

Kvantitativna analiza mikrokimerizma u perifernoj krvi oboljelih od sistemske skleroze

Anđelić, Toni

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:956481>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Toni Anđelić

**KVANTITATIVNA ANALIZA
MIKROKIMERIZMA U PERIFERNOJ
KRVI OBOLJELIH OD SISTEMSKE
SKLEROZE**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Toni Anđelić

**KVANTITATIVNA ANALIZA
MIKROKIMERIZMA U PERIFERNOJ
KRVI OBOLJELIH OD SISTEMSKE
SKLEROZE**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za analizu DNA pri Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Stana Tokić

Rad ima 37 listova, 5 tablica i 3 slike.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Stani Tokić na pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem višoj tehničarki Ivani Jelavić na pomoći pri radu u laboratoriju.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj obitelji koji su mi davali podršku tijekom školovanja i završetka studija.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Sistemska skleroza.....	1
1.1.1. Epidemiologija	1
1.1.2. Etiologija	1
1.1.3. Patogeneza.....	2
1.1.4. Klinička slika.....	4
1.1.5. Liječenje i prognoza	6
1.2. Mikrokimerizam	7
1.2.1. Majčinski mikrokimerizam (MMc)	7
1.2.2. Fetalni mikrokimerizam (FMc).....	8
1.2.3. Utjecaj fetalnog mikrokimerizma u sistemske sklerozi.....	10
2. HIPOTEZA	11
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	12
4. MATERIJALI I METODE	13
4.1. Materijali	13
4.1.1. Ispitanici.....	13
4.1.2. Upotrijebljene kemikalije.....	13
4.2. Metode	14
4.2.1. Izolacija ukupnih perifernih leukocita (PBMC).....	14
4.2.2. Izolacija DNA	15
4.2.3. Mjerenje koncentracije DNA Qubit® Fluorometrom.....	15
4.2.4. Mjerenje koncentracije DNA komercijalnim kompletom Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification.....	16
4.2.5. Analiza biljega Y-STR.....	18
4.3. Statističke metode.....	20
5. REZULTATI.....	21
5.1. Klinička i biokemijska obilježja ispitanika	21
5.2. Analiza prisutnosti i koncentracije Y-DNA u zdravih ispitanika i oboljelih od SSc-a. 21	
5.2.1. Pokazatelji učinkovitosti i preciznosti amplifikacije odsječaka Y-DNA.....	21
5.2.2. Koncentracija DNA izmjerena primjenom Qubit fluorometra	23
5.2.3. Pojavnost i koncentracija Y-DNA u uzorcima zdravih ispitanika i oboljelih od SSc-a	23

5.3. Analiza odsječaka STR na kromosomu Y	24
6. RASPRAVA.....	27
7. ZAKLJUČAK	31
8. SAŽETAK.....	32
9. SUMMARY	33
10. LITERATURA.....	34
11. ŽIVOTOPIS	37

POPIS KRATICA

ACA - anticentromerna protutijela (engl. anticentromere antibody)

ACE inhibitors – inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima

ANA – antinuklearna protutijela (engl. antinuclear antibody)

Anti-Scl-70 - protutijela na topoizomerazu I (engl. anti-topoisomerase I antibody)

cGVHD – kronična bolest presatka protiv primatelja (engl. chronic Graft-versus-Host disease)

CMV – citomegalovirus

dcSSc – difuzni oblik sistemske skleroze (engl. diffuse cutaneous systemic sclerosis)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)

ECM – izvanstanični matriks (engl. extracellular matrix)

ELAM-1 – endotelna-leukocitna adhezijska molekula 1 (engl. endothelial leukocyte adhesion molecule 1)

ET-1 - endotelin-1 (engl. endothelin-1)

FISH – fluorescentna in situ hibridizacija (engl. fluorescence in situ hybridization)

FMc – fetalni mikrokimerizam (engl. fetal microchimerism)

GI – Gastrointestinalni

HLA – humani leukocitni antigen (engl. human leukocyte antigen)

HTLV-1 - virus leukemije / limfoma ljudskih stanica T-tipa 1

IL – intraleukin (engl. intraleukin)

ILD – intersticijska bolest pluća (engl. interstitial lung disease)

IPC - engl. internal PCR control

lcSSc – ograničeni oblik sistemske skleroze (engl. limited cutaneous systemic sclerosis)

MMc – majčinski mikrokimerizam (engl. maternal microchimerism)

NIMA - ne-nasljeđeni aleli majke (engl. non-inherited maternal allelels)

NK cells – stanice prirodne ubojice (engl. natural killer cells)

NLS - neonatalni lupusni sindrom (engl. neonatal lupus syndrome)

PBC - primarna bilijarna ciroza (engl. primary biliary cirrhosis)

PBMC – mononuklearne stanice iz periferne krvi (engl. peripheral blood mononuclear cells)

PCR – lančana reakcija polimerahze (engl. polimerase chain reaction)

PDGF - faktor rasta trombocita (engl. platelet-derived growth factor)

PHA – fitohemaglutinin (engl. phytohaemagglutinin)

PPI – inhibitori protonske pumpe (engl. inhibitors proton pump)

qPCR – lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. quantitative polymerase chain reaction)

SCID - teški kombinirani sindrom imunodeficijencije (engl. severe combined immunodeficiency)

SLE - sistemski eritemski lupus (engl. systemic lupus erythematosus)

SRY – engl. sex-determining region Y

SSc – sistemska skleroza (engl. systemic sclerosis)

STR – kratka tandemska ponavljanja (engl. short tandem repeats)

TGF- β - transformirajući faktor rasta (engl. transforming growth factor β) Th1 – pomoćničke T stanice tipa 1 (engl. T Helper Cell)

Th2 – pomoćničke stanice T tipa 2

TLR - Toll-like receptori

VCAM-1 – vaskularna stanična adhezijska molekula 1 (engl. vascular cell adhesion molecule)

VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta (engl. vascular endothelial growth factor)

1.UVOD

1.1. Sistemska skleroza

Sistemska je skleroza (SSc) kronična autoimuna bolest vezivnog tkiva nepoznate etiologije. Bolest obilježava razvoj upalnog autoimunog odgovora, proširena vaskulopatija i disfunkcija fibroblasta koji posreduju taloženje kolagena u koži i unutrašnjim organima. SSc dijeli neke kliničke sličnosti s kroničnom bolešću transplantata protiv primatelja (cGVHD), uključujući pojavu velikog broja autoreaktivnih pomoćničkih (engl. helper) limfocita Th2. Limfociti Th2 posreduju infiltraciju eozinofila i bazofila, poliklonalnu aktivaciju limfocita B i proizvodnju protutijela usmjerenih protiv različitih antigena domaćina (1, 2). SSc je podijeljen na difuzne (dcSSc) i ograničene kožne (lcSSc) oblike na temelju stupnja zahvaćenosti kože (3).

1.1.1. Epidemiologija

Bolest je rijetka, s pojavom od tri do dvanaest slučajeva na milijun stanovnika, a tri do pet puta češće obolijevaju žene, posebice u reproduktivnoj fazi. SSc se najčešće pojavljuje u dobi od 30. do 50. godine života, a u djetinjstvu tek iznimno. Bolest je proširena po čitavom svijetu i rijetka je u starijih od 75 godina (4, 5).

1.1.2. Etiologija

Uzrok je bolesti nepoznat. Kao mogući uzročnici bolesti navode se genetički čimbenici, infekcije i okolišni čimbenici.

SSc se češće javlja u obiteljima oboljelih od SSc-a (1,6 %), nego u općoj populaciji. Vjerojatnost razvoja bolesti je < 1 % među potomcima pacijenata premda pozitivna obiteljska anamneza predstavlja najjači identificirani faktor. Vaskulopatija je najvažnija nasljedna komponenta, a fibroza je manje poligena (6). Difuzni oblik SSc-a iskazuje ekspresiju fibroproliferativnog gena poput gena CTFG koji inducira proliferaciju, proizvodnju izvanstaničnog matriksa i kemotaksiju mezenhimskih stanica, dok lcSSc izražava ekspresiju

upalnog gena poput STAT4 koji potiče razvoj stanica Th1 i negativni je regulator razvoja stanica Th2 (7). U pozadini razvoja SSc-a do danas otkriveno je više gena, među kojima se najčešće spominju *BANK1*, *C8orf13-BLK*, *IL-23R*, *IRF5*, *TBX21* i *TNFSF4*. Vidljiva je jaka i reproducibilna povezanost gena STAT4 s lcSSc-om, što ukazuje na važnu ulogu tog gena u razvoju fenotipa SSc (6).

Brojni infektivni agensi (bakterijski i virusni) predloženi su kao mogući rizični čimbenici, ali izravna povezanost između infekcije i SSc-a još uvijek nije potvrđena. Kao potencijalni uzročnici najčešće se spominju parvovirus B19, humani citomegalovirus (CMV), virus hepatitisa B, retrovirus (virus leukemije / limfoma ljudskih stanica T tipa 1 – HTLV-1) *Helicobacter pylori* i *Chlamydia trachomatis* (6, 8). Infekcija CMV-a povezuje se s patogeneom SSc-a radi imunomodulatornih učinaka koje virus posreduje nakon infekcije endotela (9). Naime, zabilježen je određeni stupanj homologije između virusnih epitopa i razvijenih autoprotutijela što upućuje na potencijalnu ulogu molekularne mimikrije u razvoju autoimunog odgovora u oboljelih od SSc-a. Infektivni agensi u sinergiji s drugim rizičnim čimbenicima u mikrookruženju mogu potaknuti razvoj oboljenja (6).

SSc se povezuje i s profesionalnom izloženosti silikagelu, polivinil kloridu, trikloretilenu, organskim otapalima, pesticidima, bojama za kosu i industrijskom dimu. Pojedini lijekovi poput bleomicina, pentazocina i kokaina također potencijalno sudjeluju u etiologiji SSc-a. Radioterapija može potaknuti razvoj bolesti *de novo* i uzrokovati pogoršanje tkivne fibroze u bolesnika s postojećim SSc-om. Fizička trauma može izazvati bolest kod genetički predisponiranih pojedinaca (6).

1.1.3. Patogeneza

Patogeneza SSc-a je kompleksna i nepotpuno razjašnjena, a posljedični vaskularni i imunološki poremećaji dovode do prekomjerne sinteze kolagena i fibrogeneze. Ozljedu endotelnih stanica uzrokuju još uvijek neidentificirani toksični faktori u serumu ili proteolitički enzimi iz T-limfocita, autoantitijela usmjerena na endotelne stanice, vaskulotropni virusi, upalni citokini i oksidativni radikali. Vaskularna ozljeda dovodi do aktivacije i disfunkcije endotelnih stanica, što stimulira povećanu ekspresiju VCAM1 (engl. vascular cell adhesion molecule 1) i ELAM1 (engl. endothelial leukocyte adhesion molecule 1) adhezijskih molekula, te izmijenjenog izlučivanja vazoaktivnih medijatora, aktivacije

trombocita i fibrinolitičkih putova. Aktivirani trombociti oslobađaju tromboksan A₂, faktor rasta trombocita (PDGF) i transformirajući faktor rasta (TGF- β) koji uzrokuju vazokonstrikciju, doprinose aktivaciji fibroblasta i transdiferencijaciji miofibroblasta (6). Miofibroblasti su stanice koje pokazuju značajke fibroblasta i imaju veliku količinu aktinskih mikrofilamenata i miozina te njihova aktivnost omogućuje kontrakciju ili stezanje rane nakon oštećenja tkiva (10). Aktivirane endotelne stanice luče različite vazoaktivne medijatore kao što su dušikov oksid, prostaciklin i endotelin-1 (ET-1).

