i pokazale asocijaciju sa određenim patologijama i stanjima (Al-Daghri i sar., 2014; Cooper i sar., 1996; McDermott i sar., 1997; Morrison i sar., 1992; Vasilopoulos i sar., 2013; Ye i sar., 2001; Yu i sar., 2016). Rezultati naše studije su u analizama ispitivanja pojedinačnih lokusa BsmI, ApaI i TaqI uočili značajno različitu distribuciju alela i genotipova BsmI polimorfizma između kontrola i pacijentkinja. Protektivna uloga B alela u nastanku sekundarnog idiopatskog infertiliteta koja je pokazana u našem istraživanju uočena je i u studijama asocijacije BsmI polimorfizma sa rizikom za nastanak melanoma u kojoj je pokazano da Bb i BB genotipovi mogu imati protektivnu ulogu u poređenju sa bb genotipom (Denzer i sar., 2011). Skorašnja studija Yu i saradnika (2016) pokazala je da osobe koje su nosioci Bb ili BB genotipa BsmI polimorfizma imaju značajno veći nivo TNF- $\alpha$ , dok je Tt i tt genotip TaqI polimorfizma bio asociran sa povećanim nivoom IL-2 i TNF- $\alpha$  ukazujući na moguću ulogu ovih izmena u imunološkom odgovoru. Interesantna je studija u kojoj je pokazano da *VDR* BsmI genotip može biti zavisan i od faktora zavisnih od pola tokom ranog detinjstva i razvoja. Istraživanja su pokazala da devojčice koje su nosioci

BB genotipa imaju veću dužinu, širinu i površinu tela od nosioca bb genotipa, dok je kod dečaka pokazana suprotna asocijacija: nosioci BB imaju manju dužinu, površinu i širinu tela od nosioca bb, sugerišući da BsmI polimorfizam može imati značajnu ulogu i u intrauterinom rastu ploda (Suarez i sar., 1997).

*Ex vivo* studija je pokazala smanjen nivo VDR proteina kod osoba sa BB genotipom BsmI i tt genotipom TaqI polimorfizama sugerišući da bi ovi genotipovi mogli imati vezu sa ekspresijom VDR gena, a posredno uticati i na različite patološke procese u organizmu (Selvaraj i sar., 2009). Kako se neke od ovih izmena nalaze u nekodirajući regionima, kao što su BsmI i ApaI, ne može se jasno objasniti mehanizam asocijacije sa određenim patologijama. Pretpostavlja se da se oni nalaze u LD-u sa nekim drugim, funkcionalno važnim, alelskim mestima i da na taj način mogu dovesti do ispoljavanja određenog kliničkog stanja zbog čega je u našem radu sprovedena analiza neravnoteže vezanosti i mogućih haplotipskih blokova, što će biti razmatrano u narednom poglavlju (5.3.3.).

### 5.3.3. BsmI, ApaI i TaqI - haplotipski analizirani lokusi

Interpretacija polimorfizama u VDR genu i njihova asocijacija sa različitim bolestima i stanjima je veoma kompleksna i složena, pogotovo ako se radi o polimorfizmima koji nisu funkcionalni, ne pogađaju kodonske regione ili su sinonimni. Jedan od mogućih načina da se razjasni njihova asocijacija sa različitim patologijama leži u postojanju LD-a sa funkcionalnim polimorfizmima. Zato metoda analize haplotipova nudi snažan pristup ispitivanja asocijacije genskih varijanti sa kompleksnim bolestima i stanjima (Gabriel i sar., 2002). Gametska neravnoteža vezanosti odnosi se na slučajnu asocijaciju alela ili polimorfizama i njihovu vezanu segregaciju u gamete. Procenjeno je da oko 70%-80% genoma poseduje haplotipske blokove u kojima je stepen homologe rekombinacije vrlo visok. Ukoliko su SNP-ovi lokalizovani unutar jednog LD bloka, velika je verovatnoća da će se nasleđivati zajedno (Wang i sar., 2005). Tri susedna polimorfizma u VDR genu, BsmI, ApaI i TaqI su

u skorije vreme dosta proučavani u različitim studijama. U mnogim od njih pokazano je da se ovi polimorfizmi nalaze u jakoj neravnoteži vezanosti, a haplotipski blokovi ovih alela ispitivani su i asocirani sa različitim patologijama. Dosadašnje analize VDR haplotipova uočile su postojanje haplotipova koji su asocirani sa povećanim ili smanjenim rizikom za različita medicinska stanja (Al-Daghri i sar., 2014; Yu i sar., 2016). Za haplotip BAt je pokazano da je u vezi sa regulacijom ključnih proteina koji su uključeni u inflamatornu aktivnost, dovodeći do povećanja proinflamatornih citokina (IL1 $\beta$ , IL18, TNF $\alpha$  i IL-6) što je ukazivalo na značajnu ulogu određenih haplotipova u imunološkoj modulaciji (Al-Daghri i sar., 2014). Studija Denzer i saradnika (2011), koja je ispitivala asocijaciju ovih haplotipova sa melanomom, pokazala je da su tri najučestalija haplotipa: baT (45%), BAt (40%) i bAT (12%) i da oni čine oko 97% svih dobijenih haplotipova, ali nije pronašla značajnu asocijaciju sa melanomom. Slična distribucija haplotipova dobijena je i u našoj studiji, gde se kao najučestaliji haplotip pokazao BAt (36.3%), a zatim baT (28.9%) u analizi asocijacije između kontrole i ukupne grupe pacijentkinja sa infertilitetom. Slična distribucija dobijenih haplotipova pokazala se i nakon odvajanja primarnog od sekundarnog infertiliteta (Tabele 21, 22, i 23, respektivno). Rezultati ove studije pokazali su postojanje značajne asocijacije haplotipa bAT (OR:1.96,  $p < 0.05$ ) sa infertilitetom, kako u ukupnoj grupi pacijenata, tako i podgrupi sa sekundarnim infertilitetom. Logistička regresiona analiza pokazala je da ovaj haplotip povećava rizik za nastanak sekundarnog infertiliteta za nešto više od dva puta (OR:2.209;  $p < 0.05$ ). Pored navedenog haplotipa, primenom logističko regresione analize izdvojio se i haplotip BAT za koji je pokazano da ima protektivnu ulogu u nastanku primarnog infertiliteta (OR:0.333,  $p < 0.05$ ). Stanje povećanog rizika kod haplotipa bAT, kao i moguća protektivna uloga BAT haplotipa uočena je i u studijama asocijacije sa dijabetesom tipa 1 ukazujući na moguću ulogu ovih haplotipova u autoimunosti i imunološkom balansu (McDermott i sar., 1997). Dobijeni haplotipovi koji povećavaju rizik za sekundarni (bAT), ili smanjuju rizik za primarni infertilitet (BAT), ukazuju na

značaj njihovog testiranja kod žena sa idiopatskim reproduktivnim neuspehom. Dobijeni rezultati, po pregledu dosadašnje literature koja je nama dostupna, predstavljaju prve rezultate ispitivanja i asocijacije polimorfizama i haplotipova u *VDR* genu sa infertilitetom. Tačan mehanizam njihovog delovanja još uvek nije poznat, što otvara vrata daljim istraživanjima haplotipskih blokova i ispitivanjima njihovog delovanja na nivo vitamina D, kao i odgovor na vitamin D suplementaciju.

#### **5.3.4. Multilokusne interakcija polimorfizama u *VDR* genu**

Identifikacija SNP-SNP interakcija može da pomogne u objašnjenju genetičkih etiologija mnogih humanih bolesti. Gen-gen interakcija, poznata i kao epistaza, je fenomen gde fenotipski efekat varijacije na jednom genskom lokusu zavisi od varijacije na drugom. SNP-SNP interakcije su različitim statističkim modelima ispitivane u pokušaju da se identifikuju kombinacije genetičkih varijanti odgovornih za razvoj ili prognozu bolesti (Jamshidi i sar., 2015; Murk i DeWan, 2016; Rai i sar., 2015; Zeljić i sar., 2014; Zhou i sar., 2015). Iako GMDR softver za analizu podržava bazu podataka u kojoj postoje podaci koji nedostaju (engl. *missing data*), zbog relativno malog broja ispitanika uključenih u ovu studiju, a u cilju dobjanja što validnijih rezultata, u analizu SNP-SNP interakcije polimorfizama u *VDR* genu uključeni su samo ispitanici za koje je dobijen genotip za sva četiri ispitivana *VDR* lokusa. GMDR analiza polimorfizama u *VDR* genu u našoj studiji nije pokazala postojanje značajne interakcije FokI, BsmI, ApaI i TaqI polimorfizma između svih analiziranih grupa, što predstavljaju prve rezultate ispitivanja moguće SNP-SNP interakcije između ovih lokusa.

## 5.4. Trombofilija i VDR

Saznanje da je serumski nivo vitamina D asociran sa mnogim stanjima, kao što su gojaznost, insulinska rezistencija i metabolički sindrom, ukazalo je na moguću ulogu ovog vitamina i u nastanku različitih kardiovaskularnih oboljenja (Anderson i sar., 2010; Beveridge i sar., 2013; Modarresi-Ghazani i sar., 2016). Nizak nivo vitamina D izmeren je kod pacijenata sa hipertenzijom, arterijskim koronarnim bolestima i tromboembolizmom (Modarresi-Ghazani i sar., 2016). Pored toga, pokazano je da je ovaj vitamin vrlo značajan u procesima fertiliteta i reprodukcije. Enzimi uključeni u metabolizam vitamina D, CYP27B1 i CYP24A1, kao i receptori VDR i RXR, su eksprimirani i funkcionalni u humanoj placenti, što sugerise moguću biološku ulogu vitamina D u humanoj reprodukciji (Diaz i sar., 2000; Tanamura i sar., 1995). Trudnoća i reprodukcija su veoma kompleksni procesi koji zahtevaju balansiranost različitih mehanizama u organizmu. Vaskularizacija reproduktivnih organa i tkiva, kao i adekvatno funkcionisanje imunološkog sistema, ključni su preduslovi za reproduktivni uspeh. Svojom ulogom transkripcionog faktora, VDR protein reguliše i utiče na funkcionisanje i ekspresiju mnogih drugih gena, između ostalog i hemostatskog i imunološkog sistema. GMDR analiza interakcije svih ispitivanih gena u ovom radu (8 lokusa asociranih sa trombofilijom i 4 lokusa u VDR genu) nije pokazala postojanje interakcija gena koji bi doveli do formiranja visokorizičnih genotipova za nastanak idiopatskog infertiliteta (Tabele 32, 33, 34 i 35). Međutim, novija istraživanja mutacija u VDRE elementima gena za trombofiliju, ukazala su na potencijalno novi mehanizam regulacije sistema koagulacije preko VDR i VDRE elemenata (Toderici i sar., 2016). Ispitivanja identifikovanja VDRE elemenata u genima asociranim sa trombofilijom i potencijalnih mutacija u tim regionima, mogla bi dati odgovor na pitanje da li postoje genetičke regulacije ovih kompleksnih mehanizama.

