Značaj mikronukleus metode u procjeni stupnja kromosomske nestabilnosti i nastajanja slobodnog oblika Downovog sindroma kod parova mlađe životne dobi

Lazar, Ivana

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:152:031696

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ivana Lazar

ZNAČAJ MIKRONUKLEUS METODE U PROCJENI STUPNJA KROMOSOMSKE NESTABILNOSTI I NASTAJANJA SLOBODNOG OBLIKA DOWNOVOG SINDROMA KOD PAROVA MLAĐE ŽIVOTNE DOBI

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ivana Lazar

ZNAČAJ MIKRONUKLEUS METODE U PROCJENI STUPNJA KROMOSOMSKE NESTABILNOSTI I NASTAJANJA SLOBODNOG OBLIKA DOWNOVOG SINDROMA KOD PAROVA MLAĐE ŽIVOTNE DOBI

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren u Odjelu za laboratorijsku citogenetiku Klinike za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice „Sveti Duh“, Zagreb

Mentor rada: dr. sc. Feodora Stipoljev, izv. prof.

Rad ima 51 list, 7 tablica i 9 slika.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Genetska osnova i fenotipska obilježja Downova sindroma 1
1.2. Etiologija slobodnoga oblika Downova sindroma 2
1.2.1. Čimbenici rizika za nastanak trisomije 21 u mladih majki 4
1.2.2. Rekombinacija 4
1.2.3. Metabolizam folata 5
1.2.4. Okolišni čimbenici 6
1.2.5. Očevo podrijetlo trisomije 21 6
1.3. Kromosomska nestabilnost u mladih roditelja djece s Downovim sindromom 7
1.4. Mikronukleus-test 8
1.4.1. Prednosti i ograničenja mikronukleus-testa 9
1.4.2. Referentne vrijednosti mikronukleus-testa 9
1.5. Mikronukleusi 10
1.5.1. Otkriće i primjena analize mikronukleusa 10
1.5.2. Podrijetlo mikronukleusa 11
1.5.3. Mikronukleusi nastali od acentričnih kromosomskih ili kromatidnih fragmenata 12
1.5.4. Mikronukleusi podrijetlom od cijelih kromosoma 12
1.5.5. Mikronukleusi nastali iz ekstrakromosomskih elemenata 13
1.5.6. Utjecaj okolišnih čimbenika i životnih navika na nastanak mikronukleusa 13
1.6. Nukleoplazmatski mostovi 14
1.7. Nuklearni pupovi 14
1.8. Indeks diobe jezgara 15
2. HIPOTEZA 16
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 17
4. ISPITANICI I METODE 18
4.1. Ustroj studije 18
4.2. Ispitanici 18
4.3. Metode 19
4.3.1. Kultivacija 20
4.3.2. Prekid kulture 20
4.3.3. Izrada preparata 20
4.3.4. Analiza preparata 20
4.3.5. Indeks diobe jezgara 22

4.4. Statističke metode 22
5. REZULTATI 23
5.1. Medicinska anamneza, životne navike ispitanika i izloženost okolišnim čimbenicima 24
5.2. Životna dob roditelja 24
5.3. Rezultati mikronukleus-testa 25
5.3.1. Učestalost mikronukleusa 27
5.3.2. Učestalost binuklearnih stanica s mikronukleusima te raspodjela binuklearnih stanica s mikronukleusima 29
5.3.3. Učestalost mikronukleusa u mononuklearnim stanicama, učestalost nukleoplazmatskih mostova i nuklearnih pupova 31
5.3.4. Vrijednosti indeksa diobe jezgara 33
5.4. Analiza krivulje osjetljivosti 34
6. RASPRAVA 36
7. ZAKLJUČCI 40
8. SAŽETAK 41
9. SUMMARY 42
10. LITERATURA 43
11. ŽIVOTOPIS 49
12. PRILOZI 51

POPIS KRATICA

AUC – površina ispod krivulje (engl. *area under the curve*)

BC – binuklearna stanica (engl. *binucleated cell*)

CBMN – mikronukleus-test sa zaustavljenom citokinezom (engl. *cytokinesis-block micronucleus assay*)

DM – dvostruke minute (engl. *double minutes*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

DS – Downov sindrom (engl. *Down syndrome*)

DSCR – Down sindrom kritična regija (engl. *Down syndrome critical region*)

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

MC – mononuklearna stanica (engl. *mononucleated cell*)

MI – mejoza I ili prva mejotička dioba

MII – mejoza II ili druga mejotička dioba

MN – mikronukleus (engl. *micronucleus*)

MNT – mikronukleus-test (engl. *micronucleus test*)

MTHFR – 5,10-metiltetrahidrofolat reduktaza (engl. *5,10-methylenetetrahydrofolate reductase*)

MTR – metionin sintaza (engl. *methionine synthase*)

MTRR – metionin sintaza reduktaza (engl. *methionine synthase reductase*)

NBUD – nuklearni pup (engl. *nuclear bud*)

NDI – indeks diobe jezgara (engl. *nuclear division index*)

NPB – nukleoplazmatski most (engl. *nucleoplasmic bridge*)

ROC – krivulja osjetljivosti (engl. *receiver operating characteristic curve*)

POPIS TABLICA

Tablica 1. Prikaz ishoda trudnoća između ispitivane i usporedne skupine. 23
Tablica 2. Usporedba dobi između ispitivane i usporedne skupine. 25
Tablica 3. Prikaz učestalosti mikronukleusa na 1000 binuklearnih stanica. 27
Tablica 4. Prikaz raspodjele binuklearnih stanica s različitim brojem mikronukleusa u ispitivanoj i usporednoj skupini te podskupinama majki i očeva. 30
Tablica 5. Prikaz učestalosti nukleoplazmatskih mostova i nuklearnih pupova na 1000 binuklearnih stanica te učestalost mikronukleusa na 1000 mononuklearnih stanica. 32
Tablica 6. Prikaz vrijednosti indeksa diobe jezgara u ispitivanoj i usporednoj skupini te podskupinama majki i očeva. 33
Tablica 7. Rezultati krivulje osjetljivosti za ukupan broj mikronukleusa. 35