ET-1 je najsnažniji vazokonstriktor, potiče adheziju leukocita, proliferaciju endotelnih stanica i proliferaciju glatkih mišićnih stanica te aktivaciju fibroblasta. Hipertrofija unutarnjeg (tunica intima) i srednjeg (tunica media) sloja malih krvnih žila, uz fibrozu vanjskog sloja (tunica adventitia) rezultira sužavanjem lumena. Taj proces s endotelnom staničnom apoptozom dovodi do opstruktivne vaskulopatije i vaskularne razgradnje, uzrokujući tkivnu hipoksiju. U SSc-a neoangiogeneza je smanjena unatoč povišenim razinama VEGF-a (vaskularni endotelni faktor rasta) i njegovih receptora. Ishemija krvnih žila stimulira proizvodnju TGF- β nakon čega slijedi aktivacija fibroblasta i prekomjerna proizvodnja izvanstaničnog matriksa (ECM). Periciti se aktiviraju i transformiraju u miofibroblaste koji proizvode kolagene (6, 11). Periciti su mezenhimske stanice u kojima su prisutni miozini, aktini i tropomiozini i počinju se umnažati i stvarati nove krvne žile i vezivne stanice nakon oštećenja tkiva (10). Protutijela usmjerena protiv endotelnih stanica, u SSc-a induciraju apoptozu endotelnih stanica. Posljedični nedostatak mobilizacije ili funkcije endotelnih prekursorskih stanica onemogućuje vaskularni oporavak. Različite abnormalnosti u krvnim komponentama također doprinose tkivnoj hipoksiji: povećana agregacija trombocita, fibrinogena, von Willebrandova faktora i drugih proteina plazme pridonosi povećanju viskoznosti plazme zbog čega je smanjen mikrovaskularni protok krvi (6).

Postoji pretpostavka da je u uvjetima bolesti SSc-a promijenjena ravnoteža između limfocita Th1 i Th2 u korist limfocita Th2. Limfociti Th2 izlučuju profibrogene citokine: IL-4, IL-5 i IL-13. Th2-citokini su pro-fibrogenski jer mogu izravno stimulirati sintezu kolagena, diferencijaciju miofibroblasta i inducirati ekspresiju TGF- β . Dolazi do aktivacije T-limfocita i posljedične infiltracije u kožu i unutarnje organe. Mnoge upalne stanice prirođenog imunološkog odgovora kao što su makrofagi i monociti, mastociti, eozinofili, bazofili i NK-stanice (engl. natural killer) infiltriraju različita tkiva i potiču razvoj upale. Topljivi upalni medijatori koje proizvode T-stanice, B-stanice i prirodene upalne linije aktiviraju i oštećuju fibroblaste, endotelne stanice i druge vaskularne stanice. Poliklonska aktivacija limfocita B

dovodi do povećane koncentracije poliklonskih protutijela u serumu oboljelih ili hipergamaglobulinemije. Kronična aktivacija limfocita B uzrokuje proizvodnju autoprotutijela i fibrozu ciljnog tkiva jer aktivirane stanice B izlučuju IL-6, što izravno stimulira aktivaciju fibroblasta i sintezu kolagena (6).

SSc je karakteriziran fibrozom, koja nastaje promjenom arhitekture normalnog tkiva radi povećanog taloženja ECM-a uzrokovanog upalom ili tkivnim oštećenjem. Fibrozu u SSc-u pospješuje i povećana proizvodnja kolagena u potkožnom tkivu. Ključni stanični medijatori fibroze su miofibroblasti koji proizvode kolagen. Miofibroblasti se aktiviraju parakrinim i autokrinim signalima ili putem aktivacije Toll-like receptora (TLR) na fibroblastima (6, 12).

Fibrozu pokreću višestruki medijatori kao što su TGF- β 1, PDGF, VEGF, ET-1, IL-13, IL-21 i sustav renin-angiotenzin-aldosteron. Poremećena ravnoteža metaloproteinaza i njihovog tkivnog inhibitora u izvanstaničnom matriksu dovodi do viška sinteze i smanjene razgradnje ECM-a, što dovodi do nakupljanja kolagena (6). TGF- β 1 aktivira unutarstanični signalni put Smad, koji pak kontrolira transkripciju gena prokolagena I i III (13). Angiotenzin II, koji se proizvodi u aktiviranim makrofagima i fibroblastima, stimulira produkciju TGF- β 1, proliferaciju fibroblasta i njihovu diferencijaciju u miofibroblaste koji proizvode kolagen (6, 12).

1.1.4. Klinička slika

SSc je sustavna bolest koji pogađa mnoge organske sustave. Najočitiije promjene vidljive su na koži, ali je jednako zahvaćen gastrointestinalni trakt (GI), dišni, mokraćni i kardiovaskularni sustav. Simptomi bolesti posljedica su upale i progresivne tkivne fibroze koja nastaje radi pretjerane proizvodnje i taloženja kolagena tipa I i III (14).

Promjene na koži prvi su znak te bolesti kod većine pacijenata, a najčešće se razvijaju na prstima i rukama. U lcSSc-a promjene se najčešće primjećuju na distalnim dijelovima udova i lica, a u dcSSc-a osim lica i udova zahvaćen je i trup (3). Netjestasti edem prstiju česta je rana kožna manifestacija SSc-a, koja se s vremenom na mjestu otoka mijenja u trajno kožno zadebljanje i posljedičnu sklerodaktiliju. Bolni digitalni ulkusi koji se javljaju na vrhovima prstiju kao lokalne ishemije i vaskularne insuficijencije, česte su komplikacije bolesti. Lice, usne, jezik i prsa također mogu biti zahvaćeni i tamo se javljaju teleangiektazije (vidljivo

proširenje krvnih žila kože). Nos se pri vrhu zaoštrava te dolazi do suženja usnog otvora (mikrostomija). Kako se koža zadebljava, lice pacijenta sve više razvija ukočenost nalik na masku. Kalcifikacija je uobičajna u lcSSc-a i obično se javlja na vršcima i jagodicama prstiju. Ostale uobičajne kožne manifestacije SSc-a uključuje hiperpigmentirana područja i hipopigmentirana područja, gubitak folikula dlaka i gubitak lojnih žlijezda (anhidroza) s rezultirajućom suhoćom kože (15).

Raynaud fenomen prisutan je u više od 95 % pacijenata sa SSc-om i često je početna klinička manifestacija bolesti SSc-a. Taj fenomen obilježava poremećaj cirkulacije koji nastaje kao posljedica reverzibilnog spazma krvnih žila. Raynaudov fenomen moguće je uočiti praćenjem boje kože pri promjeni temperature. Promjena se prvenstveno pojavljuje na prstima, ali može se pojaviti i na nožnim prstima, jeziku, nosu i ušima. Raynaudovi napadaji obično su simetrični, to jest uključuju obje ruke ili noge. Promjena boje kože odvija se u tri faze: u prvoj fazi, pri niskoj temperaturi prsti ruke pobijele (bljedilo) zbog ishemije (smanjen protok krvi), koža zatim postaje cijanotična radi povratka deoksigenirane krvi te se na kraju pojavljuje crvenilo (hiperemija) koje uzrokuje vazodilatacija (širenje krvnih žila) (14, 16).

U 80 – 90 % pacijenata sa SSc-om uočene su promjene na unutarnjim organima (4). U gotovo 90 % bolesnika zahvaćen je GI trakt, pri čemu je jednjak njegov najčešće zahvaćen dio. Motilitet jednjaka je oslabljen što uzrokuje otežano gutanje i prolazak suhe hrane te pojavu žgaravice i regurgitacije želučanog sadržaja. Postoji mogućnost razvoja pseudoopstrukcije crijeva i usporen je prolazak crijevnog sadržaja (3, 17). Mogu se razviti promjene na plućima zbog dispneje pri malim fizičkim naporima. Pojavljuje se fibroza na alveolarnoj bazalnoj membrani te zadebljanje stijenke malih pulmonalnih krvnih žila. Česte kliničke promjene na srcu su aritmije, perikarditis te dekompenzacija zbog fibroze i oštećenja miofibrila. Bolest bubrega očituje se proteinurijom, porastom koncentracije kreatinina te razvojem arterijske hipertenzije. Kronična bubrežna insuficijencija može se pojaviti u uznapredovalom stadiju bolesti zajedno s azotemijom, metaboličkom acidozom i anemijom. Zatajenje bubrega rijetko se javlja u bolesnika sa SSc-om (3, 4). Oboljeli od SSc-a mogu imati mišićne slabosti zbog mišićnih promjena. Uz to mogu imati povišene vrijednosti mišićnih enzima (npr. kreatin kinaze) i abnormalnu elektromiografiju (3, 18). Oko 95 % pacijenata sa SSc-om imaju pozitivan nalaz antinuklearnih protutijela (ANA). Protutijela na topoizomerazu I (anti-Scl-70) povezana su s dcSSc-om i razvojem intersticijske plućne bolesti (ILD). Anticentromerna protutijela (ACA) prisutna su u približno 20 – 30 % bolesnika i povezane su s lcSSc-om (3, 4).

1.1.5. Liječenje i prognoza

Još uvijek ne postoji terapijsko učinkovito sredstvo koje bi bitno utjecalo na tijek bolesti i produljenje života. Najveći problem je nepoznat uzrok bolesti pa je liječenje uglavnom simptomatsko (3, 4).

Dihidropiridinski kalcijev blokator prvi je izbor u liječenju Raynaudovog fenomena u SSc-a, a za teže oblike Raynaudovog sindroma preporuča se koristiti intravensku primjenu analoga prostaciklina (iloprost). Metotreksat se može uzeti u obzir za liječenje ranih kožnih manifestacija u dcSSc-a. Za liječenje intersticijalnih plućnih bolesti povezanih sa SSc-om treba uzeti u obzir ciklofosamid. Inhibitori angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE inhibitori) koriste se u liječenju sklerodermne bubrežne krize. Za prevenciju gastroezofagealnog refluksa, čireva i suženja jednjaka koriste se inhibitori protonske pumpe (PPI) (19). Vrlo je važno da bolesnici sa SSc-om održavaju pokretljivost zglobova, a to čine vježbanjem, zaštitom od hladnoće, lokalnom primjenom krema i masti za održavanje elastičnosti kože. Glukokortikoidi imaju dobar učinak na perikarditis i miozitis kada još postoji upalna infiltracija (u ranoj fazi bolesti) (3).

SSc je kronična bolest i ima progresivan tijek. Prognoza bolesti ovisi o jačini zahvaćenosti unutarnjih organa (3). Pacijenti sa SSc-om i dalje imaju značajno viši morbiditet i mortalitet. Kumulativno preživljavanje od SSc-a je procijenjeno na 74,9 % na pet godina i 62,5 % na deset godina. SSc, osobito difuzni oblik bolesti, najagresivniji je tijekom prvih godina svog prirodnog tijeka i zahtijeva pažljivi nadzor kako bi se spriječilo napredovanje bolesti i osiguralo rano otkrivanje komplikacija na unutarnjim organima. Kardiopulmonalne komplikacije najčešći su i najveći terapijski problem bolesti (20, 21). Muškarci imaju nešto bolju prognozu u odnosu na žene (3).

1.2. Mikrokimerizam

Mikrokimerizam je pojam koji opisuje prisutnost male količine stranih stanica ili DNA unutar tkiva ili cirkulacije pojedinca. Pojavljuje se tijekom trudnoće kao posljedica razmjene biološkog materijala između majke i fetusa posteljničnim putem. Prva dokumentacija o prijenosu fetalnog materijala u majčinski sustav pripisuje se Georgu Schmorlu koji je opisao pojavu mikrokimerizma u eklampsiji (napadaji u trudnoći) (22, 23). Mikrokimerizam koji se prirodno razvija tijekom majčinsko-fetalne razmjene može utjecati na sve faze života, uključujući fetalni razvoj, post-reproduktivno razdoblje i starenje (24). Mikrokimerne stanice imaju potencijalno mnogo šire značenje u razvoju autoimunih oboljenja, pri čemu gubitak imunološke tolerancije na genetički različite (alogenične) antigene može uzrokovati razvoj organ-specifičnih autoimunih oboljenja. Razlikujemo dvije osnovne vrste mikrokimerizma, majčinski mikrokimerizam (MMc) i fetalni mikrokimerizam (FMc), koji se razvijaju kao posljedica dvosmjernog prijenosa stanica u trudnoći (25). Studije mikrokimerizma kod ljudi ograničene su na:

- genetske epidemiološke studije učestalosti ne-nasljeđenih alela majki (NIMA) u pogođenih bolesnika u usporedbi s kontrolnim pojedincima
- kvantitativna analiza PCR-a razine NIMA u oboljelih u odnosu na zdrave ispitanike
- detekcija kromosoma Y PCR-om u majke
- izravna detekcija i kvantifikacija ženskih stanica u dijelovima autopsije tkiva muškog potomstva (i muških stanica u tkivu majke) fluorescentnom in situ hibridizacijom (FISH) uz popratnu analizu staničnog fenotipa imunohistokemijom (25).