## 6. ZAKLJUČCI

Glavni cilj genetičkih istraživanja jeste identifikovanje polimorfnih varijanti koje mogu doprineti razvoju određenih bolesti ili stanja. Naša studija je pokazala da ispitivanje genskih polimorfizama asociranih sa trombofilijom i polimorfizama u *VDR* genu može dati značajne informacije kod pacijentkinja sa primarnim i sekundarnim infertilitetom ukazujući na potencijalni rizik za reproduktivni neuspeh. Osim testiranja pojedinačnih lokusa, rezultati naše studije ukazali su i na značajnost testiranja multilokusnih interakcija u cilju identifikovanja visokorizičnih genotipova asociranih sa infertilitetom. Na osnovu dobijenih rezultata u ovom radu, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Porodično opterećenje trombozama, kardiovaskularnim oboljenjima i komplikacijama tokom trudnoće, može biti značajan faktor za nastanak infertiliteta, kako primarnog tako i sekundarnog, ukazujući na moguće postojanje naslednog faktora rizika za ova stanja.
2. Visokorizični aleli u polimorfizmima *FV 1691 G>A* i *FII 20210 G>A* predstavljaju nezavisne faktore rizika sa pojavu primarnog infertiliteta i treba da budu uključeni u dijagnostičke analize idiopatskog primarnog infertiliteta. Ostali pojedinačno ispitivani polimorfizmi u genima asociranim sa trombofilijom se nisu pokazali kao značajni faktori rizika za ovu pojavu.
3. Interakcije između polimorfizama koji se dovode u vezu sa trombofilijom, *MTHFR 677*, *MTHFR 1298*, *PAI-1 4G/5G*, *ACE* i *ITGB3*, dovode do formiranja visokorizičnih genotipova koji mogu biti uzročnici sekundarnog infertiliteta. Naši dobijeni rezultati ukazuju na postojanje interakcije genskih lokusa asociranih sa trombofilijom što ističe značaj testiranja šireg panela polimorfizama kod žena sa sekundarnim infertilitetom.
4. Ispitivanje polimorfizama u *VDR* genu pokazala su da postoji značajno različita distribucija genotipova i alela FokI i BsmI *VDR* polimorfizma između analiziranih grupa. Za alel F FokI polimorfizma pokazano je da

ima protektivnu ulogu u nastanku sekundarnog infertiliteta što sugerirše da pokretanje imunskog odgovora mehanizmima vitamina D može biti značajan faktor u uspostavljanju balansa između imunske tolerancije na paternalna antitela kao i protektivne uloge imunskog sistema u očuvanju fetusa u toku trudnoće. Pored toga, pokazana je i protektivna uloga B alela u BsmI polimorfizmu, što bi se moglo objasniti formiranjem haplotipskih blokova sa drugim polimorfizmima u *VDR* genu kao i/ili polimorfizmima nekog susednog gena.

5. U *VDR* genu je identifikovan jedan haplotipski blok (BsmI-ApaI-TaqI) u svim ispitivanim grupama. Logističkom regresionom analizom je utvrđeno da je haplotip bAT značajno učestaliji kod sekundarnog infertiliteta i dovodi do povećanog rizika za pojavu istog, dok se haplotip BAT pokazao kao mogući protektivni faktor u asocijaciji sa primarnim infertilitetom.
6. Multilokusne SNP-SNP interakcije u *VDR* genu nisu pokazale postojanje značajne interakcije ovih lokusa koje bi dovele do formiranje visokorizičnih genotipova asociраних sa pojavom infertiliteta.
7. Analizom multilokusnih interakcija svih 12 ispitivanih polimorfizama (8 u genima asociраних sa trombofilijom i 4 u *VDR* genu) pokazano je da se u interakciji ovih lokusa ne formira visokorizični genotip koji je asociран sa pojavom idiopatskog infertiliteta kod žena.



# 7. LITERATURA

**A**

Abramson N, Costantino JP, Garber JE, Berliner N, Wickerhman DL, Wolmark N. **Effect of Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations on thromboembolic risk in the national surgical adjuvant breast and bowel project breast cancer prevention trial.** Journal of the National Cancer Institute 2006; 98(13): 904-910.

Adler G, Clark JS, Loniewska B, Czarska E, Salkic NN, Ciechanowicz A. **Prevalence of 1691G>A FV mutation in Poland compared with that in other Central, Eastern and South-Eastern European countries.** Bosnian Journal of Basic Medical Science 2012; 12(2): 82-87.

Aihara K, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Yamashita M, Sudo T, et al. **Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice.** The Journal of Biological Chemistry 2004; 279(34): 35798-35802.

Akande VA, Fleming CF, Hunt LP, Keay SD, Jenkins JM. **Biological versus chronological ageing of oocytes, distinguishable by raised FSH levels in relation to the success of IVF treatment.** Human Reproduction 2002; 17(8): 2003-2008.

Albrecht ED, Pepe GJ. **Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy.** Endocrine Reviews 1990; 11(1): 124-150.

Albrecht ED, Pepe GJ. **Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy.** The International Journal of Developmental Biology 2010; 54(2-3): 397-408.

Al-Daghri NM, Guerini FR, Al-Attas OS, Alokail MS, Alkharfy KM, Draz HM, et al. **Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity**

**and inflammasome activity.** PLoS One 2014; 9 (7): e102141. doi: 10.1371/journal.pone.0102141.

Alhenc-Gelas F, Richard J, Courbon D, Warnet JM, Corvol P. **Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme levels in healthy men: relationship to environmental and hormonal parameters.** Journal of Laboratory and Clinical Medicine 1991; 117(1): 33-39.

Al-Motassem Y, Shomaf M, Said I, Berger S, Ababneh N, Diab O, et al. **Allele and genotype frequencies of the polymorphic methylenetetrahydrofolate reductase and lung cancer in the Jordanian population: a case control study.** Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2015; 16(8): 3101-3109.

Alvarez-Diaz S, Valle N, Ferrer-Mayorga G, Lombardia L, Herrera M, Dominguez O, et al. **MicroRNA-22 is induced by vitamin D and contributes to its antiproliferative, antimigratory and gene regulatory effects in colon cancer cells.** Human Molecular Genetics 2012; 21(10): 2157-2165.

Anderson JL, May HT, Horne BD, Bair TL, Nall NL, Carlquist JF, et al. **Relation of vitamin D deficiency to cardiovascular risk factors, disease status, and incident events in a general healthcare population.** The American Journal of Cardiology 2010; 106(7): 963-968.

Anton AI, Teruel R, Corral J, Minano A, Martinez-Martinez I, Ordonez A, et al. **Functional consequences of the prothrombotic SERPINC1 rs2227589 polymorphism on antithrombin levels.** Haematologica, 2009; 94(4): 589-592.

Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, et al. **A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women.** Journal of Bone and Mineral Research 1997; 12(6): 915-921.

Araujo MD, Borges BN, Rodrigues-Antunes S, Burbano RM, Harada ML. **Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and gastric cancer susceptibility in a population of Northern Brazil.** *Genetics and Molecular Research* 2015; 14(3): 10001-10006.

ASRM-Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. **Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion.** *Fertility and Sterility* 2015; 103(6):e44-e50.

Autier P, Boniol M, Pizot C, Mullie P. **Vitamin D status and ill health: a systematic review.** *Lancet Diabetes Endocrinology* 2014; 2(1): 76-89.

Azem F, Many A, Ben Ami I, Yovel I, Amit A, Lessing JB, et al. **Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failure.** *Human Reproduction* 2004; 19(2): 368-370

## **B**

Barrera D, Avila E, Hernandez G, Halhali A, Biruete B, Larrea F, et al. **Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol.** *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2007; 103(3-5): 529-532.

Barret JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. **Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps.** *Bioinformatics* 2005; 21(2): 263-265.

Beaudin AE, Stover PJ. **Insights into metabolic mechanisms underlying folate-responsive neural tube defects: a minireview.** *Birth Defects Research. Part A: Clinical and Molecular Teratology* 2009; 85(4): 274-284.

Berry DJ, Vimalaswari KS, Whittaker JC, Hingorani AD, Hypponen E. **Evaluation of genetic markers as instruments for Mendelian randomization studies on vitamin D.** *PLoS One* 2012; 7(5): e37465. doi: 10.1371/journal.pone.0037465.

Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. **Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C.** *Nature* 1994; 369(6475): 64-67.

Beveridge LA, Witham MD. **Vitamin D and cardiovascular system.** *Osteoporosis International* 2013; 24(8): 2167-2180.

Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJ, Arellano AR, Tong C, Rowland CM, et al. **Gene variants associated with deep vein thrombosis.** *Journal of the American Medical Association/JAMA* 2008; 299(11): 1306-1314.

Bikle DD, Siiteri PK, Ryzen E, Haddad JG. **Serum protein binding of 1,25-dihydroxyvitamin D: a reevaluation by direct measurement of free metabolite levels.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1985; 61(5): 969-975.

Biron-Andreani C, Bauters A, Le Cam-Duchez V, Delahousse B, Lequerrec A, Dutrillaux F, et al. **Factor V Leiden homozygous genotype and pregnancy outcomes.** *Obstetrics and Gynecology* 2009; 114(6): 1249-1253.

Blais J, Lavoie SB, Giroux S, Bussieres J, Lindsay C, Dionne J, et al. **Risk of misdiagnosis due to allele dropout and false-positive PCR artifacts in molecular diagnostics: Analysis of 30.769 genotypes.** *The Journal of Molecular Diagnostics* 2015; 17(5): 505-514.

Blondon M, Rodabough RJ, Budrys N, Johnson KC, Berger JS, Shikany JM, et al. **The effect of calcium plus vitamin D supplementation on the risk of venous thromboembolism. From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial.** *Thrombosis and Haemostasis* 2015; 113(5): 999-1009.

Bodnar LM, Krohn MA, Simhan HN. **Maternal vitamin D deficiency is associated with bacterial vaginosis in the first trimester of pregnancy.** *Journal of Nutrition* 2009; 139(6): 1157-1161.

Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. **Integrin beta3 Leu33Pro homozygosity and risk of cancer.** Journal of the National Cancer Institute 2003; 95(15): 1150-1157.

Bojesen SE, Kjaer SK, Hogdall EV, Thomsen BL, Hogdall CK, Blaakaer J, et al. **Increased risk of ovarian cancer in integrin beta3 Leu33Pro homozygotes.** Endocrine-related Cancer 2005; 12(4): 945-952.

Bolland MJ, Grey A, Gamble GD, Reid IR. **The effect of vitamin D supplementation on skeletal, vascular, or cancer outcomes: a trial sequential meta-analysis.** Lancet Diabetes and Endocrinology 2014; 2(4): 307-320.

Bonney EA. **Immune regulation in pregnancy: a matter of perspective?** Obstetrics and Gynecology Clinics of North America 2016; 43(4): 679-698.

Bosler D, Mattson J, Crisan D. **Phenotypic heterogeneity in patients with homozygous prothrombin 20210AA genotype. A paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology.** Journal of Molecular Diagnostics 2006; 8(4): 420-425.

Bosma PJ, ven den Berg EA, Kooistra T, Siemieniak DR, Slightom JL. **Human plasminogen activator inhibitor-1 gene.** The Journal of Biological Chemistry 1988; 263(19): 9129-9141.

Botto LD, Yang Q. **5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review.** American Journal of Epidemiology 2000; 151(9): 862-877.

Bovin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. **International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care.** Human Reproduction 2007; 22(6): 1506-1512.

Bozikova A, Gabrikova D, Sovicova A, Behulova R, Macekova S, Boronova I, et al. **The frequency of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in Slovak and Roma (Gypsy) ethnic group of Eastern Slovakia.** Journal of Thrombosis and Thrombolysis 2012; 34(3): 406-409.

Brajušković G. **Metode u molekularnoj biologiji 2.** Beograd: Savremena administracija a.d.; 2012.

Brodin E, Lerstad G, Grimnes F, Braekkan SK, Vik A, Brox J, et al. **Serum levels of vitamin D are not associated with future risk of venous thromboembolism. The Tromso Study.** Thrombosis and Haemostasis 2013; 109(5): 885-890.

Brown SB, Brierley TT, Palanisamy N, Salusku IB, Goodman W, Brandi ML, et al. **Vitamin D receptor as a candidate tumor-suppressor gene in severe hyperparathyroidism of uremia.** The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2000; 85(2): 868-872.

Brown NJ, Kumar S, Painter CA, Vaughan DE. **ACE inhibition versus angiotensin type 1 receptor antagonism.** Hypertension 2002; 40(6): 859-865.

Buchholz T, Thaler CJ. **Inherited thrombophilia: impact on human reproduction.** American Journal of Reproductive Immunology 2003; 50(1): 20-32.

## C

Calvete JJ. **On the structure and function of platelet integrin alpha IIb beta 3, the fibrinogen receptor.** Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine 1995; 208(4): 346-60

Cao Y, Xu J, Zhang Z, Huang X, Zhang A, Wang J, et al. **Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis.** Gene 2013a; 514(2): 105-111.

Cao Y, Zhang Z, Xu J, Yuan W, Wang J, Huang X, et al. **The association of idiopathic recurrent pregnancy loss with polymorphisms in hemostasis-related genes.** *Gene* 2013b; 530 (2): 248-252.

Casadei L, Puca F, Privitera L, Zamaro V, Emidi E. **Inherited thrombophilia in infertile women: implication in unexplained infertility.** *Fertility and Sterility* 2010; 94(2): 755-757.

Chachamovich JR, Chachamovich E, Ezer H, Fleck MP, Knauth D, Passos EP. **Investigating quality of life and health-related quality of life in infertility: a systematic review.** *Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology* 2010; 31(2): 101-110.

Chan WS, Anand S, Ginsberg JS. **Anticoagulation of pregnant women with mechanical heart valves: a systematic review of the literature.** *Archives of International Medicine* 2000; 160(2): 191-196.

Check JH. **The use of heparin for preventing miscarriage.** *American Journal of Reproductive Immunology* 2012; 67(4): 326-333.

Chen GB, Xu Y, Xu HM, Li MD, Zhu J, Lou XY. **Practical and theoretical considerations in study design for detecting gene-gene interactions using MDR and GMDR approaches.** *PLoS One* 2011; 6(2):e16981. doi: 10.1371/journal.pone.0016981.

Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. **Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction.** *The American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 79(5): 820-825.

Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. **Vitamin D: Metabolism.** *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2010; 39(2): 243-253.



Christensen B, Frosst P, Lussier-Cacan S, Selhub J, Goyette P, Rosenblatt DS, et al. **Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease.** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997; 17(3): 569-573.

Ciu W. **Mother or nothing: the agony of infertility.** *Bulletin of the World Health Organization* 2010; 88(12): 881-882.

Coates D., Isaac RE, Cotton J, Siviter R, Williams TA, Shirras A, et al. **Functional conservation of the active sites of human and *Drosophila* angiotensin I-converting enzyme.** *Biochemistry* 2000; 39(30): 8963-8969.

Cohon KP and Heit JA. **Inherited and secondary thrombophilia: clinician update.** *Circulation* 2014; 129(2): 254-257.

Colonese F, Lagana AS, Colonese E, Sofo V, Salmeri FM, Granese R, et al. **The pleiotropic effects of vitamin D in gynaecological and obstetric diseases: an overview on a hot topic.** *Biomed Research International* 2015; 2015: 986281. doi: 10.1155/2015/986281.

Cooper GS, Umbach DM. **Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis.** *Journal of Bone Mineral Research* 1996; 11(12): 1841-1849.

Coriu L, Ungureanu R, Talmaci R, Uscatescu V, Cirstoiu M, Coriu D, et al. **Hereditary thrombophilia and thrombotic events in pregnancy: single-center experience.** *Journal of Medicine and Life* 2014a; 7(4):567-571.

Coriu L, Copaciu E, Tulbure D, Talmaci R, Secara D, Coriu D, et al. **Inherited thrombophilia in pregnant women with intrauterine growth restriction.** *Maedica (Buchar)* 2014b; 9(4): 351-355.

Coulam CB, Kaider BD, Kaider AS, Janowicz P, Roussev RG. **Antiphospholipid antibodies associated with implantation failure after IVF/ET.** Journal of Assisted Reproduction and Genetics 1997; 14(10): 603-608.

Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. **Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure.** Reproductive BioMedicine Online 2006a; 12(3): 322-327.

Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussec R. **Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage.** American Journal of Reproductive Immunology 2006b; 55(5): 360-368.

Coulam CB, Jeyendran RS. **Thrombophilic gene polymorphisms are risk factors for unexplained infertility.** Fertility and Sterility 2009; 91(4 Suppl): 1516-1517.

Cutolo M. **Hormone therapy in rheumatic diseases.** Current Opinion in Rheumatology 2010; 22(3): 257-263.

## D

D' Amico M, Sammarco P, Pasta L. **Thrombophilic genetic factors PAI-1, MTHFR C677T, V Leiden 506Q, and prothrombin 20210A in Noncirrhotic Portal Vein Thrombosis and Budd-Chiari Syndrome in a Caucasian population.** International Journal of Vascular Medicine 2013; 717480. doi: 10.1155/2013/717480.

D' Amico M, Pasta F, Pasta L. **Thrombophilic genetic factors PAI-1 4G-4G and MTHFR 677TT as a risk factors of alcohol, cryptogenic liver cirrhosis and portal vein thrombosis, in a Caucasian population.** Gene 2015; 568(1): 85-88.

Danckwardt S, Gehring NH, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Pforsich M, Frede U, et al. **The prothrombin 3'end formation signal reveals a unique**

**architecture that is sensitive to thrombophilic gain-of-function mutations.** Blood 2004; 104(2): 428-435.

Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. **Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C.** Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90(3): 1004-1008.

Dahlback B. **Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders.** Blood 2008; 112(1): 19-27.

Davis C, Milner J. **Nutrigenomics, vitamin D and cancer prevention.** Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics 2011; 4(1):1-11.

De Carvalho SS, Simoes e Silva AC, Sabino Ade P, Evangelista FC, Gomes KB, Dusse LM, et al. **Influence of ACE I/D polymorphism on circulating levels of plasminogen activator inhibitor 1, D-Dimer, ultrasensitive C-Reactive Protein and Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 in patients undergoing hemodialysis.** PLoS One 2016; 11(3): e0150613. doi: 10.1371/journal.pone.0150613.

Dechanet C, Anahory T, Mathieu Daude JC, Quantin X, Reyftmann L, Hamamah S, et al. **Effects of cigarette smoking on reproduction.** Human Reproduction Update 2011; 17(1): 76-95.

Degen SJ, Davie EW. **Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin.** Biochemistry 1987; 26(19): 6165-6177.

De Haas EC, Zwart N, Meijer C, Suurmeijer AJ, Meijer K, Guchelaar HJ, et al. **Association of PAI-1 gene polymorphism with survival and chemotherapy-related vascular toxicity in testicular cancer.** Cancer 2010; 116(24): 5628-5636.

De Maat MP, Jansen MW, Hille ET, Vos HL, Bioemenkamp KW, Buitendijk S, et al. **Preeclampsia and its interaction with common variants in thrombophilia genes.** Journal of Thrombosis and Haemostasis 2004; 2(9): 1588-1593.

Denzer N, Vogt T, Reichrath J. **Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and skin cancer. A systematic review.** *Dermato-Endocrinology* 2011; 3(3): 205-210.

De Santis M, Cavaliere AF, Straface G, Di Gianantonio E, Caruso A. **Inherited and acquired thrombophilia: pregnancy outcome and treatment.** *Reproductive Toxicology* 2006; 22(2): 227-233.

De Stefano V, Rossi E, Paciaroni K, Leone G. **Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications.** *Haematologica* 2002; 87(10): 1095-1108.

Despotis GJ, Levine V, Joist JH, Joiner-Maier D, Spitznagel E. **Antithrombin III during cardiac surgery: effect on response of activated clotting time to heparin and relationship to markers of hemostatic activation.** *Anesthesia and Analgesia* 1997; 85(3): 498-506.

Diaz L, Sanchez I, Avila E, Halhali A, Vilchis F, Larrea F. **Identification of a 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene transcription product in cultures of human syncytiotrophoblast cells.** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 85(7): 2543-2549.