POPIS SLIKA

Slika 1. Shematski prikaz gametogeneze 3
Slika 2. Shematski prikaz nastanka mikronukleusa, nukleoplazmatskog mosta i nuklearnog pupa 11
Slika 3. Kariotip muškoga ploda sa slobodnim oblikom Downova sindroma dobiven citogenetskom analizom kulture stanica plodove vode 18
Slika 4. Prikaz rezultata mikronukleus-testa u ispitivanoj skupini 26
Slika 5. Usporedba učestalosti mikronukleusa između roditelja ispitivane i usporedne skupine. 28
Slika 6. Usporedba učestalosti mikronukleusa između očeva ispitivane i usporedne skupine. 28
Slika 7. Usporedba učestalosti mikronukleusa između majki ispitivane i usporedne skupine. 29
Slika 8. Usporedba vrijednosti indeksa diobe jezgara između roditelja ispitivane i usporedne skupine. 33
Slika 9. Krivulja osjetljivosti za ukupan broj mikronukleusa. 34

1. UVOD

1.1. Genetska osnova i fenotipska obilježja Downova sindroma

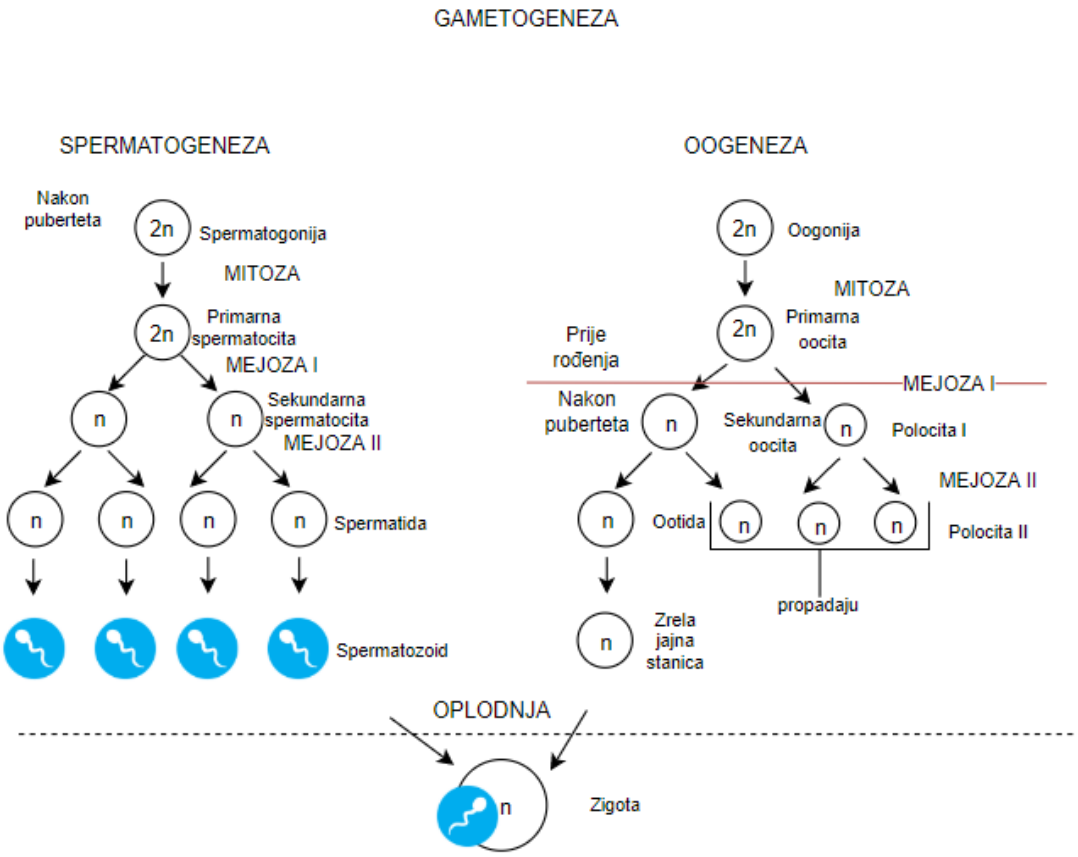
Downov sindrom (DS) jedan je od najčešćih kromosomskih poremećaja u ljudi s pojavnošću od oko 1 na 700 do 1 na 1000 novorođenih (1, 2). Kliničku sliku DS-a prvi je opisao John Langdon Haydon Down 1866. godine nakon što je nekolicina liječnika opisala skupinu pacijenata s mentalnom zaostalošću, niskoga rasta te specifičnih karakteristika lica. Prepoznavši ovu skupinu pacijenata kao bolesnike sa zasebnim poremećajem, otkriveno je da velik utjecaj na pojavnost DS-a ima dob majke, a pretpostavljalo se da postoji i genetska povezanost. U većine osoba s DS-om prisutna su fenotipska obilježja kao što su manja glava, kosi očni rasporci, nisko položene uške, mala usna šupljina s protruzijom jezika ili brazda četiri prsta. Duševna zaostalost prisutna je kod svih osoba s DS-om. Mogući su poremećaji gotovo svih organskih sustava, među kojima je najčešći prirođena srčana greška (3). Česti su i poremećaji probavnoga i dišnoga sustava, rani razvoj demencije Alzheimerova tipa (4), a podložniji su i razvoju akutne mijeloične leukemije u dječjoj dobi (5).

Pojavom kariotipizacije, 1959. godine Jerome Lejeune utvrdio je da je DS posljedica prisutnosti trećega kromosoma 21 (1, 6). S obzirom na vrstu kromosomskoga poremećaja razlikujemo tri tipa DS-a: regularni ili slobodni oblik, translokacijski te mozaični oblik. U više od 90 % osoba s DS-om javlja se slobodni oblik ili trisomija 21. Slobodni oblik DS-a najčešće nastaje kao rezultat nerazdvajanja kromosoma 21 tijekom gametogeneze u roditelja te u manje od 2 % slučajeva uslijed mitotskoga nerazdvajanja kromosoma u ranome embrionalnom razdoblju nakon oplodnje. U slučaju translokacijskoga oblika koji se javlja u 3 – 4 % osoba s DS-om, treći kromosom 21 vezan je na neki drugi akrocentrični kromosom tvoreći Robertsonovu translokaciju. Najčešće se Robertsonova translokacija nalazi između 14. i 21. kromosoma. Translokacija može nastati spontano odnosno *de novo* ili se može naslijediti od roditelja, nositelja Robertsonove translokacije. U 2 – 3 % slučajeva javlja se mozaični oblik kod kojeg su prisutne dvije stanične linije s različitim kariotipom. Jedna ima normalan broj kromosoma, dok je druga trisomična za 21. kromosom. Tek u nešto manje od 1 % osoba s DS-om nalazi se parcijalna trisomija 21. kromosoma koja nastaje kao posljedica duplikacije dijela 21. kromosoma koji sadrži „Down sindrom kritičnu regiju“ (engl. Down syndrome critical region, DSCR) ili nebalansirane recipročne translokacije između kromosoma 21 i nekoga drugog kromosoma (4, 7).