1.2.1. Majčinski mikrokimerizam (MMc)

MMc je vrsta mikrokimerizma u kojem majčinske stanice prelaze u fetalnu cirkulaciju, gdje ih je moguće detektirati već od drugog tromjesečja. Prisutnost stanica majčinskog porijekla u perifernoj krvi i tkivu potomstva, uključujući jetru, gušteraču, pluća, bubrege, mokraćni mjehur, kožu, slezenu, srce, timus i štitnjaču, uočena je već tijekom djetinjstva. MMc opstaje i u većini odraslih osoba. Jedno istraživanje odraslih muškaraca i žena (srednje dobi 25 godina, maksimalno 49 godina) pokazalo je da 55 % ispitanika posjeduje detektabilne razine mikrokimernih stanica u populaciji mononuklearnih stanica periferne krvi. Stupanj detekcije varira ovisno o podskupini stanica i 14 – 40 % ispitanika imaju dokazan MMc u limfocitima

T, limfocitima B, monocitima, NK-stanicama ili granulocitima. Zanimljivo, cirkulirajuće majčinske stanice prvi su puta zabilježene u potomaka oboljelih od teškog kombiniranog sindroma imunodeficijencije (SCID) (22, 24).

Funkcionalni kapacitet kimernih stanica majke nije dobro definiran. In vitro, kimerne stanice majke slabo reagiraju na specifične mitogene kao što su strani antigeni ili alogeni stimulatori. Kimerni majčinski limfociti T reagiraju međutim na nespecifične mitogene, kao što su IL-2, anti-CD3 protutijela ili fitohemaglutinin (PHA). Stanice majčinskog porijekla izolirane iz krvi pacijenata s imunodeficijencijom pokazuju proliferativni potencijal u kulturi *in vitro*. Te majčinske stanične linije mogu se normalno razmnožavati i na svojoj površini izražavaju majčinske molekule HLA (engl. human leukocyte antigen). Dugoročna prisutnost MMC-a povezuje se i s razvojem GVHD-a, iako 40 % pacijenata s detektiranim MMC-om nikada ne razvije GVHD iz čega se može zaključiti da regulatorni mehanizmi kontroliraju imunosti odgovor na majčinske stanice. Gubitak tolerancije na majčinske stanice tijekom rođenja i nakon rođenja može dovesti do kroničnih upalnih bolesti i autoimunosti. Sukladno navedenom, dugoročni MMC otkriven je u SSc-u, neonatalnom lupusnom sindromu (NLS) i miozitisu (26, 27).

1.2.2. Fetalni mikrokimerizam (FMc)

FMc je vrsta mikrokimerizma u kojem fetalne stanice dopijevaju u tijelo majke posteljicom. Pokazalo se da mikrokimerne fetalne stanice uspijevaju preživjeti niz godina u perifernoj krvi majke (24). Fetalnu DNA moguće je detektirati u majčinoj krvi već od 7 tjedna trudnoće, pri čemu koncentracija fetalne DNA postepeno raste nakon 24 tjedna i dostiže vrhunac pri rođenju (25). Otkrivanje fetalne DNA u krvi majke ima veliku važnost u prenatalnoj dijagnostici u svrhu ranih neinvazivnih prenatalnih ispitivanja genetičkih obilježja fetusa. Primarni markeri korišteni za procjenu fetalnog materijala u krvi i tkivu majke temelje se na detekciji kromosoma Y. Najčešće korištene metode u prošlosti su polimerazna lančana reakcija (PCR) i in situ hibridizacija, dok se noviji dijagnostički pristupi više oslanjaju na kvantitativne analize u stvarnom vremenu poput real-time qPCR-analize (22, 28). Analiza kratkih oligonukleotidnih ponavljanja ili biljega STR (engl. short tandem repeat) također je jedan od dijagnostičkih pristupa za analizu kromosoma Y u krvi majke. Analiza biljega STR na kromosomu Y omogućava razlikovanje majčinog i fetalnog genetičkog materijala u uzorku periferne krvi majke. Biljezi STR sastoje se 2 - 4 nukleotida koji se na jednom kromosomskom lokusu mogu uzastopno ponavljati 2 - 30 puta. Pojedine alelne varijante

lokusa STR određene su promjenom broja oligonukleotidnih jedinica (npr. 5 puta ponovljen niz TCTA = alel 5), a skup STR alela čini genetički profil, jedinstven za svaku osobu. Alelne varijante biljega STR mogu se jednostavno umnožavati, a radi visokog polimorfizma unutar ispitivane populacije biljezi STR omogućavaju pouzdano razlučivanje među različitim genetičkim profilima. Biljezi STR rasprostranjeni su po cijelom genomu i potrebne su male količine DNA (0,1 - 1 ng) za analizu (29).

Primjenom prenatalnih dijagnostičkih testova utvrđena je prisutnost fetalnih mikrokimernih stanica u 70 – 80 % majčinih uzoraka plazme ili seruma, bilo u staničnom obliku ili u formi slobodne DNA. Kvantitativne studije pokazuju da muški DNA čini 3 – 6 % ukupne DNA u plazmi majke. FMc je identificiran u limfocitima B, limfocitima T, monocitima / makrofagima i stanicama NK u zdravih žena i žena s autoimunim bolestima. FMc je ispitivan unutar više različitih tipova tkiva dobivenih biopsijom ili autopsijom i pronađen je u jetri, štitnjači, cerviksu (vrat maternice), žučnoj vrećici, crijevima, slezeni, limfnim čvorovima, srcu i bubrezima (22).

Povećan prijenos fetalnog materijala u majčinsku cirkulaciju opisan je i u drugim poremećajima trudnoće, kao što su ograničen rast fetusa i prijevremeni porod. Prisutnost FMc-a može imati pozitivne ili negativne učinke na majku. Negativna posljedica FMc-a je razvoj autoimunih bolesti kao što su sistemska skleroza, autoimuni tireoiditis, sistemski eritemski lupus (SLE), primarna bilijarna ciroza (PBC) i Sjögrenov sindrom. Sukladno navedenom, nekoliko studija opisuje veću učestalost FMc-a u tkivu štitnjače oboljelih od Hashimotovog tireoiditisa i Gravesove bolesti u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Razine FMc-a u žena sa SLE-om također su značajno veće nego u zdravih žena. Dokazana je i prisutnost fetalnih stanica u žlijezdama slinovnicama i plućima žena sa Sjörgenovim sindromom. Osim u autoimunim bolestima, FMc je prisutan kod pojave dermatosa u trudnoći, hipersenzitivnog pneumonitisa i papilarnog karcinoma štitnjače. Pozitivni učinci FMc-a mogu biti utišavanje autoimunih bolesti (na primjer reumatoidni artritis), zaštitna uloga fetalnih imunskih stanica u karcinomu dojke i obnavljanje tkiva (jetra). Otkriveno je da 75 – 90 % majki koje pate od reumatoidnog artritisa prijavljuju spontano poboljšanje reumatoidnih tegoba tijekom drugog ili trećeg trimestra trudnoće, ali se simptomi bolesti obnavljaju 3 - 4 mjeseca nakon poroda. Uzrok tomu ostaje nepoznat, ali se smatra da neskladnost HLA-DR i DQ antigena između majke i djeteta suzbija majčinski imunološki sustav tijekom trudnoće (22, 25).

1.2.3. Utjecaj fetalnog mikrokimerizma u sistemske sklerozi

Potencijalnu ulogu mikrokimernih stanica fetusa u etiopatogenezi SSc-a prvi puta spominje S. Pereira u osobnoj komunikaciji s dr. Carol Black. Tek nakon prvih dokaza koji potvrđuju postojanost muških fetalnih stanica u cirkulaciji zdrave žene 27 godina nakon porođaja, moguća patogena uloga fetalnih stanica u SSc-a razvila se u snažnu i fascinantnu hipotezu. Činjenica da se SSc učestalo pojavljuje u žena nakon rođenja djeteta te klinička sličnost bolesti s GVHD-om čija se pojava povećava sa smanjenom kompatibilnošću primatelja i donora, sugerira potencijalnu ulogu mikrokimerizma u razvoju SSc-a (2).

Više je studija dokazalo postojanje mikrokimerizma u oboljelih od SSc-a (30, 31). Uočene su povećane razine muške DNA fetalnog podrijetla u populaciji perifernih mononuklearnih stanica (PBMC, engl. peripheral blood mononuclear cells) žena oboljelih od SSc-a (1). Obdukcijom žena oboljelih od SSc-a, FMc je pronađen u više organa, najčešće u slezeni oboljelih, ali ne i u kontrolnih ispitanica (32). Posljedice miješanja fetalnih mikrokimernih stanica i imunskih stanica majke u SSc-a nepoznate su, a vrlo vjerojatno uključuju razvoj imunološkog odgovora pri čemu fetalne mikrokimerne stanice limfoidnog fenotipa prepoznaju majčine aloantigene glavnog sustava tkivne snošljivosti (MHC, engl. major histocompatibility complex) te induciraju razvoj upalnog imunološkog odgovora. Imunološki odgovor može inicirati i majčin imunološki sustav, kao reakcija na fetalne aloantigene MHC (2).

2. HIPOTEZA

1. U odnosu na zdrave kontrole, ispitanice oboljele od sistemske skleroze pokazuju različiti udio Y-DNA u populaciji perifernih leukocita
2. Promjene u koncentraciji Y-DNA povezane su s obilježjima i težinom sistemske skleroze.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Istražiti kvantitativne udjele Y-specifičnih genskih regija u uzorcima DNA izoliranih iz perifernih leukocita oboljelih od sistemske skleroze i zdravih ispitanika
2. Usporediti izmjerene koncentracije Y-DNA s biokemijskim i demografskim obilježjima ispitanika.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Ispitanici

Istraživanjem je obuhvaćeno 18 oboljelih i 10 zdravih, punoljetnih ispitanica koje su rodile barem jedno muško dijete te dvije pozitivne kontrole, to jest dva muškarca. Odabir pacijenata učinio je iskusan internist Zavoda za reumatologiju, kliničku imunologiju i alergologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC-a Osijek u okviru istraživanja „Citokinski odgovor u bolesnika sa sistemskom sklerozom“. Isključeni su ispitanici koji su imali transfuzijske ili transplantacijske intervencije, blizanačke trudnoće i spontane ili inducirane pobačaje. Probir oboljelih i kontrolnih ispitanika odobren je odlukom Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek (Potvrda br. R2-16 905/2018) i Medicinskog fakulteta u Osijeku (Potvrda br. 602-04/19-08/04).