Dietrich W, Busley R, Spannagl M, Braun S, Schuster T, Lison S. **The influence of antithrombin substitution on heparin sensitivity and activation of hemostasis during coronary artery bypass graft surgery: a dose-finding study.** *Anesthesia and Analgesia* 2013; 116(6): 1223-1230.

Dietz P, Watson ED, Sattler MC, Ruf W, Titze S, van Poppel M. **The influence of physical activity during pregnancy on maternal, fetal or infant heart rate variability: a systematic review.** *BMC Pregnancy and Childbirth* 2016; 16(1): 326.

Dieval J, Nguyen G, Gross S, Delobel J, Kruithof EK. **A lifelong bleeding disorder associated with deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1.** *Blood* 1991; 77(3): 528-532.

Di Nisso M, Rutjes AW, Ferrante N, Tiboni GM, Cucurullo F, Porreca E. **Thrombophilia and outcomes of assisted reproduction technologies: a systematic review and meta-analysis.** Blood 2011; 118(10): 2670-2678.

Di Simone N, Caliandro D, Castellani R, Ferrazzani S, De Carolis S, Caruso A. **Low-molecular weight heparin restores in-vitro trophoblast invasiveness and differentiation in presence of immunoglobulin G fractions obtained from patients with antiphospholipid syndrome.** Human Reproduction 1999; 14(2): 489-495.

Dissanayake VH, Sirisena ND, Weerasekera LY, Gammulla CG, Seneviratne HR, Jayasekara RW. **Candidate gene study of genetic thrombophilic polymorphisms in pre-eclampsia and recurrent pregnancy loss in Sinhalese women.** The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research 2012; 38(9): 1168-1176.

Donahue BS, Gailani D, Higgins MS, Drinkwater DC, George AL. **Factor V Leiden protects against blood loss and transfusion after cardiac surgery.** Circulation 2003; 107(7): 1003-1008.

Dossenbach-Glaninger A, van Trotsenburg M, Dossenbach M, Oberkanins C, Moritz A, Krugluger W, et al. **Plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphisms and coagulation factor XIII Val34Leu polymorphism: impaired fibrinolysis and early pregnancy loss.** Clinical Chemistry 2003; 49(7): 1081-1086.

Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. **Vitamin D.** American Journal of Physiology. Renal Physiology 2005; 289(1): F8-F28.

## **D**

Dorđević V, Rakićević L, Spasić M, Miković D, Kovač M, Radojković D. **Factor V Leiden, FII G20210A, MTHFR C677T mutations as risk factors for venous**

**thrombosis during pregnancy and puerperium.** Vojnosanitetski pregled 2005; 62(3):201-205.

Dorđević V, Pruner I, Rakiević Lj, Kovač M, Miković D, Miljić P, et al. **FV Leiden, FII G20210A and MTHFR C677T mutations in patients with lower or upper limb deep vein thrombosis.** Genetika 2011; 43(2): 371 -380.

Dorđević V, Gvozdenov M, Pruner I, Tomić B, Kovač M, Antonijević N, et al. **The prevalence of PAI-1 4G/5G variant in Serbian population.** Medicinski Glasnik 2013; 18: 35-41.

Dorđević V, Pruner I, Radojković D. **Molecular basis of thrombophilia.** Journal of Medical Biochemistry 2014; 33(1):22-27.

Đurović J, Stojković O, Todorović J, Brajić A, Stanković S, Obradović S, et al. **Genetics of suspected thrombophilia in Serbian females with infertility, including three cases, homozygous for FII 20210A or FV 1961A mutations.** Human Fertility (Cambridge, England) 2017a; 20(2):132-139.

Đurović J, Stojković O, Todorović J, Savić K, Stamenković G. **Should MTHFR 1298 A>C be tested together with MTHFR 677 C>T polymorphism in women with reproductive challenges.** Genetika (Belgrade) 2017b; 49(2): 377-386.

Đurović J, Stojković O, Ozdemir O, Silan F, Akutur C, Todorović J, et al. **Association between FokI, ApaI and TaqI RFLP polymorphisms in VDR gene and Hashimoto's thyroiditis: preliminary data from female patients in Serbia.** International Journal of Immunogenetics 2015; 42(3): 190-194.

## E

Egbase PE, Al-Sharhan M, Grudzinskas JG. **Influence of position and length of uterus on implantation and clinical pregnancy rates in IVF and embryo transfer treatment cycles.** Human Reproduction 2000; 15(9): 1943-1946.

Egeberg O. **Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia.** *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica* 1965; 13: 516-530.

Engbers MJ, Van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR. **Venous thrombosis in the elderly: incidence, risk factors and risk groups.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2010; 8(10): 2105-2112.

Eriksson P, Kallin B, van 't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. **Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 92(6): 1851-1855.

Ertek S, Akgul E, Cicero AF, Kutuk U, Demirtas S, Cehreli S, et al. **25-Hydroxy vitamin D levels and endothelial vasodilator function in normotensive women.** *Archives of Medical Science* 2012; 8(1): 47-52.

## F

Fallin D, Schork NJ. **Accuracy of haplotype frequency estimation for biallelic loci, via the expectation-maximization algorithm for unphased diploid genotype data.** *American Journal of Human Genetics* 2000; 67(4): 947-959.

La Farina F, Raparelli V, Napoleone L, Guadagni F, Basili S, Ferroni P. **Inflammation and thrombophilia in pregnancy complications: implications for risk assessment and clinical management.** *Cardiovascular and Hematological Disorders Drug Targets* 2016; 15(3): 187-203.

Fatini C, Gensini F, Battaglini B, Prisco D, Cellai AP, Fedi S, et al. **Angiotensin-converting enzyme DD genotype, angiotensin type 1 receptor CC genotype, and hyperhomocysteinemia increase first-trimester fetal-loss susceptibility.** *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2000; 11(7): 657-662.

Fatini C, Conti L, Turillazzi V, Sticchi E, Romagnuolo I, Milanini MN, et al. **Unexplained infertility: association with inherited thrombophilia.** *Thrombosis Research* 2012; 129(5):e185-8. doi: 10.1016/j.thromes.2012.02.012

Fay WP, Shapiro AD, Shih JL, Schleef RR, Ginsburg D. **Brief report: complete deficiency of plasminogen-activator inhibitor type 1 due to a frame-shift mutation.** *The New England Journal of Medicine* 1992; 327(24): 1729-1733.

Fazelnia S, Farazmandfar T, Hashemi-Soteh SM. **Significant correlation of angiotensin converting enzyme and glycoprotein IIIa genes polymorphisms with unexplained recurrent pregnancy loss in north of Iran.** *International Journal of Reproductive Biomedicine* 2016; 14(5): 323-328.

Ferraretti AP, Goossend V, Kupka M, Bhattacharya S, de Mouzon J, Castilla JA, et al. **Assisted reproductive technology in Europe, 2009: results generated from European registers by ESHRE.** *Human Reproduction* 2013; 28(9): 2318-2331.

Finan RR, Tamin H, Ameen G, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY. **Prevalence of factor V G1691A (factor V-Leiden) and prothrombin G20210A gene mutations in a recurrent miscarriage population.** *American Journal of Hematology* 2002; 71(4): 300-305.

Fleming I. **Signaling by the angiotensin-converting enzyme.** *Circulation Research* 2006; 98(7): 887-896.

Floyd CN, Ellis BH, Ferro A. **The PLA1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa as a risk factor for stroke: a systematic review and meta-analysis.** *PLoS One* 2014a; 9(7): e100239. doi: 10.1371/journal.pone.0100239.

Floyd CN, Mustafa A, Ferro A. **The PLA1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa as a risk factor for myocardial infarction: a meta-analysis.** *PLoS One* 2014b; 9(7): e101518. doi: 10.1371/journal.pone.010518.



Folsom AR, Cushman M, Tsai MY, Heckbert SR, Aleksic N. **Prospective study of the G20210A polymorphism in the prothrombin gene, plasma prothrombin concentration, and incidence of venous thromboembolism.** American Journal of Hematology 2002; 71(4): 285-290.

Ford ES, Zhao G, Li C, Pearson WS. **Serum concentrations of vitamin D and parathyroid hormone and prevalent metabolic syndrome among adults in the United States.** Journal of Diabetes 2009; 1(4): 296-303.

Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, et al. **A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 2002; 99(8): 5606-5611.

Frost P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. **A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase.** Nature Genetics 1995; 10(1): 111-113.

## G

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. **The structure of haplotype blocks in the human genome.** Science 2002; 296(5576): 2225-2229.

Gabriela Nielsen M, Congiu C, Bortolomasi M, Bonvicini C, Bignotti S, Abate M, et al. **MTHFR: genetic variants, expression analysis and COMT interaction in major depressive disorder.** Journal of Affective Disorders 2015; 183: 179-186.

Gelbaya TA, Potdar N, Jevc YB, Nardo LG. **Definition and epidemiology of unexplained infertility.** Obstetrical and Gynecological Survey 2014; 69(2): 109-115.

Gernand AD, Bodnar LM, Klebanoff MA, Parks WT, Simhan HN. **Maternal serum 25-hydroxyvitamin D and placental vascular pathology in a multicenter US cohort.** The American Journal of Clinical Nutrition 2013; 98(2): 383-388.

Geva E, Amit A, Lerner-Geva L, Azem F, Yovel I, Lessing JB. **Autoimmune disorders: another possible cause for in-vitro fertilization and embryo transfer failure.** Human Reproduction 1995; 10(10): 2560-2563.

Glueck CJ, Jetty V, Rothschild M, Duhon G, Shah P, Prince M, et al. **Associations between serum 25-hydroxyvitamin D and lipids, lipoprotein cholesterols and homocysteine.** North American Journal of Medical Science 2016; 8(7): 284-290.

Gong FF, Hu CY, Lu SS, Qian ZZ, Feng F, Wu YL, et al. **Association of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion, angiotensin II receptor A1166C and endothelial nitric oxide synthase 4b/a gene polymorphisms with pregnancy hypertensive disorders: a meta-analysis.** Journal of Clinical Hypertension 2015; 17(12): 954-962.

Grandone E, Colaizzo D, Lo Bue A, Checola MG, Cittadini E, Margaglione M. **Inherited thrombophilia and in vitro fertilization implantation failure.** Fertility and Sterility 2001; 76(1): 201-202.

Grandone E, Guiotto G, Cerbone AM, Di Minno G. **Linee guida sull'uso dei farmaci anticoagulanti e antiaggreganti in ostetricia e ginecologia.** Haematologica 2002; 87(S12): 1-20.