Kromosom 21 čini 1 - 1.5 % ljudskoga genoma i najmanji je ljudski autosom. Duljina dugoga kraka kromosoma 21 je 33.5 Mb, a kratkoga kraka 5 - 15 Mb. Smatra se da kromosom 21 sadrži više od 400 gena, dok ih otprilike 240 kodira proteine. Pretpostavlja se da je upravo tako malen broj gena zaslužan za vijabilnost ove trisomije. Tri kopije kromosoma 21 rezultiraju 1,5 puta većom dozom genskoga produkta u odnosu na euploidne stanice. Smatra se da je povišeni izražaj gena smještenih na kromosomu 21, ali i njihov utjecaj na funkcioniranje drugih gena unutar genoma odgovoran za patogenezu DS-a. Za gene smještene u kromosomskoj regiji 21q22.1-22.3 smatra se da su odgovorni za većinu fenotipskih obilježja DS-a uključujući klinodaktiliju, duševnu zaostalost, abnormalnosti lica i srčane greške. Stoga se ta regija naziva „Down sindrom kritičnom regijom“ (2, 8, 9).

1.2. Etiologija slobodnoga oblika Downova sindroma

Poznato je kako u gotovo 90 – 95 % slučajeva slobodnoga oblika Downova sindroma trisomija 21 nastaje kao posljedica nepravilne rekombinacije i nerazdvajanja kromosoma tijekom majčine oogeneze. Pri tome, u otprilike 75 % slučajeva do nerazdvajanja kromosoma dolazi tijekom prve mejotičke diobe (MI) te u oko 25 % slučajeva tijekom druge mejotičke diobe (MII). Prva mejotička dioba u žena započinje tijekom fetalnoga razvoja kada dolazi do sparivanja homolognih kromosoma i rekombinacije, nakon čega slijedi stadij mirovanja. U tom stadiju oocite se nalaze nekoliko godina, do puberteta, kada prelaze u MII. Druga mejotička dioba započinje tijekom perioda od nekoliko dana pred ovulaciju i završava samo ako dolazi do oplodnje. U 5 – 10 % slučajeva trisomija 21 nastaje uslijed nerazdvajanja kromosoma tijekom spermatogeneze. Manja pojavnost kromosomskoga nerazdvajanja kod muškaraca povezuje se uz kraće razdoblje sazrijevanja spolnih stanica. Za razliku od oogeneze u žena, spermatogeneza kod muškaraca započinje u pubertetu te se odvija bez perioda odgode (6, 10, 11, 12) (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz gametogeneze

Međutim, uzroci nastanka slobodnoga oblika DS-a do danas nisu u potpunosti razjašnjeni. Starija dob majke u trenutku začeća jedini je do sada dokazani čimbenik rizika za nastanak trisomije 21 (13). Poznato je kako starenjem dolazi do povećana broja grešaka tijekom mitotske diobe stanica, što dovodi do pojave sve većega broja aneuploidnih stanica. Kod žena se to posebno odnosi na nepravilnu raspodjelu kromosoma X (14). Postoje brojne hipoteze kojima se pokušao objasniti utjecaj majčine dobi na nastanak trisomije 21. Prema većini do nerazdvajanja kromosoma dolazi zbog nakupljanja pogrešaka nastalih kao posljedica smanjene učinkovitosti mejotičkih mehanizama nastalih uslijed fiziološkoga procesa starenja te višegodišnje izloženosti vanjskim čimbenicima (11). Suprotno tome, skupina autora iznosi teoriju prema kojoj su u jajnicima svih žena prisutne stanice s trisomijom 21 već u fetalnome razdoblju. Većina tih trisomičnih stanica eliminira se tijekom daljnjega fetalnog i daljnjega postnatalnog razvoja, dok se učinak majčine dobi objašnjava nakupljanjem trisomičnih stanica koje su uspjele izbjeći apoptozu i doći do stadija ovulacije (15).

Međutim, više od 40 % trudnoća sa slobodnim oblikom DS-a otkrije se u parova mlađih od 35 godina, što upućuje na postojanje drugih faktora rizika osim dobi majke. Do danas nisu sasvim poznati uzroci pojavnosti trisomije 21 u mladih žena. Iznimno se malo zna i o očevu podrijetlu nastanka trisomije 21, posebice jer se rjeđe proučava nego majčino. Uzroci nerazdvajanja kromosoma i kod majki i kod očeva najčešće se objašnjavaju hipotezom o pogrešnoj rekombinaciji, tzv. "two hit" modelom. Prema ovoj hipotezi, dva su događaja koja uzrokuju nerazdvajanje kromosoma. Prvi se javlja u profazi MI kao nepravilnost za vrijeme rekombinacije te je neovisan o dobi, a do drugoga dolazi u anafazi MI ili MII kada spolna stanica ne može odgovoriti na promijenjenu rekombinaciju te se povezuje uz dob (16). Također se pretpostavlja da bi mogući uzrok trisomije 21 mogla biti i genetska predispozicija, ali i prehrana te životne navike roditelja (17).

1.2.1. Čimbenici rizika za nastanak trisomije 21 u mladih majki

Malo je podataka u stručnoj literaturi o uzrocima nastanaka trisomije 21 u žena mlađih od 35 godina. Jedna od pretpostavki je da kod mladih majki postoji genetska osnova za nepravilno razdvajanje kromosoma. Postavlja se i hipoteza o mogućemu utjecaju okolišnih čimbenika. Nadalje, Warburton (18) u svom radu navodi pojam biološkoga starenja te ističe da se majke jednake životne dobi mogu razlikovati po biološkoj starosti. Tom teorijom mogla bi se objasniti aneuploidija u mladih majki. Naime, mlade majke koje su imale dijete s DS-om mogle bi biti biološki starije s obzirom na svoju životnu dob. Pri tome biološko starenje podrazumijeva fiziološko starenje jajnika kojim se smanjuje broj folikula i kvaliteta jajnih stanica, mijenja se hormonski status te se posljedično povećava broj grešaka tijekom mejoze (18, 19).

Ghosh i suradnici (20) u svom radu iznose teoriju "genetskoga starenja" koju povezuju sa skraćivanjem telomera. Ističu da bi "genetsko starenje" moglo utjecati na funkcionalnost jajnika te dovesti do aneuploidnih oocita. Kod mlađih žena koje su imale trudnoću s DS-om uočavaju značajno skraćivanje telomera u usporedbi sa ženama koje su imale normalnu trudnoću.