4.1.2. Upotrijebljene kemikalije

- Lymphoprep™
- Qubit™ 4 Quantitation Starter Kit
 - Qubit® dsDNA HS Reagent (Component A)
 - Qubit® dsDNA HS Buffer (Component B)
 - Qubit® dsDNA HS Standard #1 (Component C)
 - Qubit® dsDNA HS Standard #2 (Component D)
- Autoklaviran i deioniziran H₂O
- EtOH (96 – 100 %)
- QIAamp Mini Kit
 - QIAGEN Proteinaza
 - AL pufer
 - AW1 pufer
 - AW2 pufer
 - AE pufer
- Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit
 - Quantifiler PCR Reaction Mix
 - Quantifiler Human DNA Standard
 - Quantifiler Human Primer Mix
- Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit
 - Yfiler Plus Master Mix
 - DNA Control 007

- Yfiler Plus Primer Set
- Yfiler Plus Allelic Ladder

4.2. Metode

4.2.1. Izolacija ukupnih perifernih leukocita (PBMC)

Za izolaciju ukupnih perifernih leukocita (PBMC) iz pune krvi korišten je medij Lymphoprep™. Lymphoprep™ je sterilna otopina koja se preporučuje za izolaciju mononuklearnih stanica iz periferne krvi, pupčane vrpce i koštane srži metodom centrifugiranja na gradijentu gustoće. Ta je metoda brza, jednostavna, pouzdana i daje izvrsne rezultate s uzorcima krvi kod većine zdravih ispitanika. Granulociti i eritrociti imaju veću gustoću od mononuklearnih stanica i zato se tijekom centrifugiranja talože kroz Lymphoprep™, a mononuklearne stanice niske gustoće zaostaju na granici plazme i medija Lymphoprep (33).

Postupak: u epruvetu od 15 mL dodano je 5 mL medija Lymphoprep koji je zatim nadslojen mješavinom pune, heparinizirane krvi i fiziološke otopine u omjeru 1 : 1, pazeći pri tom da se dvije otopine ne miješaju. Pripremljeni uzorci su centrifugirani 25 minuta na 800 g i 25° C, bez kočenja. Gornji je sloj plazme uklonjen i odbačen bez ometanja sloja stanica PBMC. Sloj stanica PBMC istaložen je na gornjoj granici medija Lymphoprep, zatim je pažljivo prikupljen i prebačen u novu epruvetu od 15 mL. Prikupljeni uzorci isprani su dodatkom pufera PBS i potom centrifugirani na sobnoj temperaturi 5 minuta na 800 g. Nakon centrifugiranja, supernatant je bačen, a talog resuspendiran s 8 mL pufera PBS. Uzorci su nanovo istaloženi centrifugiranjem 5 minuta na 550 g. Supernatant je odbačen i stanice su resuspendirane u 5 mL PBS-a, nakon čega su izuzeti 50 µl alikvoti za brojanje stanica svjetlosnim mikroskopom i Burkert-Turkovom komoricom. Za izolaciju DNA alikvotirano je 1×10^6 stanica u 200 µl pufera PBS.

4.2.2. Izolacija DNA

Izolacija DNA provedena je pomoću Qiagen QIAamp Mini komercijalnog kita prema sljedećim uputama:

Thermoshaker je zagrijan na 56° C. U 200 µl stanične suspenzije (1×10^6 st) dodano je 20 µL QIAGEN Proteinaze i 200 µL pufera AL. Uzorci su kratko (15 s) promješani na vorteks-mješalici i zatim inkubirani 10 minuta na 56° C. Dodano je 200 µL etanola (96 %) i kompletni volumen smjese nanesen je na QIAamp Mini kolonicu u kompletu s kolekcijskom tubicom te su uzorci centrifugirani jednu minutu na 6 000 g. QIAamp Mini kolonice prebačene su u nove kolekcijske tubice i dodano je 500 µL pufera AW1, nakon čega su uzorci centrifugirani jednu minutu na 6 000 g. Postupak ispiranja ponovljen je s 500 µL pufera AW2 centrifugiranjem tri minute na 20 000 g. Protok je odbačen i uzorci su još jednom centrifugirani jednu minutu na 20 000 g. Kolonice QIAamp Mini udružene su s novim tubicama od 1,5 mL i dodano je 200 µL pufera AE. Uzorci su inkubirani jednu minutu na sobnoj temperaturi i zatim centrifugirani jednu minutu na 6 000 g. Dobiveni izolati DNA pohranjeni su na -20° C u zamrzivaču.

4.2.3. Mjerenje koncentracije DNA Qubit® Fluorometrom

Qubit® Fluorometer uređaj je koji je namijenjen za mjerenje koncentracije DNA na temelju vezanja fluorescentnih boja za DNA. Ta metoda nije prikladna za kvalitativnu analizu DNA zbog neosjetljivosti na prisutnost inhibitora PCR-a ili fragmentiranih DNA molekula (34). Mjerenje koncentracije DNA učinjeno je prema sljedećem protokolu:

Pripremljena je radna otopina Qubit MMX razrjeđenja 1 : 200, volumena 6,4 mL za mjerenje 30 uzoraka i 2 standarda. Smjesa radne otopine Qubit MMX pripremljena je miješanjem 6 368 µL Qubit dsDNA pufera HS i 32 µL fluorescentne boje Qubit dsDNA HS. Pripremljene su i radne otopine dvaju standarda poznate koncentracije; Std#1 ($c = 0$ ng/µl) i Std#2 ($c = 100$ ng/µl). Radne otopine Std#1 i Std#2 pripremljene su miješanjem 190 µL radne otopine Qubit MMX i 10 µL otopine stock Std#1, odnosno 10 µl Std#2. Uzorci su pripremljeni pipetiranjem 5 µL DNA u 195 µL radne otopine Qubit MMX, vorteksirani i inkubirani dvije minute na sobnoj temperaturi. Prvo su izmjerene vrijednosti fluorescencije Std#1 i Std#2, a zatim su na temelju dobivene standardne krivulje određene vrijednosti koncentracije DNA u ispitivanim uzorcima.

4.2.4. Mjerenje koncentracije DNA komercijalnim kompletom Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification

Lančana reakcija polimeraze (PCR) služi za proizvodnju velikog broja kopija jedne molekule DNA. Reakcija PCR odvija se u tri faze: u prvoj fazi (denaturacija) dolazi do zagrijavanja kalupa na visokoj temperaturi (95° C) kako bi se razdvojila dva lanca DNA. U drugoj fazi (hibridizacija) sniženjem temperature dolazi do komplementarnog vezanja početnica i kalupa DNA. U trećoj fazi (elongacija) Taq polimeraza (enzim izoliran iz bakterije *Thermus aquaticus*) sintetizira nove lance DNA. Nakon svakog ciklusa broj se molekula DNA udvostručuje (35).

Quantitative PCR (qPCR) je vrsta PCR-a koja služi za preciznu kvantifikaciju nastalih produkata PCR-a u realnom vremenu. Kako bi se moglo pratiti povećanje broja umnoženih odsječaka DNA, pomaže korištenje TaqMan-proba. TaqMan-proba je fluorescentno obilježena oligonukleotidna proba koja se veže na ciljne odsječke DNA između veznih mjesta za dvije početnice. Na 5'-kraju probe TaqMan vezana je tzv. „reporter“ boja, a na 3'-kraj probe vezana je akceptorska boja (Q, engl. quencher). Tijekom reakcije PCR, u fazi elongacije, Taq-polimeraza izražava svoju 5' egzonukleaznu aktivnost i tijekom polimerizacije novog lanca izrezuje vezanu probu TaqMan pri čemu dolazi do razdvajanja fluorokroma na 3' i 5' krajevima te emisije fluorescencije „reporter“ boje. Uređaj qPCR bilježi vrijednosti fluorescencije i određuje vrijednost fluorescencijskog praga (threshold) tj., najmanju vrijednost fluorescencije koja nadmašuje nespecifični pozadinski fluorescentni signal. Ciklus PCR-a u kojem vrijednost fluorescencije nekog uzorka nadmašuje prag fluorescencije naziva se „threshold cycle“ (Ct). Što je početna količina DNA u uzorku veća, to će vrijednost Ct-a biti manja. Linearan odnos izmjerenih vrijednosti Ct-a i logaritamskih vrijednosti koncentracije DNA u uzorcima poznate koncentracije DNA tzv. standardima, služi za izradu standardne krivulje. Porast fluorescencije ovisi o početnoj količini DNA u uzorku, pa se analizom fluorescentnog signala u najmanje pet serijskih razrijeđenja uzoraka poznate koncentracije može odrediti učinkovitost reakcije PCR. Iz omjera vrijednosti Ct-a izmjerenih u prvoj i krajnjoj točki standardne krivulje i poznatih vrijednosti koncentracije DNA određuje se nagib pravca standardne krivulje prema jednadžbi:

$$y - y_1 = \frac{(y_2 - y_1)}{((x_2 - x_1))(x - x_1)},$$

iz vrijednosti nagiba standardne krivulje, može se izračunati učinkovitost PCR-a primjenom izraza:

$$E = 10^{\left(\frac{1}{\text{nagib}}\right)} - 1$$

Pravilan porast fluorescencije u odnosu na koncentraciju očekuje se u 100 % učinkovitoj reakciji (36, 37).

Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification Kit služi za kvantifikaciju ukupne količine muškog DNA u uzorku. Sadržava sve potrebne reagense za detekciju i kvantifikaciju ciljnih odsječaka DNA kromosoma Y. Quantifiler® Y Kit sadrži dva para početnica i dvije probe TaqMan za kvantifikaciju ciljnih odsječaka gena SRY (engl. sex-determining region Y) na položaju Yp11.3 te za amplifikaciju kontrole IPC-a (engl. Internal PCR kontrol). Kontrola IPC je sintetički oligonukleotid koji se koristi za detekciju prisutnosti inhibitora PCR-a u ispitivanim uzorcima DNA. Stoga se pri pripremi smjese qPCR, osim specifičnih početnica SRY, i bojom FAM obilježene probe TaqMan, dodaju početnice i bojom VIC označena sonda TaqMan koja osigurava detekciju amplifikacije kontrole IPC. Zbog toga je u stvarnom vremenu moguće istovremeno pratiti amplifikaciju SRY i odsječaka IPC. U slučaju izostanka amplifikacije gena SRY, signal IPC služi za procjenu prisutnosti potencijalnih inhibitora PCR-a i omogućuje precizno razlučivanje negativnih rezultata i lažno negativnih rezultata reakcije qPCR (38).

Postupak: Standardi su pripremljeni prema navedenoj Tablici 1. Ukratko, za pripremu prve točke serije razrijeđenja, u 30 µL pufera TE dodano je 10 µL otopine stock poznate koncentracije Y-DNA (200 ng/µL) kako bi se dobila radna otopina standarda 1 (Std1; 50 ng/µL). Serijskim razrijeđenjima Std1, pripremljeno je još 7 standarda, pri čemu je svaki u odnosu na prethodni razrijeđen 3 x. U konačnici je pripremljeno osam točaka serije razrijeđenja, koncentracijskog raspona od 50 ng/µL (Std1) do 0,023 ng/µL.

Tablica 1. Priprema standarda

standard	koncentracija (ng/µL)	primjer	minimalna količina	faktor razrijeđenja
Std1	50	50 µL (200 ng/µL stock) + 150 µL TE	10 µL (stock) + 30 µL TE	4 x

Std2	16,7	50 µL (Std1) + 100 µL TE	10 µL (Std1) + 20 µL TE	3 x
Std3	5,56	50 µL (Std2) + 100 µL TE	10 µL (Std2) + 20 µL TE	3 x
Std4	1,85	50 µL (Std3) + 100 µL TE	10 µL (Std3) + 20 µL TE	3 x
Std5	0,62	50 µL (Std4) + 100 µL TE	10 µL (Std4) + 20 µL TE	3 x
Std6	0,21	50 µL (Std5) + 100 µL TE	10 µL (Std5) + 20 µL TE	3 x
Std7	0,068	50 µL (Std6) + 100 µL TE	10 µL (Std6) + 20 µL TE	3 x
Std8	0,023	50 µL (Std7) + 100 µL TE	10 µL (Std7) + 20 µL TE	3 x

U sljedećem je koraku pripremljen qPCR MasterMix za analizu 30 uzoraka i 8 standarda u duplikatu, miješanjem 798 µL Quantifiler Human Primer Mixa i 950 µL Quantifiler PCR Reaction Mix reagensa. Pripremljeni je MasterMix promiješan na vorteks-mješalici i u svaku jažicu pipetirano je 23 µL pripremljene otopine MasterMix i zatim dodano 2 µL standarda ili 2 µL izolata DNA.