Greer IA, Nelson-Piercy C. **Low-molecular-weight heparins for thromboprophylaxis and treatment of venous thromboembolism in pregnancy: a systematic review of safety and efficacy.** Blood 2005; 106(2): 401-407.

Grundmann M, Haidar M, Placzko S, Niendorf R, Darashchonak N, Nubel CA, et al. **Vitamin D improves the angiogenic properties of endothelial progenitor cells.** American Journal of Physiology. Cell physiology 2012; 303(9): C954-962.

Guerra-Shinohara EM, Bertinato JF, Tosin Bueno S, Cordeiro da Silva K, Burlacchini de Carvalho MH, Pulcinelli Vieira Francisco R, et al. **Polymorphisms in antithrombin and in tissue factor pathway inhibitor genes are associated with recurrent pregnancy loss.** Thrombosis and Haemostasis 2012; 108(4): 693-700.

## H

Hanson NQ, Aras O, Yang F, Tsai MY. **C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease.** Clinical Chemistry 2001; 47(4): 661-666.

Harris K, Hguyen P, Van Cott EM. **Platelet PLA2 polymorphism and the risk of thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia.** American Journal of Clinical Pathology 2008; 129(2): 282-286.

Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, et al. **The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed.** Journal of Bone Mineral Research 1998; 13(3): 325-349.

Heiskanen JT, Pirskanen MM, Hiltunen MJ, Mannermaa AJ, Punnonen KR, Heinonen ST. **Insertion-deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is associated with obstetric cholestasis but not with preeclampsia.** American Journal of Obstetrics and Gynecology 2001; 185(3): 600-603.

Hiltunen LM, Laivuori H, Rautanen A, Kaaja R, Kere J, Krusius T, et al. **Factor V Leiden as a risk factor for preterm birth-a population-based nested case-control study.** Journal of Thrombosis and Haemostasis 2011; 9(1): 71-78.

Hu J, Igarashi A, Kamata M, Nakagawa H. **Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity.** Journal of Biological Chemistry 2001; 276: 47863-47868.

Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. **Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene.** The Journal of Biological Chemistry 1991; 266(23): 15377-15383.

## I

Ingles SA, Haile RW, Henderson BE, Kolonel LN, Nakaichi G, Shi CY, et al. **Strength of linkage disequilibrium between two vitamin D receptor markers in five ethnic groups: implications for association studies.** Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention 1997; 6(2): 93-98.

Isik G, Demirezen S, Donmez HG, Beksac MS. **Bacterial vaginosis in association with spontaneous abortion and recurrent pregnancy losses.** Journal of Cytology 2016; 33(3): 135-140.

Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. **Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations.** American Journal of Human Genetics 2000; 67(4): 986-990.

Ito M, Itakura A, Ohno Y, Nomura M, Senga T, Nagasaka T, et al. **Possible activation of the renin-angiotensin system in the fetoplacental unit in preeclampsia.** The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2002; 87(4): 1871-1878.

Izzo CR, Monteleone PA, Serafini PC. **Human reproduction: current status.** Revista da Associação Médica Brasileira 2015; 61(6): 557-559.

## J

Jakovljević K, Mališić E, Cavić M, Radulović S, Janković R. **Association between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and risk of chronic myeloid leukemia in Serbian population.** *Leukemia and Lymphoma* 2012; 53(7): 1327-1330.

James AH, Rhee E, Thames B, Philipp CS. **Characterization of antithrombin levels in pregnancy.** *Thrombosis Research* 2014; 134(3): 648-651.

Jamshidi M, Fagerholm R, Khan S, Aittomaki K, Czene K, Darabi H, et al. **SNP-SNP interaction analysis of NF- $\kappa$ B signaling pathway on breast cancer survival.** *Oncotarget* 2015; 6(35): 37979-37994.

Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. **Differences in the properties and enzymatic specificities of two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides.** *The Journal of Biological Chemistry* 1993; 268(13): 9496-9503.

Jones PA. **Overview of cancer epigenetics.** *Seminars in Hematology* 2005; 42(3 Suppl 2): S3-8.

Jood K, Ladvall P, Tjarnlund-Wolf A, Ladvall C, Andersson M, Nilsson S, et al. **Fibrinolytic gene polymorphism and ischemic stroke.** *Stroke* 2005; 36(10): 2077-2081.

Jordan FL, Nandorff A. **The familial tendency in thrombo-embolic disease.** *Acta Medica Scandinavica* 1956; 156(4): 267-275.

Jurutka PW, Whitfield GK, Hsieh JC, Thompson PD, Haussler CA, Haussler MR. **Molecular nature of vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression.** *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 2001; 2(2): 203-216.

**K**

Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. **Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase.** American Journal of Human Genetics 1988; 43(4): 414-421.

Kajantie E, Rautanen A, Kere J, Andersson S, Yliharsila H, Osmond C, et al. **The effects of the ACE gene insertion/deletion polymorphism on glucose tolerance and insulin secretion in elderly people are modified by birth weight.** The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2004; 89(11): 5738-5741.

Kersten FA, Hermes RP, Braat DD, Hoek A, Mol BW, Goddijn M, et al. **Overtreatment in couples with unexplained infertility.** Human Reproduction 2015; 30(1): 71-80.

Khatami M, Heidari MH. **Common rs5918 (PLA1/A2) polymorphism in the ITGB3 gene and risk of coronary artery disease.** Archives of Medical Science- Atherosclerotic Diseases 2016; 1: e9-e15. doi: 10.5114/amsad.2016.59587.

Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. **Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants.** British Journal of Obstetrics and Gynaecology 1986; 93(10): 1049-1059.

Kocsis I, Gyorffy B, Nemeth E, Vasarhelyi B. **Examination of Hardy-Weinberg equilibrium in papers of Kidney International: an underused tool.** Kidney International 2004; 65(5): 1956-1958.

Koenderman JS, Reitsma PH. **Inherited thrombophilia: past, present and future research.** 2011, doi: 10.5772/26050. dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/thrombophilia/inherited-thrombophilia-past-present-and-future-research>

Kohler HP, Grant PJ. **Plasimogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease.** The New England Journal of Medicine 2000; 342(24): 1792-1801.

Komsa-Penkova R, Golemanov G, Tsankov B, Ivanov P, Beshev L, Tonchev P. **Rs5918 ITGB3 polymorphism, smoking, and BMI as risk factors for early onset and recurrence of DVT in young women.** Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis 2016; doi: 10.1177/1076029615624778.

Kondoh G, Tojo H, Nakatani Y, Komazawa N, Murata C, Yamagata K, et al. **Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization.** Nature Medicine 2005; 11(2): 160-166.

Kostner K, Denzer N, Muller CS, Klein R, Tilgen W, Reichrath J. **The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature.** Anticancer Research 2009; 29(9): 3511-3536.

Kovač M, Mitić G, Miković Z, Đorđević V, Savić O, Mandić V, et al. **Thrombophilia in women with pregnancy-associated complications: fetal loss and pregnancy-related venous thromboembolism.** Gynecologic and Obstetric Investigation 2010; 69(4): 233-238.

Kovacs P, Matyas S, Boda K, Kaali SG. **The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome.** Human Reproduction 2003; 18(11): 2337-2341.

Kujovich JL. **Factor V Leiden thrombophilia.** Genetics in Medicine 2011; 13(1): 1-16.

Kupka MS, D'Hooghe, AP Ferraretti, de Mouzon J, Erb K, Castilla JA, et al. **Assisted reproductive technology in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE.** Human Reproduction 2016; 31(2):233-248.

Kurzawinska G, Barlik M, Drews K, Rozycka A, Seremak-Mrozikiewicz A, Ozarowski M, et al. **Coexistence of ACE (I/D) and PAI-1 (4G/5G) gene variants**

**in recurrent miscarriage in Polish population.** Ginekologia polska 2016; 87(4): 271-276.

Kozomara A, Griffiths-Jones S. **miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data.** Nucleic Acids Research 2014; 42(Database issue): D68-73.

## L

Labor B, Hauptmann E, i sar. **Hematologija** 2007, pp 66-74, Skolska knjiga d.d. Zagreb, Hrvatska.

Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. **Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia.** Hypertension 2005; 46(5): 1077-1085.

Lane DA, Kunz G, Olds RJ, Thein SL. **Molecular genetics of antithrombin deficiency.** Blood Reviews 1996; 10(2): 59-74.

Langer B, Grima M, Coquard C, Bader AM, Schlaeder G, Imbs JL. **Plasma active renin, angiotensin I, and angiotensin II during pregnancy and in preeclampsia.** Obstetrics and Gynecology 1998; 91(2): 196-202.

Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Eder T, Wascher TC, Paulweber B, et al. **Integrin alpha-2 beta-3 gene polymorphisms and breast cancer risk.** Breast Cancer Research and Treatment 2006; 97(1): 67-72.

Laverny G, Penna G, Vetrano S, Correale C, Nebuloni M, Danese S, et al. **Efficacy of a potent and safe vitamin D receptor agonist for the treatment of inflammatory bowel disease.** Immunology Letters 2010; 131(1): 49-58.

Lee DH, Walker IR, Teitei J, Poon MC, Ritchie B, Akabutu J, et al. **Effect of the factor V Leiden mutation on the clinical expression of severe hemophilia A.** Thrombosis and Haemostasis 2000a; 83(3): 387-391.



Lee H, Choi E, Seomun Y, Montgomery K, Huebner A, Lee E, et al. **High-resolution transcript map of the region spanning D12S1629 and D12S312 at chromosome 12q13: a triple A syndrome-linked region.** *Genome Research* 2000b; 10(10): 1561-1567.

Levin BL, Varga E. **MTHFR: Addressing genetic counseling dilemmas using evidence-based literature.** *Journal of Genetic Counseling* 2016; 25(5): 901-911.

Levine MJ, Teegarden D. **1 $\alpha$ , 25-dihydroxycholecalciferol increases the expression of vascular endothelial growth factor in C3H10T1/2 mouse embryo fibroblasts.** *The Journal of Nutrition* 2004; 134(9): 2244-2250.

Li Q, Verma IM. **NF-kappaB regulation in the immune system.** *Nature reviews. Immunology* 2002; 2(10): 725-734.

Li WX, Dai SX, Zheng JJ, Liu JQ, Huang JF. **Homocysteine metabolism gene polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) jointly elevate the risk of folate deficiency.** *Nutrients* 2015; 7(8): 6670-6687.