1.2.2. Rekombinacija

Do homologne rekombinacije dolazi tijekom mejoze, u profazi prve mejotičke diobe, pri čemu se izmjenjuje genetski materijal između nesestrinskih kromatida homolognih

kromosoma. Na mjestima na kojima dolazi do kromatidne izmjene stvaraju se hijazme. Kako bi se nesestrinske kromatide mogle držati zajedno i kasnije pravilno razdvojiti u anafazi I, neophodan je pravilan razmještaj hijazmi. Za normalno razdvajanje kromosoma 21 hijazme se stvaraju na sredini dugoga kraka. Svaki odmak od normalnoga smještanja hijazme može biti uzrokom nerazdvajanja. U slučaju trisomije 21 majčina podrijetla uočava se potpuni izostanak rekombinacije ili samo jedna rekombinacija smještena u distalnome ili proksimalnome dijelu dugoga kraka kromosoma 21. Položaj hijazme povezuje se i s dobi majke. U mladih majki djece s DS-om češće je prisutno nerazdvajanje kromosoma tijekom MI koje nastaje kao posljedica izostanka ili telomernoga položaja rekombinacije. Rekombinacija smještena u pericentromernome području kromosoma povezuje se s nerazdvajanjem u MII i češće se javlja u majki starije dobi (21).

1.2.3. Metabolizam folata

Folati spadaju u skupinu B vitamina esencijalnih za život ljudi. Budući da se ne mogu sintetizirati u organizmu, unosimo ih hranom, posebno zelenim lisnatim povrćem, citrusima i jetrom. Folati doprinose staničnome rastu i diobi pa se njihov smanjen unos perikoncepcijski povezuje s nastankom anemije, prirođenih grešaka srca, defekata neuralne cijevi, a postoje i istraživanja koja upućuju na povezanost s rizikom rađanja djeteta s DS-om (22). Nakon unosa folata u organizam oni se reduciraju iz 5,10-metiltetrahidrofolata u aktivan oblik, 5-metiltetrahidrofolat, koji je glavni izvor metilnih skupina za remetilaciju homocisteina u metionin. Redukciju 5,10-metiltetrahidrofolata katalizira enzim metiltetrahidrofolat reduktaza (MTHFR). Ovaj enzim kodira istoimeni gen 5,10-metiltetrahidrofolat reduktaza čiji se polimorfizmi ujedno povezuju i s povećanim rizikom nerazdvajanja kromosoma 21 (23). Poznato je kako različiti polimorfizmi utječu na termolabilnost enzima MTHFR, što posljedično dovodi do povišene razine homocisteina te snižene razine metionina. Smatra se kako na ovaj način posredno dolazi i do hipometilacije pericentromernoga područja kromosoma koja dalje dovodi do abnormalne kromosomske segregacije te time povećanoga rizika za nastanka trisomije 21 (22). Unatoč brojnim dosadašnjim istraživanjima nije jednoznačno utvrđeno koji se od polimorfizama gena *MTHFR* povezuje s rizikom nastajanja trisomije 21. Najčešće proučavani polimorfizmi *MTHFR* uključuju genotipove C677T i A1298C. Međutim, danas se pretpostavlja kako bi kombinacije polimorfizama dvaju ili više gena kao što su

MTHFR, *MTR* (gen za metionin sintazu) i *MTRR* (gen za metionin sintazu reduktazu) mogle imati utjecaj na pojavu DS-a u mladih majki (24).

1.2.4. Okolišni čimbenici

Životne navike smatraju se jednim od mogućih faktora rizika za začeće djeteta s trisomijom 21 u mlađih majki. Istraživanja utjecaja konzumacije duhana na pojavnost trudnoća s DS-om dala su kontradiktorne rezultate, dok za povećanu konzumaciju alkohola nije uočena povezanost (25). Manji broj istraživača proučavao je i prehrambene navike i pretilost majki, kao i uzimanje vitaminskih pripravaka prije trudnoće (26, 27). Hildebrand i suradnici (26) utvrdili su povezanost majčine pretilosti s rizikom rađanja djeteta s DS-om, ali nisu poznati mehanizmi po kojima bi tjelesna težina mogla utjecati na nerazdvajanje kromosoma. Kao jedan od mogućih faktora rizika navodi se i nedostatna konzumacija pripravaka folne kiseline. Također, uzimanje folne kiseline u perikoncepcijskome razdoblju povezuje se sa smanjenim rizikom rađanja djeteta s DS-om (28).

Istraživanja također ukazuju na povišen rizik rađanja djeteta s DS-om zbog onečišćenja vode i hrane te zračenja. Sperling i suradnici (29) u svome su istraživanju ispitali utjecaj zračenja povezavši višu pojavnost trisomije 21 u Europi nakon nuklearne katastrofe u Černobilu.

1.2.5. Očevo podrijetlo trisomije 21

Do sada se malo zna o utjecaju čimbenika očeva podrijetla na nastanak trisomije 21. Za razliku od majčine starosne dobi kao bitnoga čimbenika za nastanak DS-a, utjecaj očeve dobi nije u potpunosti razjašnjen. Dosadašnja istraživanja pokazala su različite rezultate pa je tako u nekima utvrđeno da ne postoji povezanost očeve dobi i DS-a (30, 31), dok druga pokazuju povezanost očeve dobi s rađanjem djece s DS-om (32, 33). Nadalje, nerazdvajanje kromosoma 21 očeva podrijetla povezuje se i s nepravilnom rekombinacijom. Do sada je proveden mali broj istraživanja čiji rezultati vezani uz položaj i izostanak rekombinacije nisu jednoznačni. Oliver i suradnici (34) zapažaju statistički neznačajno višu razinu izostanaka rekombinacije, ali ne uočavaju nepravilan položaj rekombinacije.

Proučavan je i utjecaj okolišnih čimbenika u očeva djece s DS-om. Kao i u majki, utjecaj alkohola, duhana i kave nije u potpunosti objašnjen, a uslijed istovremena unosa i svakodnevne konzumacije teško je razlučiti zaseban utjecaj pojedina čimbenika (35).