Amplifikacija Y-DNA odsječaka i kontrole IPC provedena je tijekom ponavljajućih ciklusa zagrijavanja i hlađenja smjese PCR u uređaju Quant Studio 5 PCR sukladnim temperaturnim uvjetima opisanim u Tablici 2.

Tablica 2. Temperaturni uvjeti u uređaju Quant Studio 5

korak	enzyme activation	amplification		final hold
	HOLD	broj ciklusa (40)		HOLD
temperatura	95° C	95° C	60° C	4° C
vrijeme	10 min	15 s	1 min	∞

4.2.5. Analiza biljega Y-STR

Yfiler® Kit sadrži sve potrebne reagense za amplifikaciju Y-DNA. Tijekom višestruke (engl. multiplex) reakcije PCR dolazi do vezanja početnica s različitim fluorescentnim oznakama za komplementarne sekvence 17 ciljnih lokusa STR-a na kromosomu Y. Umnoženi odsječki

lokusa Y-STR razdvajaju se tijekom automatizirane kapilarne elektroforeze na temelju veličine i vezanog fluorescentnog biljega.

Elektroforeza je usmjereno gibanje električno nabijenih molekula kroz potporni medij djelovanjem električnog polja, a omogućava razdjeljivanje molekula DNA, RNA ili proteina. Manje molekule putuju brže od većih i putovanje molekula kroz medij ovisi o veličini i naboju molekule, gustoći gela, jakosti strujnog polja i temperaturi (39). Kapilarna elektroforeza je vrsta elektroforeze koja se izvodi u uskim cjevčicama (kapilarama) i najučinkovitija je tehnika za razdvajanje odsječaka DNA koji se veličinom razlikuju za par nukleotidnih baza. Metoda daje brze rezultate primjenom male količine uzoraka i reagensa. Uređaj za kapilarnu elektroforezu sastoji se od visokonaponskog izvora (0 do 30 kV) za postizanje vrlo učinkovitog razdvajanja, silica (SiO_2) kapilare, dva spremnika pufera, dvije elektrode i detektora. Unošenje uzorka u uređaj za kapilarnu elektroforezu postiže se privremenom zamjenom jednog spremnika pufera s uzorkom (40).

ABI Prism 310 Genetic Analyzer je uređaj koji se koristi za analizu biljega STR u laboratorijima DNA. Taj uređaj ima jednu kapilaru i analizira jedan po jedan uzorak. Prije početka elektroforeze, smjesi umnoženih odsječaka STR-a svakog ispitivanog uzoraka dodaju se fragmenti DNA poznate duljine i specifičnog fluorescentnog obojenja tzv. standardi. Tijekom elektroforeze, različito obilježeni standardi i odsječci STR-a putuju brzinom koja ovisi o njihovoj duljini te s vremenom prolaze pored detektora koji bilježi fluorescentni biljeg svakog odsječaka DNA u ispitivanom uzorku. Duljina ciljnih odsječaka STR-a zatim se određuje na temelju standardne krivulje koja prikazuje linearan odnos poznate duljine standarda i vremena koje im je potrebno za prolazak kroz kapilaru. Kraći će odsječci DNA putovati brže od dužih, a vrijeme pojavljivanja signala nepoznatog fragmenta određuje se u odnosu na vrijeme koje su ostvarili odsječci poznate duljine. Za preciznu procjenu duljine velikog broja umnoženih odsječaka STR-a u svakom ispitivanom uzorku koriste se odgovarajući programski alati poput računalnog programa GeneMapper ID v3.2.1. (41).

Postupak: PCR-smjesa za amplifikaciju ciljnih odsječaka Y STR 30 uzoraka pripremljena je mješanjem 96 μL reagensa Y filer PCR Reaction Mix, 52,2 μL smjese Y filer Primer Set i 8,4 μL AmpliTaq Gold DNA polimeraze. U svaku tubicu PCR-a pipetirano je 4,8 μL MasterMixa i zatim dodano 3,2 μL izolata DNA. Analiza je provedena na uređaju Applied Biosystems ProFlex PCR System prema zadanom temperaturnom protokolu (Tablica 3).

Tablica 3. Temperaturni uvjeti u uređaju Applied Biosystems ProFlex PCR System

korak	enzyme activation	PCR			final extension	final hold
		CYCLE (29 cycles)				
	HOLD	denature	anneal	elongate	HOLD	HOLD
temperatura	95° C	94° C	61° C	72° C	60° C	4° C
vrijeme	11 min	1 min	1 min	1 min	80 min	∞

Za analizu duljine odsječka STR-a kapilarnom elektroforezom pripravljena je reakcijska smjesa dodatkom 25 µL formamida GeneScan 500 LIZ Standarda u 1225 µL Hi-Di. Uzorci za kapilarnu elektroforezu pripremljeni su miješanjem 1,5 µL ispitivanog amplikona PCR-a s 25 µL reakcijske smjese, nakon čega je uslijedila inkubacija na 95° C tijekom pet minuta. Prije same elektroforeze, uzorci su tri minute inkubirani na -20° C.

4.3. Statističke metode

Korištene su samo osnovne metode deskriptivne statistike. Numerički podatci prikazani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom odnosno medijanom i interkvartilnim rasponom.

5. REZULTATI

5.1. Klinička i biokemijska obilježja ispitanika

Tablica 4. prikazuje klinička i biokemijska obilježja ispitanika. Vidljivo je kako nema značajne razlike u dobi između kontrolnih ispitanika i oboljelih od SSc-a. Ograničeni oblik SSc-a posjeduje 90 % ispitanika, a difuzni oblik SSc-a 10 % oboljelih. Antinuklearna protutijela (ANA) zabilježena su u svih oboljelih ispitanika, a u većine je (60 %) dokazana i prisutnost anticentromernih protutijela (ACA). Zanimljivo, protutijela protiv topoizomerase I detektirana su u osam oboljelih ispitanika, od kojih šest pokazuju simptome težeg oblika bolesti SSc-a, uključujući simptome intersticijske bolesti pluća (N = 4) i difuzno zahvaćene dijelove kože (N = 2).

Tablica 4. Deskriptivna analiza ispitanika

	F/M	Dob*	limitirana/difuzna	titar ANA	scl-70/ACA	ILD	follow-up time [#]
SSc (N=20)	18/2	59,4±8,44	18/2	1:320 - 1:3200	8/12	4/20	6,5 (4,25-20,5)
CTRL (N=10)	10/0	56,4±2,54	-	neg	neg	-	-

* srednja vrijednost ± SD;

medijan (interkvartilni raspon);

F/M – omjer žena i muškaraca; ANA – antinuklearna protutijela; Anti-Scl-70 - protutijela na topoizomerasu I; ACA – anticentromerna protutijela; ILD – intersticijska pluća bolest; CTRL – kontrola; SSc – sistemska skleroza; CTRL – kontrolni ispitanici; N – broj ispitanika

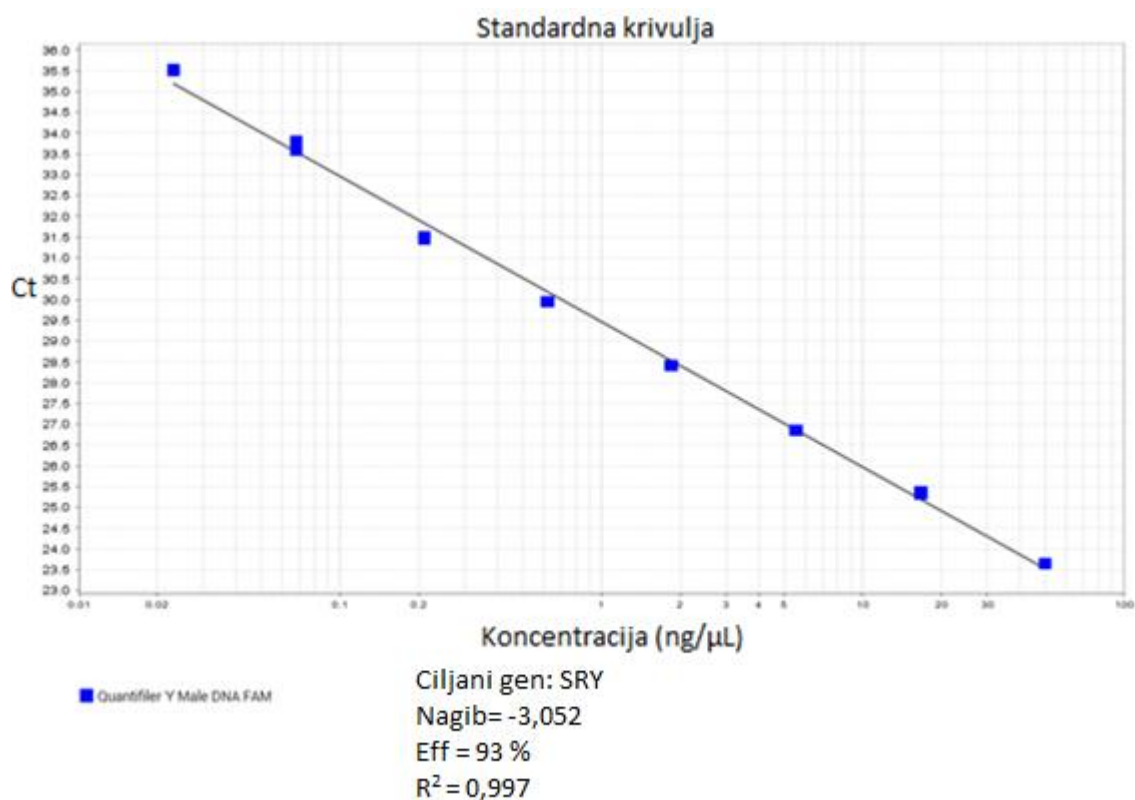
5.2. Analiza prisutnosti i koncentracije Y-DNA u zdravih ispitanika i oboljelih od SSc-a

5.2.1. Pokazatelji učinkovitosti i preciznosti amplifikacije odsječaka Y-DNA

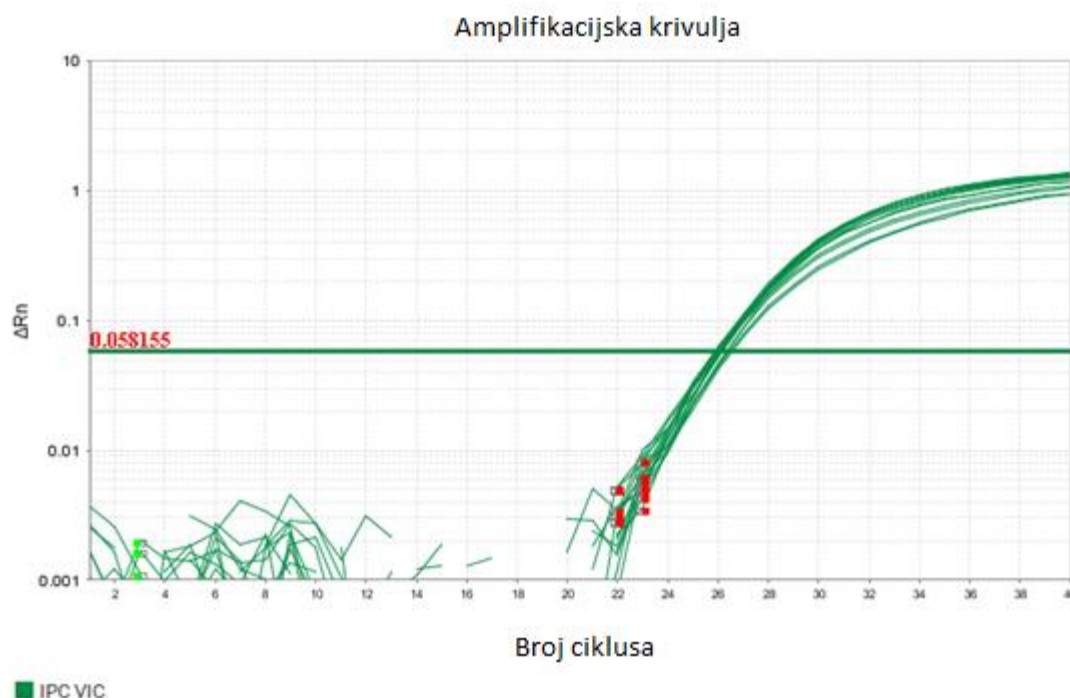
Procjena učinkovitosti amplifikacije ciljnih odsječaka Y-STR tijekom reakcije qPCR-a učinjena je mjerenjem vrijednosti Ct-a standardnih serijskih razrijeđenja (Std1 – Std8) koja su se zajedno s ispitivanim uzorcima testirala u duplikatu. U svrhu procjene preciznosti reakcije qPCR-a, analiziran je linearni koleracijski koeficijent (R^2), koji opisuje podudarnost

očekivane i opažene promjene jakosti fluorescentnog signala u odnosu na veličinu razrijeđenja DNA u uzorcima Std-a. Što je vrijednost R^2 bliže 1, to je jače slaganje među vrijednostima izračunatih modelom i izmjerenih vrijednosti, a preciznost je predviđanja koncentracije Y-DNA u ispitivanim uzorcima veća.