Liatsikos SA, Tsikouras P, Manav B, Csorba R, von Tempelhoff GF, Galazios G. **Inherited thrombophilia and reproductive disorders.** *Journal of the Turkish German Gynecological Association* 2016; 17(1): 45-50.

Lindqvist PG, Zoller B, Dahlback B. **Improved hemoglobin status and reduced menstrual blood loss among female carriers of factor V Leiden-an evolutionary advantage?** *Thrombosis and Haemostasis* 2001; 86(4): 1122-1123.

Lijnen HR. **Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005; 3(1): 35-45.

Lin WY, Wan L, Tsai CH, Chen RH, Lee CC, Tsai FJ. **Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with risk of Hashimoto's thyroiditis in**

**Chinese patients in Taiwan.** Journal of Clinical Laboratory Analysis 2006; 20(3): 109-112.

Liu NQ, Hewison M. **Vitamin D, the placenta and pregnancy.** Archives of Biochemistry and Biophysics 2012; 523(1): 37-47.

Liu JJ, Bertrand KA, Karageorgi S, Giovannucci E, Hankinson SE, Rosner B, et al. **Prospective analysis of vitamin D and endometrial cancer risk.** Annals of Oncology 2013; 24(3): 687-692.

Liu SL, Zhao YP, Dai MH, You L, Wen Z, Xu JW. **Vitamin D status and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis.** Chinese Medical Journal 2013; 126(17): 3356-3359.

Lou XY, Chen GB, Yan L, Ma JZ, Mangold JE, Zhu J, et al. **A combinatorial approach to detecting gene-gene and gene-environmental interactions in family studies.** American Journal of Human Genetics 2008; 83(4): 457-467.

## M

Ma YQ, Qin J, Plow EF. **Platelet integrin alpha(IIb)beta(3): activation mechanisms.** Journal of Thrombosis and Haemostasis 2007; 5(7): 1345-1352.

Macleane PS, Tait RC. **Hereditary and acquired antithrombin deficiency: epidemiology, pathogenesis and treatment options.** Drugs 2007; 67(10): 1429-1440.

Mansilha A, Araujo F, Severo M, Sampaio SM, Toledo T, Albuquerque R. **Genetic polymorphisms and risk of recurrent deep venous thrombosis in young people: prospective cohort study.** European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2005; 30(5): 545-549.

Many A, Schreiber I, Rosner S, Lessing JB, Eldor A, Kupferminc MJ. **Pathologic features of the placenta in women with severe pregnancy complications and thrombophilia.** Obstetrics and Gynecology 2001; 98(6): 1041-1044.

Malinow MR, Nieto FJ, Kruger WD, Duell PB, Hess DL, Gluckman RA, et al. **The effects of folic acid supplementation on plasma total homocysteine are modulated by multivitamin use and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes.** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997; 17(6): 1157-1162.

Margaglione M, Brancaccio V, Ciampa A, Papa ML, Grandone E, Di Minno G. **Inherited thrombophilic risk factors in a large cohort of individuals referred to Italian thrombophilia centers: distinct roles in different clinical settings.** *Haematologica* 2001; 86(6): 634-639.

Margetic S. **Inflammation and haemostasis.** *Biocemia Medica* 2012; 22(1): 49-62.

Martinelli I, Taioli E, Ragni G, Levi-Setti P, Passamonti SM, Battaglioli T, et al. **Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia.** *Haematologica* 2003; 88(7): 789-793.

Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. **National, regional and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys.** *PLOS Medicine* 2012; 9(12): e10013569. doi: 10.1371/journal.pmed.1001356.

Mastrolia SA, Mazor M, Holcberg G, Leron E, Beharier O, Loverro G, et al. **The physiologic anticoagulant and anti-inflammatory role of heparins and their utility in the prevention of pregnancy complications.** *Thrombosis and Haemostasis* 2015; 113(6): 1236-1246.

McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, Aganna E, Curtis D, Boucher BJ, et al. **Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians.** *Diabetologia* 1997; 40(8): 971-975.

Mehta S, Giovannucci E, Mugusi FM, Spiegelman D, Aboud S, Hertzmark E, et al. **Vitamin D status of HIV-infected women and its association with HIV**

**disease progression, anemia, and mortality.** PLoS One 2010; 5(1): e8770. doi: 10.1371/journal.pone.0008770.

Mehta S, Hunter DJ, Mugusi FM, Spiegelman D, Manji KP, Giovannucci EL, et al. **Perinatal outcomes, including mother-to-child transmission of HIV, and child mortality and their association with maternal vitamin D status in Tanzania.** The Journal of Infectious Diseases 2009; 200(7): 1022-1030.

Mello G, Parretti E, Gensini F, Sticchi E, Mecacci F, Scarselli G, et al. **Maternal-fetal flow, negative events, and preeclampsia: role of ACE I/D polymorphism.** Hypertension 2003; 41(4): 932-937.

Mitić G, Kovač M, Povazan L, Magić Z, Đorđević V, Salatić I, et al. **Inherited thrombophilia is associated with pregnancy losses that occur after 12th gestational week in Serbian population.** Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis 2010; 16(4): 435-439.

Modarresi-Ghazani F, Hejazi ME, Gharekhani A, Entezari-Maleki T. **Role of Vitamin D in cardiovascular disease.** Archives of Iranian Medicine 2016; 19(5): 359-362.

Mohri T, Nakajima M, Takagi S, Komagata S, Yokoi T. **MicroRNA regulates human vitamin D receptor.** International Journal of Cancer 2009; 125(6): 1328-1333.

Morgan T, Craven C, Ward K. **Human spiral artery renin-angiotensin system.** Hypertension 1998; 32(4): 683-687.

Morgan L, Foster F, Hayman R, Crawshaw S, Baker PN, Broughton Pipkin F, et al. **Angiotensin-converting enzyme insertion-deletion polymorphism in normotensive and pre-eclamptic pregnancies.** Journal of Hypertension 1999; 17(6): 765-768.

Morelli VM, De Visser MC, Vos HL, Bertina RM, Rosendaal FR. **ABO blood group genotypes and the risk of venous thrombosis: effect of factor V Leiden.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005; 3(1): 183-185.

Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. **Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1992; 89(15): 6665-6669.

Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nquyen TV, et al. **Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles.** *Nature* 1994; 367(6460): 284-287.

Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, et al. **Genetic Polymorphism of 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease.** *Circulation* 1997; 95(8): 2032-2036.

Mory DB, Gabbay MAL, Rocco ER, Kasamatsu T, Crispim F, Miranda WL, et al. **High frequency of vitamin D receptor gene polymorphism FokI in Brazilian Type 1 diabetes mellitus patients with clinical autoimmune thyroid disease.** *Diabetology and Metabolic Syndrome* 2016; 8:29. doi: 10.1186/s13098-016-0145-5.

Motsinger AA, Ritchie MD. **Multifactor dimensionality reduction: an analysis strategy for modelling and detecting gene-gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies.** *Human Genomics* 2006; 2(5): 318-328.

Munhoz TP, Scheibe RS, Schmitt VM. **Angiotensin converting enzyme (ACE) DD genotype: relationship with venous thrombosis.** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2005; 27 (2): 87-90.

Murk W, DeWan AT. **Exhaustive genome-wide search for SNP-SNP interactions across 10 human diseases.** *G3 (Bethesda)* 2016; 6(7): 2043-2050.

**N**

Nakamura S, Nakamura I, Ma L, Vaughan DE, Fogo AB. **Plasminogen activator inhibitor-1 expression is regulated by the angiotensin type 1 receptor in vivo.** *Kidney International* 2000; 58(1): 251-259.

Nawaz SK, Hasnain S. **Pleiotropic effects of ACE polymorphism.** *Biochemia Medica* 2009; 19(1): 36-49.

Nelson DB, Hanlon AL, Wu G, Liu C, Fredricks DN. **First trimester levels of BV-associated bacteria and risk of miscarriage among women early in pregnancy.** *Maternal and Child Health Journal* 2015; 19(12): 2682-2687.

Ng EH, Tang OS, Ho PC. **The significance of the number of antral follicles prior to stimulation in predicting ovarian responses in an IVF programme.** *Human Reproduction* 2000; 15(9): 1937-1942.

Nieto G, Barber Y, Rubio MC, Rubio M, Fibla J. **Association between AIDS disease progression rates and the Fok-I polymorphism of the VDR gene in a cohort of HIV-1 seropositive patients.** *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2004; 89-90(1-5): 99-207.

**O**

Ogino S, Wilson RB. **Genotype and haplotype distributions of MTHFR677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis.** *Journal of Human Genetics* 2003; 48(1): 1-7.

Onalan O, Balta G, Oto A, Kabakci G, Tokgozoglu L, Aytemir K, et al. **Plasminogen activator inhibitor-1 4G4G genotype is associated with myocardial infarction but not with stable coronary artery disease.** *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2008; 26(3): 211-217.

Orlov I, Rochel N, Moras D, Klaholz BP. **Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA.** The EMBO journal 2012; 31(2): 291-300.

Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Stickland MH, Wilson IJ, Grant PJ. **Plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G genotype and plasma levels in relation to a history of myocardial infarction in patients characterized by coronary angiography.** Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 1997; 17(1): 33-37.

## P

Pagliardini L, Vigano P, Molgore M, Persico P, Salonia A, Vailati SH, et al. **High prevalence of vitamin D deficiency in infertile women referring for assisted reproduction.** Nutrients 2015; 7(12): 9972-9984.

Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH, et al. **Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans.** Diabetes 2000; 49(3): 504-507.

Pastinen T, Perola M, Niini P, Terwilliger J, Salomaa V, Vartiainen E, et al. **Array-based multiplex analysis of candidate genes reveals two independent and additive genetic risk factors for myocardial infarction in the Finnish population.** Human Molecular Genetics 1998; 7(9): 1453-1462.

Patnaik MM, Moll S. **Inherited antithrombin deficiency: a review.** Haemophilia 2008; 14(6): 1229-1239.

Parveen F, Tuteja M, Agrawal S. **Polymorphisms in MTHFR, MTHFD, and PAI-1 and recurrent miscarriage among North Indian women.** Archives of Gynecology and Obstetrics 2013; 288(5): 1171-1177.

Peng CJ, Lee KL, Ingersoll GM. **An introduction to logistic regression analysis and reporting.** The Journal of Educational Research 2002; 96(1): 3-14.

Pepe G, Rickards O, Vanegas OC, Brunelli T, Gori AM, Giusti B, et al. **Prevalence of factor V Leiden mutation in non-European populations.** *Thrombosis and Haemostasis* 1997; 77(2): 329-331.