1.3. Kromosomska nestabilnost u mladih roditelja djece s Downovim sindromom

Genomska nestabilnost je povećana tendencija promjene genoma tijekom stanične diobe te predstavlja predispoziciju za malignu staničnu transformaciju. Postoji nekoliko oblika genomske nestabilnosti: kromosomska nestabilnost, mikrosatelitska nestabilnost te nestabilnost parova baza. Kromosomska nestabilnost odnosi se na povećanu učestalost promjena u strukturi i/ili broju kromosoma. Strukturne promjene kromosoma kao što su delecije ili translokacije nastaju uslijed promjena u popravku dvostrukih lanaca DNA, dok se brojčane abnormalnosti kromosoma javljaju uslijed amplifikacije centrosoma, oštećenja diobenoga vretena, grešaka u kontrolnim točkama staničnoga ciklusa i nestabilnosti telomera (36). Povećana kromosomska nestabilnost uočena je i u osoba s DS-om (37).

Proučavanjem velikoga broja limfocita perifernih krvi metodom FISH, Hultén i suradnici (38) uočili su prisutnost maloga broja stanica s trisomijom 21 u gotovo svih fenotipski normalnih ispitanika. Stoga autori iznose pretpostavku kako bi u većine ljudi mogao biti prisutan kriptički mozaicizam za trisomiju 21. Međutim, značajno veći postotak stanica s trisomijom 21 uočava se u zdravih roditelja djece s DS-om (39, 40), ali i roditelja djece s DS-om mlađih od 35 godina (41). U tih je parova mikronukleus-testom uočena veća kromosomska nestabilnost u limfocitima perifernih krvi. Silva-Grecco i suradnici (42) u svome su istraživanju otkrili veći broj MN-a u stanicama perifernih krvi majki i očeva djece sa slobodnim oblikom DS-a. Znatno veću učestalost MN-a uočili su u roditelja koji su imali dvije trudnoće s DS-om u usporedbi s onima s jednom takvom trudnoćom. Caria i suradnici (40) također uočavaju veći broj MN-a u perifernim krvima djece s trisomijom 21, ali i njihovih roditelja. Kovaleva (39) nalazi veći postotak stanica s trisomijom 21 ne samo u somatskim nego i u spolnim stanicama roditelja s više trudnoća sa slobodnim oblikom DS-a. Stoga se postavlja hipoteza da ti parovi imaju veću sklonost nepravilnoj kromosomskoj raspodjeli, i to ne samo za vrijeme gametogeneze nego i kod mitotskoga dijeljenja somatskih stanica.

1.4. Mikronukleus-test

Mikronukleus-test (MNT) je metoda određivanja učestalosti MN-a u kultiviranim stanicama. Pošto se MN-i eksprimiraju samo u eukariotskim stanicama koje se dijele, test se izvodi upravo na takvim stanicama i stanicama s dobro poznatom kinetikom stanične diobe. Osim toga, zbog nepoznate sudbine MN-a nakon prve stanične diobe, potrebno je identificirati stanice s jednom staničnom podjelom (42).

Postoji nekoliko vrsta MNT-a među kojima se najčešće primjenjuje mikronukleus-test sa zaustavljenom citokinezom (CBMN). Ova je metoda ograničena jednom diobom stanice, što rezultira nastankom binuklearnih stanica u kojima se mogu analizirati MN-i. Zaustavljanje citokineze postiže se dodatkom citohalazina B. Citohalazin B inhibira polimerizaciju aktina potrebnoga za stvaranje mikrofilamentnoga prstena koji sužava citoplazmu između jezgara stanica kćeri tijekom citokineze (42, 43, 44)

Analizom MN-a u binuklearnim stanicama dobivamo informaciju o kromosomskim promjenama nastalim *in vivo*, ali i *in vitro* za vrijeme kultivacije. Osim u binuklearnim stanicama, moguće je i određivanje MN-a u mononuklearnim stanicama. Fenech i suradnici (45) već su 1997. godine predložili da se učestalost MN-a istraži u mononuklearnim stanicama u ranoj fazi kultivacije limfocita, prije njihove podjele. Tako se dobivaju podaci o kromosomskim oštećenjima nastalim isključivo *in vivo*, prisutnim već kod uzorkovanja krvi. Analizom učestalosti MN-a u mononuklearnim stanicama utvrđuju se promjene koje su se nakupile tijekom godina u matičnim stanicama i cirkulirajućim limfocitima (46).

Test je s godinama postao sveobuhvatna metoda koja se koristi za mjerenje oštećenja i pogrešnoga popravka DNA, kromosomske nestabilnosti, mitotičke abnormalnosti, nekrozu, apoptozu, citostazu, gubitak i nerazdvajanje kromosoma. Osim toga, omogućuje izravno i neizravno mjerenje različitih aspekata staničnih i jezgrinih poremećaja poput lomova kromosoma, prisustva acentričnih kromosomskih fragmenta i asimetrične kromosomske preraspodjele (MN-i ili nukleoplazmatski mostovi (NPB) uz MN-e iz acentričnih kromosomskih fragmenata), fuzije telomera (NPB-i bez MN-a), nepravilne segregacije kromosoma zbog oštećenja diobenoga vretena, kinetohora ili nefunkcionalnosti kontrolne točke staničnoga ciklusa, izdvajanja amplificirane DNA (nuklearni pupovi, NBUD), hipometilacije DNA (47). Upravo se zato smatra jednim od najsvestranijih citogenetičkih testova (7).

1.4.1. Prednosti i ograničenja mikronukleus-testa

Mikronukleus-test ne zahtijeva analizu kromosoma u metafazi niti se smatra alternativnom metodom klasične citogenetike. Mikronukleus-testom može se analizirati bilo koja populacija stanica koje se dijele neovisno o njenu kariotipu (48). Učestala primjena MNT-a posljedica je pouzdanosti, jednostavnosti izvedbe i ekonomske prihvatljivosti testa, u odnosu na metodu analize kromosomskih aberacija. Kako bi se uklonila odstupanja uslijed primjene različitih protokola između pojedinih laboratorija, u okviru međunarodnoga projekta HUMN (engl. Human MicroNucleus) provedena je standardizacija MNT-a te su prepoznati čimbenici koji mogu utjecati na njegove rezultate. Glavni ciljevi projekta HUMN bili su usporedba protokola koji se trenutačno koriste, usporedba referentnih vrijednosti za učestalost MN-a različitih laboratorija, provođenje istraživanja u svrhu utvrđivanja povezanosti učestalosti MN-a s različitim bolestima kao što su maligne bolesti i genetski sindromi te ovisnosti o dobi i spolu (48).