Sukladno navedenom, zabilježene su visoke vrijednosti učinkovitosti ($\text{Eff} = 93 \%$) i preciznost ($R^2 = 0,997$) reakcije qPCR-a (Slika 1), što podupire pouzdanost očitanih vrijednosti Ct-a u ispitivanim uzorcima. Štoviše, analizom amplifikacije kontrole IPC-a zabilježene su podjednake vrijednosti Ct-a u svim ispitivanim uzorcima (srednja vrijednost $\pm$ SD; $26,14 \pm 0,13$; Slika 2), što ukazuje na odsustvo potencijalnih inhibitora PCR-a i u potpunosti umanjuje rizik lažno negativnih rezultata.



Slika 1. Standardna krivulja Y-DNA. Prikaz učinkovitosti (Eff %) i preciznosti (R^2) analize qPCR-a utvrđen na temelju analize 8 točaka serijskog razrijeđenja uzorka koncentracije 50 ng/μl u omjeru 1 : 3



Slika 2. Amplifikacijska krivulja kontrole IPC-a u svim ispitivanim uzorcima. Horizontalna linija prikazuje vrijednost praga fluorescencije

5.2.2. Koncentracija DNA izmjerena primjenom Qubit fluorometra

Za procjenu količine DNA izolirane iz 1×10^6 stanica PBMC-a po uzorku, korišten je komercijalni komplet Qubit dsDNA BR i fluorometar Qubit. Koncentracija DNA u ispitivanim uzorcima izolata DNA određena je na temelju standardne krivulje pripremljene mjerenjem fluorescencije dvaju standarda poznate koncentracije DNA, koncentracijskog raspona 0 – 100 ng/μl, a prema uputama proizvođača. U populaciji analiziranih uzoraka, srednja vrijednost koncentracije DNA iznosila je $18,04 \pm 4,56$ ng/μl.

5.2.3. Pojavnost i koncentracija Y-DNA u uzorcima zdravih ispitanika i oboljelih od SSc-a

Mjerenjem koncentracije Y-DNA metodom qPCR-a na uređaju QuantStudio 5 u ispitivanim uzorcima DNA izoliranim iz stanica PBMC zdravih ispitanika i oboljelih od SSc-a, nije zabilježena prisutnost Y-DNA. Sukladno veličini razrijeđenja, pozitivni rezultati zabilježeni

su u uzorcima Std1-Std8 (raspon Ct-vrijednosti 23,65 – 35,54, SD ponovljenih mjerenja < 0,18) i u dva uzorka izuzeta od oboljelih ispitanika muškog spola (Tablica 5).

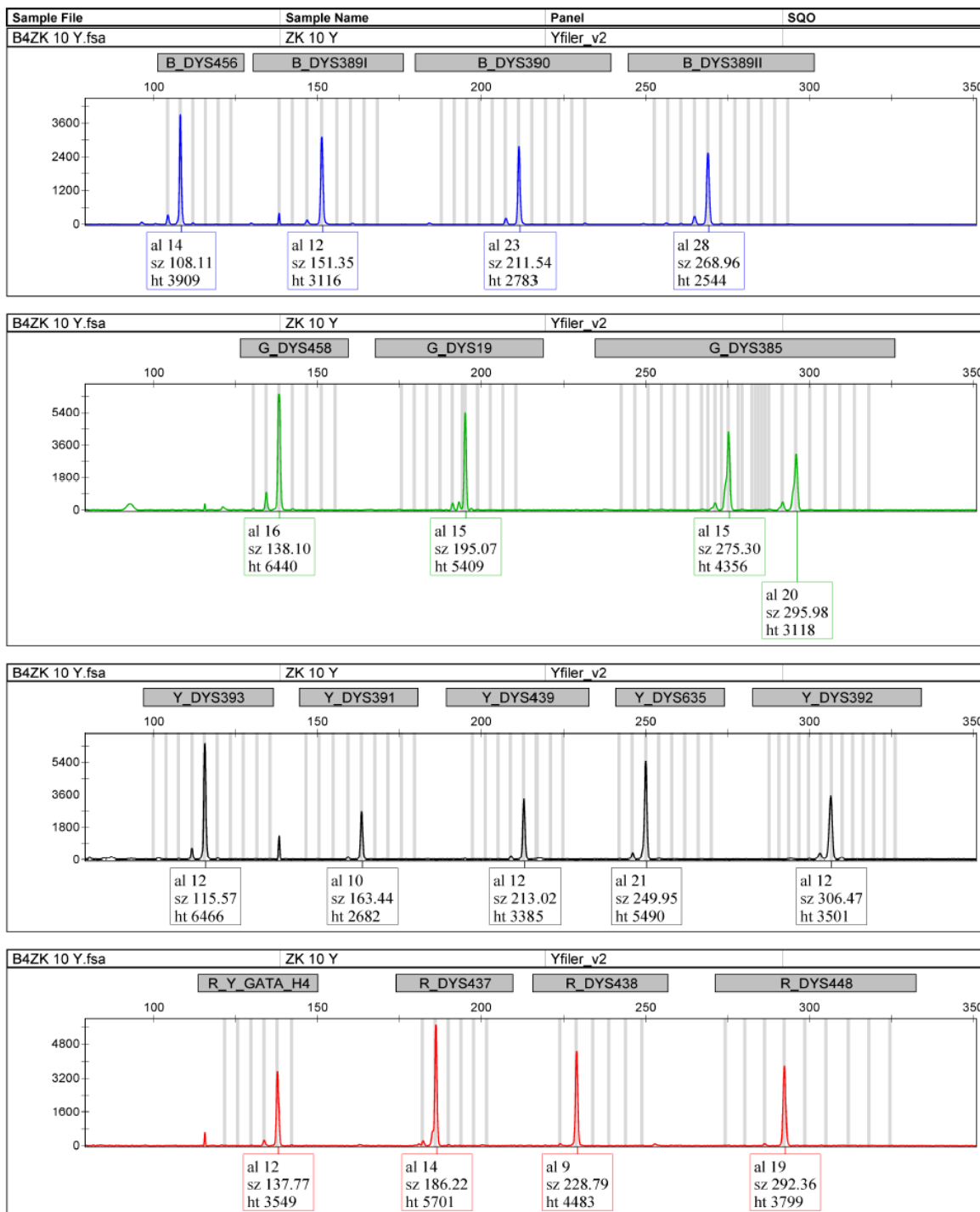
Tablica 5. Koncentracije Y-DNA u dvijema pozitivnim kontrolama

uzorak	dijagnoza	Ct Mean	Ct SD	Quantity Mean
ŽK-10	SSc	29,131	0,206	1,252
ŽK-18	SSc	25,358	0,234	14,975

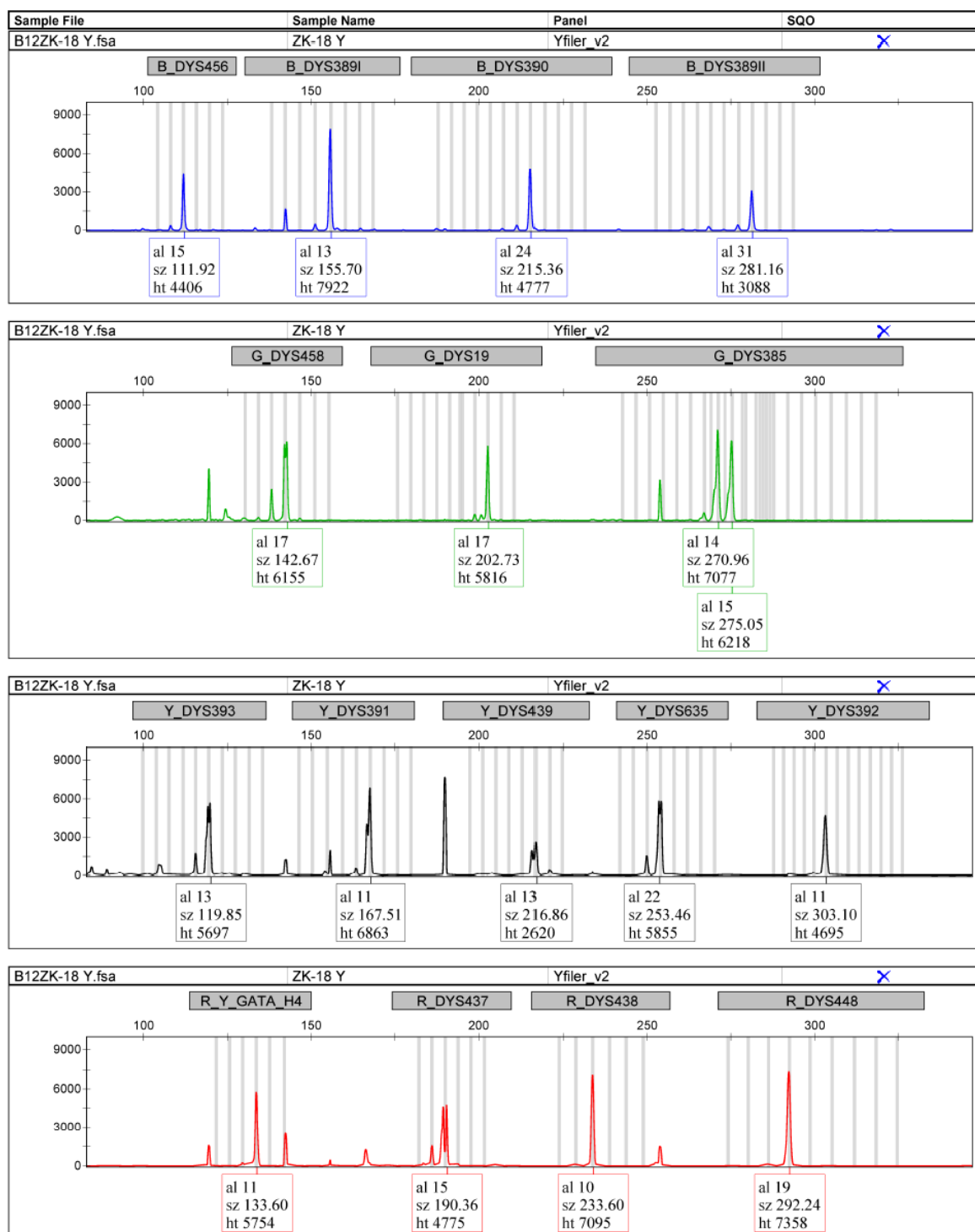
5.3. Analiza odsječaka STR na kromosomu Y

U svrhu provjere rezultata dobivenih primjenom komercijalnog kompleta Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification i uređaja Quant Studio 5 real-time PCR, provedena je i analiza 16 Y-STR-lokusa: DYS456, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385 a/b, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, Y GATA H4, DYS437, DYS438 i DYS448. Genetički profil biljega STR na kromosomu Y očekivano je zabilježen u uzorcima oboljelih muških ispitanika (ŽK-10 i ŽK-18; Slika 3 a. i 3 b.), ali prisutnost Y-DNA u uzorcima zdravih i oboljelih ispitanika ženskog spola nije dokazana.