Pepe G, Camacho Vanegas O, Giusti B, Brunelli T, Marcucci R, Attanasio M, et al. **Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase.** *American Journal of Human Genetics* 1998; 63(3): 917-920.

Pileri P, Franchi F, Cetin I, Mando C, Antonazzo P, Ibrahim B, et al. **Maternal and fetal thrombophilia in intrauterine growth restriction in the presence or absence of maternal hypertensive disease.** *Reproductive Sciences* 2010; 17(9): 844-848.

Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. **A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis.** *Blood* 1996; 88(10): 3698-3703.

Pourgheysari B, Boroujeni HR, Hasheminia AM, Drees F. **PLA2 polymorphism of platelet glycoprotein IIb/IIIa but not Factor V Leiden and prothrombin G20210A polymorphisms is associated with venous thromboembolism and more recurrent events in central Iran.** *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2013; 24(5): 471-476.

Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, Briet E, Berntorp E, Conard J, et al. **Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia.** *Lancet* 1996; 348(9032): 913-916.

Pu X, Gu Z, Wang X. **Polymorphisms of the interleukin 6 gene and additional gene-gene interaction contribute to cervical cancer susceptibility in Eastern Chinese women.** *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2016; 294(6): 1305-1310.



## Q

Quaas A, Dokras A. **Diagnosis and treatment of unexplained infertility.** Reviews in Obstetrics and Gynecology 2008; 1(2):69-76.

Qublan HS, Malkawi HY, Tahat YA, Areidah S, Nusair B, Khreisat BM, et al. **In-vitro fertilization treatment: factors affecting its results and outcome.** Journal of Obstetric and Gynaecology 2005; 25(7): 689-693.

Qublan HS, Eid SS, Ababneh HA, Amarin ZO, Smadi AZ, Al-Khafaji FF, et al. **Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure.** Human Reproduction 2006; 21(10): 2694-2698.

## R

Rai R, Kim JJ, Misra S, Kumar A, Mittal B. **A multiple ineration analysis reveals ADRB3 as a potential candidate for gallbladder cancer predisposition via a complex interaction with other candidate gene variations.** International Journal of Molecular Sciences 2015; 16(12): 28038-28049.

Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Maugeri NJ, Lincoln MR, Burell A, et al. **A ChiP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution.** Genome Research 2010; 20(10): 1352-1360.

Raspollini MR, Oliva E, Roberts DJ. **Placental histopathologic features in patients with thrombophilic mutations.** The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine 2007; 20(2): 113-123.

Rees DC, Cox M, Clegg JB. **World distribution of factor V Leiden.** Lancet 1995; 346(8983): 1133-1134.

Reich LM, Bower M, Key NS. **Role of the geneticist in testing and counseling for inherited thrombophilia.** Genetics in Medicine: official journal of the American College of Medical Genetics 2003; 5(3): 133-143.

Renner W, Winkler M, Hoffmann C, Koppel H, Seinost G, Brodmann M, et al. **The PLA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa is not associated with deep venous thrombosis.** *International Angiology* 2001; 20(2): 148-151

Ridker PM, Miletich JP, Hennekens CH, Buring JE. **Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening.** *Journal of the American Medical Association/JAMA* 1997a; 277(16): 1305-1307.

Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. **PLA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis.** *The Lancet* 1997b; 349(9049): 385-388.

Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. **G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in a large cohort of US men.** *Circulation* 1999; 99(8): 999-1004.

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. **An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels.** *Journal of Clinical Investigation* 1990; 86(4): 1343-1346.

Roberts LN, Patel RK, Arya R. **Venous thromboembolism and ethnicity.** *British Journal of Haematology* 2009; 146(4): 369-383.

Rodger MA, Betancourt MT, Clark P, Lindqvist PG, Dizon-Townson D, Said J, et al. **The association of factor V Leiden and prothrombin gene mutation and placenta-mediated pregnancy complications: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies.** *PLOS Medicine* 2010; 15: 7(6): e1000292. doi: 10.1371/journal.pmed.1000292.

Roest M, van der Schouw YT, Banga JD, Tempelman MJ, de Groot PG, Sixma JJ, et al. **Plasminogen activator inhibitor 4G polymorphism is associated with**

**decreased risk of cerebrovascular mortality in older women.** *Circulation* 2000; 101(1): 67-70.

Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opare-Sem O, Zivelin A, Geffen E, et al. **The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans.** *American Journal of Human Genetics* 2002; 70(3): 758-762.

Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. **High risk of thrombosis in patients homozygous for Factor V Leiden (Activated Protein C Resistance).** *Blood* 1995; 85(6): 1504-1508.

Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RT, Hamerton JL. **Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively.** *Somatic Cell and Molecular Genetics* 1987; 13(3): 285-292.

Ruzzi L, Ciarafoni I, Silvestri L, Semeraro ML, Abeni D. **Association of PLA2 polymorphism of the ITGB3 gene with early fetal loss.** *Fertility and Sterility* 2005; 83(2): 511-512.

## S

Safdarian L, Najmi Z, Aleyasin A, Aghahosseini M, Rashidi M, Asadollah S. **Recurrent IVF failure and hereditary thrombophilia.** *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 2014; 12(7):467-470.

Saffari B, Senemar S, Karimi M, Bahari M, Jooyan N, Yavarian M. **An MTHFR variant, plasma homocysteine levels and late-onset coronary artery disease in subjects from southern Iran.** *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2013; 16(16): 788-795.

Sakariassen KS, Bolhuis PA, Sixma JJ. **Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-Von Willebrand factor bound to the subendothelium.** *Nature* 1979; 279(5714): 636-638.

Saliba W, Awad K, Ron G, Elias M. **The effect of vitamin D supplementation on thrombin generation assessed by the calibrated automated thrombogram.** *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2016; 22(4): 340-345.

Sartori MT, Wiman B, Vettore S, Dazzi F, Girolami A, Patrassi GM. **4G/5G polymorphism of PAI-1 gene promoter and fibrinolytic capacity in patients with deep vein thrombosis.** *Thrombosis and Haemostasis* 1998; 80(6): 956-960.

Savić-Pavićević D, Matic G. **Molekularna biologija 1.** Beograd: NNK International; 2011.

Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM, Wittteman JCM. **ACE polymorphisms.** *Circulation Research* 2006; 98(9): 1123-1133.

Schleef RR, Higgins DL, Pillemer E, Levitt LJ. **Bleeding diathesis due to decreased functional activity of type 1 plasminogen activator inhibitor.** *Journal of Clinical Investigation* 1989; 83(5): 1747-1752

Segers K, Dahlback B, Nicolaes GA. **Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms.** *Thrombosis and Haemostasis* 2007; 98(3): 530-542.

Selvaraj P, Prabhu Anand S, Harishankar M, Alagarasu K. **Plasma 1,25 dihydroxy vitamin D3 level and expression of Vitamin D receptor and cathelicidin in pulmonary tuberculosis.** *Journa of Clinical Immunology* 2009; 29(4): 470-478.

Seremak-Mrozikiewicz A. **Significance of genetic polymorphism investigations in pregnancy complications.** *Archives of Perinatal Medicine* 2013; 19(1): 7-11.

Shahrokhi SZ, Ghaffari F, Kazerouni F. **Role of vitamin D in female reproduction.** *Clinica Chimica Acta* 2016; 455: 33-38.

Sharma A, Bhakuni T, Ranjan R, Kumar R, Kishor K, Kamal VK, et al. **Polymorphisms in factor V and antithrombin III gene in recurrent pregnancy loss: a case-control study in Indian population.** Journal of Thrombosis and Thrombolysis 2015; 39(4): 481-488.

Shin JS, Choi MY, Longtine MS, Nelson DM. **Vitamin D effects on pregnancy and the placenta.** Placenta 2010; 31(12): 1027-1034.

Singh PK, Long MD, Battaglia S, Hu Q, Liu S, Sucheston-Campbell LE, et al. **VDR regulation of microRNA differs across prostate cell models suggesting extremely flexible control of transcription.** Epigenetics 2015; 10(1): 40-49.

Somigliana E, Paffoni A, Busnelli A, Filippi F, Pagliardini L, Vigano P, et al. **Age-related infertility and unexplained infertility: an intricate clinical dilemma.** Human Reproduction 2016; 31(7): 1390-1396.

Sperandei S. **Understanding logistic regression analysis.** Biochemia Medica (Zagreb) 2014; 24(1): 12-18.

Su MT, Lin SH, Chen YC, Kuo PL. **Genetic association studies of ACE and PAI-1 genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis.** Thrombosis and Haemostasis 2013; 109(1): 8-15.

Suarez F, Zeghoud F, Rossignol C, Walrant O, Garabedian M. **Association between vitamin D receptor gene polymorphism and sex-dependent growth during the first two years of life.** The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1997; 82(9): 2966-2970.

## T

Tamez H, Thadhani RI. **Vitamin D and hypertension: an update and review.** Current Opinion in Nephrology and Hypertension 2012; 21(5): 492-499.

Tanamura A, Nomura S, Kurauchi O, Furui T, Mizutani S, Tomoda Y. **Purification and characterization of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> receptor from human**

**placenta.** Journal of Obstetrics and Gynaecology (Tokyo, Japan) 1995; 21(6): 631-639.

Templeton A, Morris JK, Parslow W. **Factors affecting outcome of in-vitro fertilization treatment.** Lancet 1996; 348(9039): 1402-1406.

Targher G, Pichiri I, Lippi G. **Vitamin D, thrombosis, and hemostasis: more than skin deep.** Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2012; 38(1): 114-124.

Tiwari D, Bose PD, Das S, Das CR, Datta R, Bose S. **MTHFR (C677T) polymorphism and PR (PROGINS) mutation as genetic factors for preterm delivery, fetal death and low birth weight: a Northeast Indian population based study.** Meta Gene 2015; 3: 31-42.

Toderici M, de la Morena-Barrio ME, Padilla J, Minano A, Anton AI, Iniesta JA, et al. **Identification of regulatory mutations in SERPINC1 affecting Vitamin D Response Elements associated with antithrombin deficiency.** PLoS One 2016; 11(3): e0152159. doi:10.1371/journal.pone.0152159.

Torabi R, Zarei S, Zeraati H, Zarnani AH, Akhondi MM, Hadavi R, et al. **Combination of thrombophilic gene polymorphisms as a cause of increased the risk of recurrent pregnancy loss.** Journal of Reproduction and Infertility 2012; 13(2):88-94.