Standardnim MNT-om, kod kojega se za analizu stanica koristi svjetlosni mikroskop, ne može se odrediti porijeklo MN-a. Budući da se ne mogu razlikovati MN-i koji sadrže cijele kromosome od onih koji su nastali od acentričnih kromosomskih fragmenata, potrebno je koristiti dodatne metode, čime se povećava specifičnost MNT-a. Primjenom antikinetohornih antitijela, mogu se prepoznati zaostali kromosomi, ali se ne može utvrditi gubitak kromosoma koji nastaje zbog odsutnosti kinetohora na promijenjenim centromerama. Zato je poželjnije korištenje fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) kojom se uz primjenu pancentromerne sonde detektiraju pericentromerna područja kromosoma, što omogućuje pouzdanu identifikaciju prisutnosti cijelih kromosoma u MN-ima. Moguća je i analiza nejednake raspodjele homolognih parova kromosoma upotrebom centromernih sondi koje su specifične za jedinstveni kromosom. U slučaju da su MN-i negativni za centromere i kinetohore smatra se da sadrže acentrične fragmente (49).

1.4.2. Referentne vrijednosti mikronukleus-testa

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu objavio je istraživanje s normalnim i graničnim vrijednostima mikronukleus-testa na limfocitima periferne krvi u ispitanika opće populacije Republike Hrvatske. Prema rezultatima istraživanja na uzorku od

200 zdravih ispitanika obaju spolova utvrđeno je prosječno 7 MN-a na 1000 binuklearnih stanica, a granična vrijednost iznosi 12,5 MN-a na 1000 limfocita (50).

U navedenom istraživanju Kopjar i sur. (50) uključuju zdravu populaciju dobnih skupina od 20. do 61. godine života. Stoga se kod istraživanja koja obuhvaćaju specifičnu populaciju osoba, kao što je bilo i naše istraživanje u kojem su sudjelovali roditelji mlađi od 35 godina, ne mogu primijeniti granične vrijednosti MN-a ovoga istraživanja, već je za usporedbu rezultata potrebno kreirati odgovarajuću usporednu skupinu.

1.5. Mikronukleusi

1.5.1. Otkriće i primjena analize mikronukleusa

Mikronukleuse su otkrili i prvi put opisali u krvi mačaka i štakora krajem 19. stoljeća dvojica hematologa, Amerikanac William Howell i Francuz Justin Jolly. Ove male inkluzije, prozvane prema dvojcu koji ih je otkrio Howell-Jollyjeva tjelešca, pronađene su i u nezrelim eritrocitima periferne krvi anemičnih pacijenata te je njihov nastanak kasnije povezan s manjkom vitamina B12 i folata (49, 51, 52).

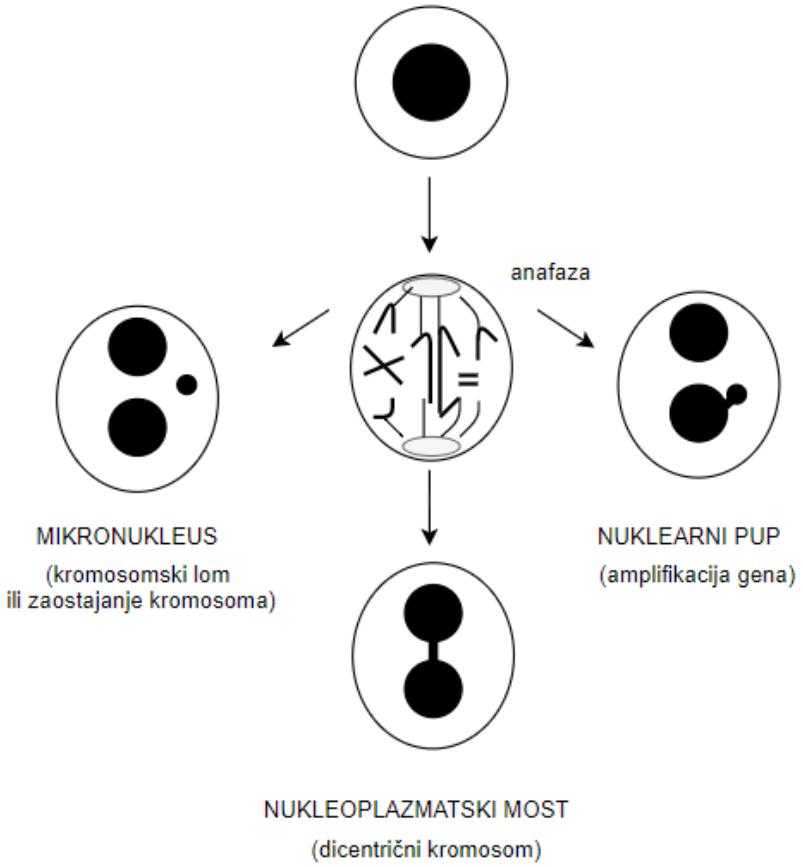
Prvim pokušajem kvantifikacije kromosomske pogreške smatra se utvrđivanje učestalosti stanica s mikronukleusima u odnosu na normalne stanice 1959. godine, kada je otkriveno da gama zrake induciraju nastanak MN-a u korijenskim vrhovima graha. Procijenjeno je da je oko 60 % kromosomskih fragmenata doprinijelo formiranju mikronukleusa (51).

Koristeći koštanu srž i perifernu krv kineskoga hrčka tretiranu jakim alkilirajućim agensom-trenimonom, 1970. godine razvijena je metoda za procjenu učestalosti mikronukleusa u eritrocitima u odnosu na normalne eritrocite koji gube jezgru tijekom hematopoeze. Ova je metoda prozvana mikronukleus-testom, čime je i osmišljena osnova današnjega mikronukleus-testa (51).

Nekoliko godina kasnije metoda je zaživjela i na kultiviranim ljudskim limfocitima, a predstavljena je i modifikacija s citohalazinom B koja se i trenutačno koristi (49, 51).

1.5.2. Podrijetlo mikronukleusa

Mikronukleusi su podrijetlom od acentričnih kromosomskih fragmenata ili cijelih kromosoma koji se nisu uspjeli ugraditi u jezgre stanica kćeri tijekom mitotske diobe. Ti zaostali kromosomski fragmenti ili cijeli kromosomi obavijaju se membranom i tvore strukture morfološki slične jezgri, ali manje veličine (47, 53) (slika 2). Promjer im varira od 1/16 do 1/3 glavne jezgre. Nastaju uslijed lomova kromosoma, nepravilnoga ili pogrešnoga popravka DNA ili nepravilne segregacije kromosoma uslijed mitotičkih pogrešaka. Sve ove događaje može uzrokovati oksidativni stres, izlaganje klastogenima i aneugenima, genetski poremećaji u kontrolnoj točki staničnoga ciklusa ili genima koji sudjeluju u popravku DNA ili nedostatak hranjivih tvari neophodnih kao izvora kofaktora koji sudjeluju u sintezi DNA (47, 54, 55).