Srpanj 2019.



a)



b)

Slika 3. Profili Y-STR-a oboljelih ispitanika muškog spola. Slika prikazuje elektroferogram dobiven metodom kapilarne elektroforeze nakon obrade rezultata u računalnom programu GeneMapper. Određeni su profili muških ispitanika oznake ŽK-10 (a) i ŽK-18 (b)

6. RASPRAVA

U svrhu kvantitativne analize mikrokimerizma u perifernoj krvi oboljelih od sistemske skleroze ispitivana je koncentracija Y-DNA u oboljelih i zdravih ispitanika. Istraživano je pokazuju li ispitanice oboljele od SSc-a različiti udio Y-DNA u odnosu na zdrave kontrole u populaciji perifernih leukocita. Proučavana je i povezanost promjene u koncentraciji Y-DNA s obilježjima i težinom SSc-a. Dosadašnji naponi u istraživanju etiologije i patogeneze SSc-a ukazuju na potencijalnu ulogu mikrokimerizma, koji se može pojaviti tijekom trudnoće kao posljedica razmjene biološkog materijala između majke i djeteta. Otkriveno je da fetalne stanice perzistiraju u majčinoj perifernoj krvi desetljećima nakon trudnoće. Dugotrajna perzistencija fetalnih stanica ima potencijalni biološki značaj, uključujući ulogu fetalnih stanica u razvoju autoimunosti. U svrhu provjere te hipoteze, analizirane su specifične genske regije kromosoma Y, kao biljega potencijalne prisutnosti fetalnih stanica u perifernoj krvi oboljelih ispitanica koje su rodile barem jedno muško dijete. S istim ciljem, provedena je i kvantitativna analiza kromosoma Y, ali zabilježeni rezultati nisu potvrdili ranija izvješća o prisutnosti Y-DNA u oboljelih od SSc-a.

Mjerenje koncentracije Y-DNA i analiza biljega Y-STR provedena je na 30 uzoraka izoliranih DNA iz stanica PBMC 18 oboljelih i 10 zdravih ispitanika. Kao pozitivne kontrole testirana su i dva dodatna uzorka izolirana iz stanica PBMC dvaju oboljelih ispitanika muškog spola. Kvantitativna analiza i analiza STR-a Y-DNA u perifernoj krvi 28 ispitanica nije zabilježila prisustvo kromosoma Y. Takav je rezultat moguća posljedica nemogućnosti detekcije izrazito male količine Y-DNA u ispitivanim uzorcima i potencijalno ukazuje na nedovoljno značajnu ulogu perifernih fetalnih mikrokimernih stanica u razvoju SSc-a. Indikatori učinkovitosti i preciznosti qPCR-reakcije učinjene primjenom komercijalnog kompleta Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification isključuju mogućnost lažno negativnih rezultata i podupiru zabilježena mjerenja, barem u okviru ispitivanog koncentracijskog raspona (50 ng/μL – 0,02 ng/μL). U prilog optimalnih metodoloških uvjeta u kojima je učinjena analiza, svjedoče i pozitivni rezultati Y-DNA ostvareni u uzorcima ispitanika muškog spola.

Naši se rezultati, međutim razlikuju u odnosu na istraživanje koje su proveli Evans i sur. na uzorku stanica PBMC izoliranih iz periferne krvi 48 zdravih i 20 oboljelih ispitanica na SSc. U njihovom istraživanju pojava mikrokimerizma potvrđena je u 33 % (16 od 48) zdravih žena i 60 % (12 od 20) žena sa SSc-om. Za razliku od našeg istraživanja, Evans i sur. koristili su

drugačiji metodološki pristup uključujući primjenu ugnježdene (engl. nested) reakcije PCR-a i znatno veće količine materijala DNA (1 µl/uzorku) za analizu prisutnosti Y-DNA, koje pak uvelike premašuju razine DNA analizirane u okviru ove studije (cca 40 ng/uzorku) (1). U istraživanju koje su proveli Lambert NC i sur. ispitivana je koncentracija Y-DNA u plazmi i stanicama PBMC. Analiza je provedena na uzorcima plazme 22 kontrolne ispitanice i 25 žena oboljelih od SSc-a koje su rodile barem jedno muško dijete. Među njima, FMc je zabilježen u 6 zdravih i 9 oboljelih ispitanica. Za kvantifikaciju FMc-a u plazmi izračunata je vrijednost genomskog ekvivalenta muških stanica na milijun majčinih stanica u perifernoj krvi (gEq/mil; engl. genome equivalent male cells per milion maternal cells) te je u oboljelih zabilježeno 0 - 8,2 fetalnih stanica na milijun majčinih, a u kontrolama taj je omjer iznosio 0 - 10 / milijun. U tom istraživanju u oboljelih od SSc-a nije zabilježena značajna razlika u količini Y-DNA u plazmi u odnosu na plazmu zdravih ispitanica. Suprotno tomu, Lambert NC i sur. uočili su značajne razlike u količini Y-DNA u uzorcima stanica PBMC izoliranih iz periferne krvi 47 oboljelih i 46 zdravih ispitanica. Za ciljnu qPCR Y-DNA regiju odabrali su sekvencu DYS14 koja je strogo Y-specifična. Geni koji su u humanom genomu prisutni u samo jednoj kopiji, poput gena SRY koji je analiziran u okviru ove studije, izražavaju manju osjetljivost u analizi qPCR-a nego geni s više genskih kopija poput DYS14. Lambert i sur. također su koristili nešto veće početne količine DNA te su za potrebe analize qPCR-a primijenili 66 ng DNA iz stanica PBMC te 5 µL resuspendirane DNA iz plazme. (42). Pozitivni rezultati koje su zabilježili Evans i Lambert, moguća su posljedica drugačijeg metodološkog pristupa pri čemu veća populacija ispitanika, odabir specifičnijih ciljnih sekvenci i povećanje količine materijala DNA za analizu igraju ključnu ulogu.

Zanimljivo je napomenuti da je u okviru studije Lamberta i sur., pozitivan nalaz Y-DNA u plazmi jedne ispitanice zabilježen kao posljedica transfuzije krvi. To ukazuje na značajan rizik od lažno pozitivnih rezultata FMc-a u ispitanika na SSc izloženih posljedicama eventualnih transfuzijskih ili transplantacijskih intervencija, prepoznatim ili neprepoznatim blizanačkim trudnoćama i spontanim ili induciranim pobačajima. U namjeri da istraži ulogu drugih, ne-fetalnih izvora strane DNA u razvoju SSc-a, Yan Z i sur. istražili su prisutnost Y-DNA kod žena koje nisu rodile muško dijete. U istraživanju su koristili qPCR za amplifikaciju DYS14 Y-kromosomske sekvence. U njihovom istraživanju pojava Y-DNA potvrđena je kod četiriju žena sa SSc-om (dvije bez povijesti prethodnih trudnoća ili poroda i dvije s potvrđenim paritetom) te u tri zdrave žene bez povijesti o gravidnosti ili paritetu, ali ne i u zdravih ispitanica koje su rodile žensku djecu. Zanimljivo je naglasiti da nijedna od

navedenih žena s pozitivnim nalazom Y-DNA u perifernoj krvi nije bila izložena transfuziji krvi, niti je imala muškog blizanca, što upućuje na važnost drugih izvora Y-DNA u žena, koje tek treba istražiti. Ne smije se zanemariti uloga fetalnih stanica ženskih potomaka, koje također mogu sudjelovati u pojavi FMc-a, a čija se prisutnost ne može zabilježiti analizom sekvenci Y-DNA. Štoviše, u jedne ispitanice nije dokazana Y-DNA, ali je potvrđena prisutnost stanica koje izražavaju antigene HLA različite od njezinih, ali istovjetne očevim. Rezultati njihovog istraživanja naglašavaju potrebu za dodatnim metodama ispitivanja mikrokimerizma poput kvantitativnih pristupa usmjerenih na analizu gena HLA ili drugih genskih polimorfizama (31).

Johnson i sur. pokušali su identificirati i kvantificirati FMc u različitim tkivima kod žena oboljelih od SSc-a. Analizirali su više uzoraka tkiva dobivenih obdukcijom žena oboljelih od SSc-a ili umrlih od uzroka koji nisu povezani s autoimunim bolestima. Za otkrivanje muških fetalnih stanica u uzorcima nadbubrežne žlijezde, srca, crijeva, bubrega, jetre, pluća, limfnih čvorova, gušterače, kože, slezene i paratireoidne žlijezde koristili su metodu fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH). Muške fetalne stanice najčešće su uočene u slezeni ispitanica oboljelih od SSc-a, što je bilo za očekivati s obzirom na ulogu centralnih limfoidnih organa majke u razvoju tolerancije prema fetalnim antigenima. Tolerancija je važan čimbenik koji osigurava perzistenciju fetalnih stanica u majčinom tkivu i u perifernoj cirkulaciji. S obzirom na to, osim u slezeni, muške fetalne stanice najčešće su primijećene u limfnim čvorovima, plućima, nadbubrežnoj žlijezdi i koži što sugerira da fetalne stanice mogu migrirati i uspostaviti mikrokimerizam u više tipova tkiva. U slučaju druge trudnoće, fetalne stanice iz prethodne trudnoće mogu također potencijalno migrirati do tkiva i organa novog fetusa (31). Prisutnost fetalnih stanica u unutarnjim organima može imati za posljedicu razvoj autoimunih bolesti. Važno je napomenuti da u tkivu žena čija je smrt bila posljedica uzroka nevezanih uz autoimune bolesti, muške fetalne stanice nisu zabilježene (32).

Povezanost između mikrokimerizma i drugih autoimunih bolesti također je ispitivana. Corpechot C i sur. istražili su potencijalnu ulogu mikrokimerizma u primarnoj bilijarnoj cirozi (PBC). Za otkrivanje kromosoma Y koristili su perifernu krv i tkivo jetre. U njihovom istraživanju prikupljeno je 20 uzoraka krvi kontrolnih ispitanica i 20 uzoraka oboljelih ispitanica koje su rodile barem jedno muško dijete te 15 uzoraka tkiva jetre kontrolnih ispitanica i 25 oboljelih ispitanica. Y-DNA iz periferne krvi, odnosno jetre zabilježena je u 9/20 odnosno 5/15 oboljelih, te 5/20 odnosno 8/25 zdravih žena. Srednja vrijednost gEq/mil u

perifernoj krvi oboljelih iznosila je $5,2 \pm 2,2$, , odnosno $1,8 \pm 0,9$ u zdravih ispitanika. U jetri oboljelih ispitanika zabilježeno je $1,4 \pm 0,6$ gEq/mil, a u zdravih $2,2 \pm 0,7$ gEq/mil. Statistički značajna razlika količine strane DNA između kontrolnih ispitanika i oboljelih ispitanika nije zabilježena. Također nije uočena značajna korelacija između mikrokimerizma i težine oboljenja PBC-a. Međutim, uočena je povezanost među pojavom mikrokimerizma i učestalosti Sjögrenovog sindroma i anticentromernih protutijela, koje često vidamo u oboljelih od SSc-a (43). S obzirom na izostanak pozitivnih rezultata mjerenja Y-DNA u našim uzorcima, u okviru ove studije nije bilo moguće provesti analizu povezanosti vrijednosti koncentracije Y-DNA s obilježjima i težinom SSc-a.

Unatoč navedenom, rezultati drugih istraživanja pokazuju da je primjenom povećane količine DNA i analizom specifičnijih genskih regija moguće unaprijediti osjetljivost i razlučivost metode qPCR-a. Analizom dodatnih, ne samo genskih lokusa Y-DNA, može se postići detekcija fetalnih stanica ženskog porijekla koje također mogu biti inicijatori aktivacije imunološkog odgovora u majke. Nastavno bi se istraživanje trebalo provesti na većem broju ispitanika, analizom ekspresije različitih genskih biljega u uzorcima veće početne koncentracije DNA.