## U

Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, Pols HA, van Leeuwen JP. **Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms.** Gene 2004a; 338(2): 143-156.

Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen H, Pols HA. **Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states.** Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2004b; 89-90(1-5): 187-193.

Ulvik A, Ueland PM, Fredriksen A, Meyer K, Vollset SE, Hoff G, et al. **Functional inference of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T and 1298A > C polymorphisms from a large-scale epidemiological study.** Human Genetics 2007; 121(1): 57-64.

Undas A, Brozek J, Szczeklik A. **Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence.** Thrombosis and Haemostasis 2005; 94(5): 907-915.

## V

Van Schooten FJ, Hirvonen A, Maas LM, De Mol BA, Kleinjans JC, Bell DA, et al. **Putative susceptibility markers of coronary artery disease: association between VDR genotype, smoking, and aromatic DNA adduct levels in human right atrial tissue.** FASEB Journal 1998; 12(13): 1409-1417.

Vaughan DE. **The renin-angiotensin system and fibrinolysis.** American Journal of Cardiology 1997; 79(5A): 12-16.

Vanderbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. **Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation.** Lancet 1994; 344(8935): 1453-1457.

Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. **A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?** American Journal of Human Genetics 1998; 62(5): 1044-1051.

Van Etten E, Verlinden L, Giuliatti A, Ramos-Lopez E, Branisteanu DD, Ferreira GB, et al. **The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system.** European Journal of Immunology 2007; 37(2): 395-405.

Van Horn JT, Craven C, Ward K, Branch DW, Silver RM. **Histologic features of placentas and abortion specimens from women with antiphospholipid and antiphospholipid-like syndromes.** *Placenta* 2004; 25(7):642-648.

Varga E. **Inherited thrombophilia: key points for genetic counseling.** *Journal of Genetic Counseling* 2007; 16(3): 261-277.

Varga EA, Kujovich JL. **Management of inherited thrombophilia: guide for genetics professionals.** *Clinical Genetics* 2012; 8(1): 7-17.

Vasilopoulos Y, Sarafidou T, Kotsa K, Papadimitrou M, Goutzelas Y, Stamatis C, et al. **VDR TaqI is associated with obesity in the Greek population.** *Gene* 2013; 512(2): 237-239.

Vettrisilvi V, Vijayalakshmi K, Paul SF, Venkatachalam P. **ACE and MTHFR gene polymorphisms in unexplained recurrent pregnancy loss.** *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2008; 34(3): 301-306.

Vimaleswaran KS, Berry DJ, Lu C, Tikkanen E, Pliz S, Hiraki LT, et al. **Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts.** *PloS One* 2013; 10(2): e1001383. doi: 10.1371/journal.pmed.1001383.

Vimaleswaran KS, Cavadino A, Berry DJ, LifeLines Cohord Study investigators, Jorde R, Dieffenbach AK, et al. **Association of vitamin D status with arterial blood pressure and hypertension risk: a mendelian randomisation study.** *Lancet Diabetes Endocrinology* 2014; 2(9): 719-729.

Vučković BA, van Rein N, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Lijfering WM. **Vitamin supplementation on the risk of venous thrombosis: results from MEGA case-control study.** *The American Journal of Clinical Nutrition* 2015; 101(3): 606-612.



**W**

Wang WZ, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. **Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns.** Nature reviews. Genetics 2005; 6(2): 109-118.

Wang J, Ma HP, Ti Al, Zhang YQ, Zheng H. **Prothrombotic SERPINC1 gene polymorphism may affect heparin sensitivity among different ethnicities of Chinese patients receiving heart surgery.** Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis 2015; 21(8): 760-767.

Wang Y, Si S, Liu J, Wang Z, Jia H, Feng K et al. **The associations of serum lipids with vitamin D status.** PloS One 2016; 11(10): e0165157. doi: 10.1371/journal.pone.0165157.

Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. **A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity.** Molecular Genetics and Metabolism 1998; 64(3): 169-172.

Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtis Ellison R, et al. **The 1298 A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine.** Atherosclerosis 2001; 156(2): 409-415.

Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, et al. **A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis.** The New England Journal of Medicine 1996; 334(17): 1090-1094.

Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, Zitzer H, Oza AK, Dang HT, et al. **Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene.** Molecular and Cellular Endocrinology 2001; 177(1-2): 145-159.

## Y

Yalcintepe S, Ozdemir O, Hacivelioglu SO, Akurut C, Koc E, Uludag A, et al. **Multiple inherited thrombophilic gene polymorphisms in spontaneous abortions in Turkish population.** International Journal of Molecular and Cellular Medicine 2015; 4(2): 120-127.

Yang Y, Luo Y, Yuan J, Tang Y, Xiong L, Xu M, et a. **Association between maternal, fetal and paternal MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms and risk of recurrent pregnancy loss: a comprehensive evaluation.** Archives of Gynecology and Obstetrics 2016; 293(6): 1197-1211.

Yarrington CD, Valente AM, Economy KE. **Cardiovascular management in pregnancy: antithrombotic agents and antiplatelet agents.** Circulation 2015; 132(14): 1354-1364.

Ye WZ, Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanne-Chantelot C, Timsit J, Velho G. **Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity in type 2 diabetic subjects with early age of onset.** European Journal of Endocrinology 2001; 145(2): 181-186.

Yenicesu GI, Cetin M, Ozdemir O, Cetin A, Ozen F, Yenicesu C, et al. **A prospective case-control study analyzes 12 thrombophilic gene mutation in Turkish couples with recurrent pregnancy loss.** American Journal of Reproductive Immunology 2010; 63(2):126-136.

Young G, Becker S, During C, Fridrichs F, Goldenberg N, Kenet G, et al. **Influence of the factor II G20210A variant or the factor V G1691A mutation on symptomatic recurrent venous thromboembolism in children: an international multicenter cohort study.** Journal of Thrombosis and Haemostasis 2009; 7(1): 72-79.

Yu W, Ge M, Shi J, Li X, Zhang J, Wang M, et al. **Role of vitamin D receptor gene polymorphisms in aplastic anemia: a case-control study from China.** *International Journal of Laboratory Hematology* 2016; 38(3): 273-283.

## Z

Zeljić K, Šupić G, Jović N, Kozomara R, Branković-Magić M, Obrenović M, et al. **Association of TLR2, TLR3, TLR4 and CD14 genes polymorphisms with oral cancer risk and survival.** *Oral Diseases* 2014; 20(4): 416-424.

Zella LA, Shevde NK, Hollis BW, Cooke NE, Pike JW. **Vitamin D-binding protein influences total circulating levels of 1,25-dihydroxyvitamin D3 but does not directly modulate the bioactive levels of the hormone in vivo.** *Endocrinology* 2008; 149(7): 3656-3667.

Zen M, Ghirardello A, Iaccarino L, Tonon M, Campana C, Arienti S, et al. **Hormones, immune response, and pregnancy in healthy women and SLE patients.** *Swiss Medical Weekly* 2010; 140(13-14): 187-201.

Zhou JB, Yang JK, Zhang BH, Lu J. **Interaction of Wnt pathway related variants with type 2 diabetes in a Chinese Han population.** *PeerJ* 2015; 3:e1304. doi: 10.7717/peerj.1304.

Zivelin A, Griffin JH, Xu X, Pabinger I, Samama M, Conard J, et al. **A single genetic origin for a common caucasian risk factor for venous thrombosis.** *Blood* 1997; 89(2): 397-402.

Zivelin A, Mor-Cohen R, Kovalsky V, Kombrot N, Conard J, Peyvandi F, et al. **Prothrombin 20210 G>A is an ancestral prothrombotic mutation that occurred in whites approximately 24.000 years ago.** *Blood* 2006; 107(12): 4666-4668.

## **8. BIOGRAFIJA AUTORA**

Jelena Ž. Đurović je rođena 23. avgusta 1984. godine u Beogradu. Diplomirala je 2011. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, smer Primenjena genetika. Doktorske studije je upisala 2012. godine na istom fakultetu, smer Genetika. Od 2013. godine zaposlena je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao saradnik na projektu „Analiza genskih polimorfizama CYP izoenzima u populaciji Srbije“ koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (evidencioni broj OI 175093). Pored učešća u ovom nacionalnom projektu, u toku 2014/2015. godine, učestovala je u naučnom bilateranom projektu sa Republikom Slovenijom, kod istog ministarstva. U toku 2013/2014. godine boravila je 3 meseca na stručnom usavršavanju na Univerzitetu Čanakale u Turskoj. U dosadašnjem periodu objavila je kao prvi autor 3 rada u časopisima međunarodnog značaja (M23), a svoj naučni rad predstavila je i kroz 13 kongresnih saopštenja. Član je Društva genetičara Srbije, Udruženja za farmakogenomiku i personalizovanu terapiju Srbije i Društva molekularnih biologa Srbije.

Spisak objavljenih radova:

1. Đurović J, Stojković O, Todorović J, Savić K, Stamenković G. Should MTHFR 1298 A>C be tested together with MTHFR 677 C>T polymorphism in pregnancy? *Genetika* 2017; 49 (2): 377-386.
2. Đurović J, Stojković O, Todorović J, Brajić A, Stanković S, Obradović S, Stamenković G. Genetics of suspected thrombophilia in Serbian females with infertility, including three cases, homozygous for FII 20210A or FV 1691A mutations. *Human Fertility* 2017; 20(2): 132-139.
3. Đurović J, Stojković O, Ozdemir O, Silan F, Akurut C, Todorović J, Savić K, Stamenković G. Association between FokI, ApaI and TaqI RFLP polymorphisms in VDR gene and Hashimoto's thyroiditis: preliminary data from female patients in Serbia. *International Journal of Immunogenetics* 2015; 42(3); 190-194.

## **9. PRILOZI**

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јелена Ђуровић

Број индекса Б2030/2012

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Анализа полиморфизама гена за рецептор за витамин Д и гена асоцираних са

тромбофилијом код жена са идиопатским инфертилитетом

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Ђуровић

Број индекса Б2030/2012

Студијски програм Биологија, модул Генетика

Наслов рада Анализа полиморфизама гена за рецептор за витамин Д и гена  
асоцираних са тромбофилијом код жена са идиопатским инфертилитетом

Ментор проф. др Оливер Стојковић, доц. др Катарина Зељић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Анализа полиморфизама гена за рецептор за витамин Д и гена асоцираних са  
тромбофилијом код жена са идиопатским инфертилитетом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.