Slika 2. Shematski prikaz nastanka mikronukleusa, nukleoplazmatskog mosta i nuklearnog pupa

1.5.3. Mikronukleusi nastali od acentričnih kromosomskih ili kromatidnih fragmenata

Acentrični kromosomski fragmenti nastaju različitim mehanizmima. Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća pokazalo se da pogrešno popravljanje dvostrukih lomova DNA može dovesti do simetričnih i asimetričnih izmjena kromatida i kromosoma ili njihovih fragmenata. Mali udio acentričnih kromosomskih fragmenata može proizaći iz nepopravljenih dvostrukih lomova DNA. To se događa samo ako količina dvostrukih lomova DNA prekorači kapacitet obnove stanica u diobi. Navedeno se obično dešava uslijed neadekvatnoga popravka dvostrukih lomova DNA zbog pogrešaka u procesu homologne rekombinacije ili uslijed poremećene funkcije enzima za popravak u procesu nehomolognoga spajanja krajeva. Drugi mogući mehanizam nastanka MN-a iz acentričnih kromosomskih fragmenata je nastanak dvostrukih lomova DNA kao rezultat popravka izrezivanjem i ugradnjom krive baze (npr. uracil), a moguć je i nastanak iz fragmentiranoga materijala pri pucanju NPB-a u telofazi (47, 49, 53).

1.5.4. Mikronukleusi podrijetlom od cijelih kromosoma

Jedan je od mogućih mehanizama zaslužnih za nerazdvajanje cijelih kromosoma u anafazi, čime dolazi do stvaranja MN-a, hipometilacija citozina u ponavljajućim sekvencama centromernih i pericentromernih područja kromosoma. Vezanje proteina kinetohore na centromere ovisi o metilacijskome statusu citozina i histona. Smanjenje integriteta heterokromatina utječe na vezanje mikrotubula na kromosome i njihovu međusobnu napetost. Upravo mutacije koje dovode do defekata u interakciji mikrotubula i kinetohora uzrokuju nastanak MN-a uslijed gubitka kromosoma u anafazi. Osim toga, povećani broj MN-a povezuje se i uz pogreške centromera, kontrolne točke mitoze i diobenoga vretena (47, 53). Učestalost MN-a u limfocitima povećava se s dobi i nešto je viša u žena nego u muškaraca. Veći broj MN-a kod žena objašnjava se većom učestalošću nerazdvajanja kromosoma X.

1.5.5. Mikronukleusi nastali iz ekstrakromosomskih elemenata

Mikronukleusi ne nastaju samo iz kromosomskoga materijala već i iz ekstrakromosomskih elemenata, tzv. dvostrukih minuta (DM). Dvostruke minute nastaju kao posljedica amplifikacije gena, a najčešće ih nalazimo u ljudskim stanicama raka. Acentrične DM-e segregiraju u stanice kćeri „držeći“ se za krakove kromosoma tijekom mitoze. Tijekom G1 faze oni se nalaze na vanjskome rubu jezgre i premještaju se u unutrašnjost tijekom S faze, kada se i sami repliciraju. Uočeno je kako niske koncentracije hidroksiuree induciraju oštećenja DNA na mjestu replikacije. Uklanjanjem hidroksiuree, oštećenja na kraku kromosoma brzo se popravljaju, ali poteškoće u popravljanju oštećenja DNA kod DM-a uzrokuju njihovu agregaciju. Agregirani DM-i zaostaju za kromosomima koji se razdvajaju u anafazi te na taj način stvaraju DM-tip mikronukleusa. Ovaj je mehanizam primjenjiv i na ostale ekstrakromosomske elemente jer se mnoge vrste virusnih nuklearnih plazmida drže za krakove kromosoma tijekom metafaze (56, 57, 58, 59).

1.5.6. Utjecaj okolišnih čimbenika i životnih navika na nastanak mikronukleusa

Postoje brojne genotoksične tvari koje induciraju nastanak MN-a, a prema mehanizmu djelovanja dijele se u dvije skupine: klastogene koji uzrokuju kromosomske lomove i aneugene koji djeluju na staničnu diobu te funkciju diobenoga aparata uzrokujući nepravilno razdvajanje kromosoma. Ovisno od agensa koji će uzrokovati nastanak MN-a, sadržajno će se MN-i razlikovati, pa će nastati ili iz acentričnih fragmenata ili cijelih kromosoma. Jedan od primjera genotoksična učinka je ionizirajuće zračenje jer uzrokuje oštećenje DNA (49).

Svakodnevne životne navike pojedinca također mogu utjecati na porast broja MN-a. Proučavanje utjecaja pušenja duhana na nastanak MN-a donijelo je podijeljene rezultate među istraživačima. Iako su neka istraživanja pokazala da nema povezanosti između pušenja cigareta i većeg broja MN-a, dio ih je uočio povezanost samo kod konzumacije većeg broja cigareta dnevno (48), dok su drugi uočili da postoji razlika u dobnim skupinama između pušača (60). Povezanost konzumacije alkohola s nastankom MN-a nije utvrđena (48).

Zabilježen je i utjecaj različitih bolesti na razinu MN-a. Povećan broj MN-a utvrđen je kod pacijenata s policističnim sindromom jajnika, dijabetesom tipa 2 i metaboličkim poremećajima kao što je pretilost. Isto tako velik broj MN-a nađen je i kod kardiovaskularnih pacijenata (61).

Izloženost pesticidima i lijekovima također ima utjecaj na stvaranje MN-a. Široka rasprostranjenost pesticida ima negativne posljedice te može dovesti do hematoloških i neuroloških bolesti (62), stvaranja genetskih oštećenja, karcinoma i drugih kroničnih bolesti (63). Budući da je dokazano da izlaganje većim količinama pesticida kroz dulje vrijeme ima negativan utjecaj, iz ovoga su istraživanja isključeni ispitanici koji su na radnome mjestu bili izloženi pesticidima. Isto je tako kod uporabe brojnih lijekova, posebice citostatika, dokazan genotoksični učinak.