7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- prisutnost i koncentracija Y-DNA u ispitivanim uzorcima nije utvrđena, potencijalno kao posljedica izrazito male količine Y-DNA koja se u ispitivanim uzorcima nalazi ispod donje granice osjetljivosti kompleta QuantiFiler Y Human Male DNA Quantification
- za potvrdu rezultata kvantitativne analize mikrokimerizma u SSc-a potrebno je analizirati veću količinu DNA na većem broju ispitanika uz izbor dodatnih, specifičnijih genskih regija.

8. SAŽETAK

UVOD: SSc je kronična autoimuna bolest vezivnog tkiva nepoznate etiologije. Mikrokimerizam je prisutnost male količine stranih stanica ili DNA unutar tkiva ili cirkulacije pojedinca. Postoje dvije osnovne vrste mikrokimerizma, majčinski mikrokimerizam (MMc) i fetalni mikrokimerizam (FMc), koji se razvijaju kao posljedica dvosmjernog prometa stanica u trudnoći.

CILJ ISTRAŽIVANJA: istražiti kvantitativne udjele Y-specifičnih genskih regija u uzorcima DNA izoliranih iz perifernih leukocita oboljelih od SSc-a i zdravih ispitanika te usporediti izmjerene koncentracije Y-DNA s biokemijskim i demografskim obilježjima ispitanika.

MATERIJALI I METODE: U istraživanje je obuhvaćeno 18 oboljelih i 10 zdravih, punoljetnih ispitanica koje su rodile barem jedno muško dijete te dvije pozitivne kontrole muškog spola. Za izolaciju ukupnih perifernih leukocita (PBMC) iz pune krvi korišten je medij LymphoprepTM. Izolacija DNA provedena je primjenom komercijalnog kompleta Qiagen QIAamp Mini. Mjerenje koncentracije Y-DNA provedeno metodom qPCR na uređaju QuantStudio 5 primjenom komercijalnog kompleta QuantifilerTM Y Human Male DNA Quantification. Analiza biljega STR učinjena je na uređaju ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

REZULTATI: Prisutnost i koncentracija Y-DNA u uzorcima zdravih ispitanika i oboljelih od SSc-a nije zabilježena. Koncentracija Y-DNA uspješno je analizirana u standardnim uzorcima i u dvije pozitivne kontrole te su dobiveni profili Y STR kontrolnih ispitanika muškog spola.

ZAKLJUČAK: Izostanak pozitivnog nalaza Y-DNA u uzorcima stanica PBMC oboljelih od SSc-a moguća je posljedica izrazito male količine Y-DNA u ispitivanim uzorcima. Za potvrdu rezultata kvantitativne analize mikrokimerizma u SSc-u potrebna je analiza veće količine DNA u većem broju ispitanika uz odabir specifičnijih genskih regija.

KLJUČNE RIJEČI: sistemska skleroza, mikrokimerizam, fetalni mikrokimerizam, majčinski mikrokimerizam.

9. SUMMARY

Quantitative analysis of microchimerism in peripheral blood of scleroderma patients

INTRODUCTION: Systemic sclerosis (SSc) is a chronic autoimmune disease of the connective tissue of the unknown etiology. Microchimerism is the presence of a small amount of foreign cells or DNA within the tissue or circulation of an individual. There are two basic types of microchimerism, maternal microchimerism (MMc) and fetal microchimerism, which develop as a result of bidirectional cell turnover in pregnancy.

OBJECTIVE: The aim of this study is to investigate the quantitative proportions of Y specific gene regions in DNA samples isolated from peripheral leukocytes from both SSc subjects and healthy subjects, and to compare the measured concentrations of Y DNA with the biochemical and demographic characteristics of the subjects.

MATERIALS AND METHODS: The study included 18 SSc subjects and 10 healthy controls, adult women who gave birth to at least one male child and two positive controls for the male gender. LymphoprepTM medium was used to isolate total peripheral leukocytes (PBMC) from the blood. DNA isolation was performed using the Qiagen QIAamp Mini commercial kit. The DNA concentration was measured by the qPCR method on the QuantStudio 5 using QuantifilerTM Y Human Male DNA Quantification commercial kit. The analysis of STR marker was done on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

RESULTS: The presence and concentration of Y DNA in the samples of healthy controls and SSc subjects were not recorded. The Y DNA concentration was successfully analyzed in standard samples and in two positive controls and obtained Y STR profiles of male control subjects.

CONCLUSION: The absence of positive DNA in PBMC samples of SSc subjects is a possible consequence of the extremely small amount of Y DNA in the analyzed samples. To confirm the results of quantitative analysis of microchimerism in SSc requires analysis of a larger amount of DNA in higher number of subjects with the selection of more specific gene regions.

KEY WORDS: systemic sclerosis, microchimerism, maternal microchimerism, fetal microchimerism

10. LITERATURA

1. Evan PC, Lambert N, Maloney S, Furst DE, Moore JM, Nelson JL. Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood*. 1999;93(6):2033-7.
2. Scaletti C, Vultaggio A, Maggi E, Romagnani S, Piccinni MP. Microchimerism and systemic sclerosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125:196-202.
3. Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. *Interna medicina*. 4. dopunjeno izd. Zagreb:Naklada ljevak; 2008. str. 1390-1392.
4. Radić M, Martinović-Kaliterna D, Fabijanić D, Radić J. Sistemska skleroza-patogeneza, kliničke manifestacije i liječenje. *Liječ Vjesn* 2010; 132:162-168.
5. HUOS-hrvatska udruga oboljelih od sklerodermije. Sistemska skleroza (sklerodermija). Dostupno na adresi: <http://huos.hr/udruga/korisna-dokumentacija/sistemska-skleroza-sklerodermija/>. Datum pristupa: 1. 9. 2019.
6. Viswanath V, Phiske MM, Gopalani VV. Systemic sclerosis: current concepts in pathogenesis and therapeutic aspects of dermatological manifestations. *Indian J Dermatol*. 2013;58(4):255-68.
7. Agarwal SK, Reveille JD. The genetics of scleroderma (systemic sclerosis). *Curr Opin Rheumatol*. 2010;22:133-8.
8. Grossman C, Dovrish Z, Shoenfeld Y, Amital H. Do infections facilitate the emergence of systemic sclerosis?. *Autoimmun Rev*. 2011;10(5):244-7.
9. Randone SB, Guiducci S, Cerinic MM. Systemic sclerosis and infections. *Autoimmun Rev*. 2008;8(1):36-40.
10. Junqueira LC, Carneiro J. *Osnove histologije, udžbenik i atlas prema 10. američkom izdanju*. Zagreb:Školska knjiga; 2005. str. 95-216.
11. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, Postlethwaite AE. Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Front Immunol*. 2015;6:272.
12. Balbir-Gurman A, Braun-Moscovici Y. Scleroderma-new aspects in pathogenesis and treatment. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2012;26(1):13-24.
13. Dong C, Zhu S, Wang T, Yoon W, Li Z, Alvarez RJ, i sur. Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(6):3908-13.
14. Adnan ZA. Diagnosis and treatment of scleroderma. *Acta Med Indones*. 2008;40(2):109-12.

15. Krieg T, Takehara K. Skin disease: a cardinal feature of systemic sclerosis. *Rheumatology* (Oxford). 2009;48:iii14-iii18.
16. Wigley FM. Vascular disease in scleroderma. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2009;36(2-3):150-75.
17. McFarlane IM, Bhamra MS, Kreps A, Iqbal S, Al-Ani F, Grant C, i sur. Gastrointestinal Manifestations of Systemic Sclerosis. *Rheumatology* (Sunnyvale) 2018;8(1).
18. Paik JJ. Muscle disease in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol*. 2018;30(6):576-580.
19. Kowal-Bielecka O, Landewé R, Avouac J, Chwiesko S, Miniati I, Czirjak L, i sur. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis*. 2009;68(5):620-8.
20. Poudel DR, Derk CT. Mortality and survival in systemic sclerosis: a review of recent literature. *Curr Opin Rheumatol*. 2018;30(6):588-593.
21. Rubio-Rivas M, Royo C, Simeón CP, Corbella X, Fonollosa V. Mortality and survival in systemic sclerosis: systemic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum*. 2014;44(2):208-19.
22. Gammill HS, Nelson JL. Naturally acquired microchimerism. *Int J Dev Biol*. 2010;54(2-3):531-43.
23. Gammill HS, Aydelotte TM, Guthrie KA, Nkwopara EC, Nelson JL. Cellular fetal microchimerism in preeclampsia. *Hypertension*. 2013;62(6):1062-7.
24. Gammill HS, Harrington WE. Microchimerism: Defining and redefining the prepregnancy context – A review. *Placenta*. 2017;60:130-133.
25. Ye Y, Berendine VZ, Hellmich C, Gillespie KM. Microchimerism: covert genetics?. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2010;1(4):350-7.
26. Stevens AM. Maternal microchimerism in health and disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016;31:121-30.
27. Stevens AM. Do maternal cells trigger or perpetuate autoimmune diseases in children?. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2007;5:9.
28. Wright CF, Chitty LS. Cell-free fetal DNA and RNA in maternal blood: implications for safer antenatal testing. *BMJ*. 2009;339:b2451.
29. Primorac D, Lauc G, Gornik I, Pivac T, Asplen C, Palmbach TM, i sur. Primjena analize DNA u sudskoj medicini i provosuđu. 1.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2008. str. 8-12.
30. Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evan PC, Smith A, i sur. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet*. 1998;351(9102):559-62.

31. Lambert NC, Pang JM, Yan Z, Erickson TD, Stevens AM, Nelson JL, i sur. Male microchimerism in women with systemic sclerosis and healthy women who never given birth to a son. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(6):845–8.
32. Johnson KL, Nelson JL, Furst DE, Roberts DJ, Zhen DK, Bianchi DW, i sur. Fetal cell microchimerism in tissue from multiple sites in women with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2001;44(8):1848-54.
33. Bøyum, A. (1968) Separation of leucocytes from blood and bone marrow *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21, suppl. 97
34. Nakayama Y, Yamaguchi H, Einaga N, Esumi M. Pitfalls of DNA Quantification Using DNA-Binding Fluorescent Dyes and Suggested Solutions. *PLoS One.* 2016;11(3):e0150528.
35. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 128-129.
36. Peirson SN, Butler JN. Quantitative polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 2007;362: 349-62.
37. Wang H, Shi Z, Lu Z, Tan W, Silke S, Yang C, i sur. TaqMan probe array for quantitative detection of DNA targets. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(1):e4.
38. Applied Biosystems. Quantifiler® Human and Y Human Male DNA Quantification Kits user guide. Carlsbad, CA: Life Technologies Corporation 2014.
39. Čepelak I, Čvorišćec D. Štrausova medicinska biokemija. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 198-202.
40. Tagliaro F, Turrina S, Smith FP. Capillary electrophoresis: principles and applications in illicit drug analysis. *Forensic Sci Int.* 1996;77(3):211-29.
41. Butler JM, Buel E, Crivellente F, McCord BR. Forensic DNA typing capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis.* 2004;25(10-11):1397-412.
42. Lambert NC, Lo YM, Erickson TD, Tylee TS, Nelson JL, Furst DE, i sur. Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulating DNA? A quantitative answer. *Blood.* 2002;100(8):2845-51.
43. Corpechot C, Barbu V, Chazouilleres O, Poupon R. Fetal microchimerism in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 2000;33(5):696-700.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Toni Anđelić

Datum i mjesto rođenja: 3. 8. 1995., Osijek

Adresa stanovanja: Ante Kovačića 13, Tenja

Kontakt: 0976499209

OBRAZOVANJE

2002. – 2010. Osnovna škola Tenja

2010. – 2014. I. gimnazija Osijek

2014. – 2017. Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike u Osijeku

2017. – 2019. Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike u Osijeku