1.6. Nukleoplazmatski mostovi

Nukleoplazmatski mostovi (NPB) su kontinuirane strukture koje sadrže DNA i koje povezuju jezgre u binuklearnoj stanici te su pokazatelj prisutnosti dicentrika ili pogrešne segregacije kromosoma (64). Nastaju tijekom anafaze kada se centromere dicentričnih kromosoma povlače na suprotne polove stanice. U slučaju da ne dođe do pucanja anafaznoga mosta, jezgrina membrana okružuje anafazni most te na taj način nastaje NPB. Nukleoplazmatski mostovi obično se lome tijekom citokineze, ali u slučaju korištenja sredstava koje blokiraju citokinezu (npr. citohalazin B) mogu se akumulirati u stanicama (47, 53, 65, 66).

Širina nukleoplazmatskoga mosta može značajno varirati, ali obično ne prelazi 1/4 promjera jezgre unutar stanice. Nukleoplazmatski most ima iste karakteristike bojenja glavnih jezgri. U vrlo rijetkim slučajevima više od jedan nukleoplazmatski most može se naći u binuklearnoj stanici. Stanica s nukleoplazmatskim mostom često sadrži jedan ili više mikronukleusa (47, 67).

1.7. Nuklearni pupovi

Nuklearni pupovi (NBUD) malene su strukture morfološki slične MN-ima, samo što su za razliku od njih nukleoplazmatskim materijalom povezani s jezgrom. Opaženi su kod kultura uzgojenih u jako selektivnim uvjetima, čime je inducirana amplifikacija gena, te uz manjak folne kiseline. Pomoću *in vitro* pokusa sa stanicama sisavaca utvrđeno je da je amplifikacija DNA lokalizirana na specifična mjesta na periferiji jezgre i eliminirana putem nuklearnoga pupanja u vidu MN-a tijekom S faze. Trajanje procesa nuklearnoga pupanja i izdvajanje

rezultirajućega MN-a iz stanica detaljno su proučavani pomoću metode vremenskoga snimanja živih stanica (47).

Osim morfologije, djelomično su i različitoga mehaničkog podrijetla u usporedbi s MN-ima. Mikronukleusi u binuklearnim limfocitima ponajprije potječu od cijelih kromosoma i terminalnih acentričnih fragmenata zaostalih tijekom mitoze, dok većina NBUD-ova potječe iz intersticijskih ili terminalnih amplificiranih fragmenata. Pupovi na taj način mogu biti prikaz zarobljene DNA unutar jezgrine membrane koja je ostala u citoplazmi nakon stanične diobe ili iz viška ekstrudirane DNA iz jezgre (47).

1.8. Indeks diobe jezgara

Indeks diobe jezgara (NDI) je marker stanične proliferacije u kulturi stanica te se smatra mjerom citotoksičnosti. Smatra se da će stanice s većim kromosomskim oštećenjima umrijeti prije stanične diobe ili je mala vjerojatnost da će ući u tu fazu. Najniža vrijednost NDI-ja je 1.0 kada se stanice ne podijele tijekom bloka citokineze, već ostaju mononuklearne. Kad sve stanice završe jednu podjelu, tada je vrijednost NDI-ja 2.0 i sve stanice su binuklearne. Vrijednost NDI-ja veća od 2.0 označava da je došlo do više od jedne diobe stanica i stanice su multinuklearne (60).

2. HIPOTEZA

Hipoteza je ovoga istraživanja da bi se proučavanjem učestalosti mikronukleusa u parova mlađe životne dobi koji su imali trudnoću sa slobodnim oblikom Downova sindroma mogla utvrditi sklonost nepravilnome razdvajanju kromosoma tijekom mitotske diobe limfocita periferne krvi. Pretpostavljajući da do nerazdvajanja kromosoma dolazi i u spolnim stanicama, učestalost mikronukleusa mogla bi poslužiti kao biomarker za procjenu rizika nastajanja numeričkih kromosomskih aberacija u idućim trudnoćama.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati mogućnost korištenja mikronukleus-testa za procjenu rizika nastajanja brojčanih kromosomskih abnormalnosti u parova kod kojih su žene u dobi manjoj od 35 godina imale trudnoću ili dijete rođeno s trisomijom 21.
2. Odrediti postoji li među parovima u ispitivanoj skupini povećana sklonost nerazdvajanju kromosoma za vrijeme mitotske diobe limfocita periferne krvi korištenjem mikronukleus-testa.
3. Usporediti učestalosti mikronukleusa u binuklearnim i mononuklearnim stanicama između parova ispitivane i usporedne skupine.
4. Usporediti učestalosti nukleoplazmatskih mostova (NPB) i nuklearnih pupova (NBUD) na 1000 binuklearnih stanica u parova ispitivane skupine u odnosu na usporednu skupinu.
5. Usporediti vrijednosti indeksa diobe jezgara (NDI) u perifernim krvima parova ispitivane skupine u odnosu na usporednu skupinu.

4. ISPITANICI I METODE

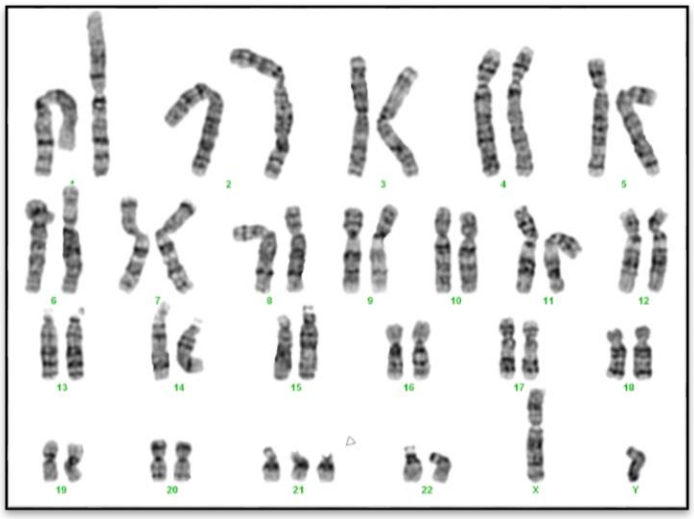
4.1. Ustroj studije

Ovo istraživanje organizirano je kao prospektivna poredbena studija. Istraživanje je provedeno u Odjelu za laboratorijsku citogenetiku Klinike za ginekologiju i porodništvo KB "Sveti Duh" u razdoblju od siječnja 2018. godine do srpnja 2018. godine. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice “Sveti Duh”, Zagreb.

4.2. Ispitanici

U istraživanje smo uključili 40 roditelja (20 parova), odnosno 20 muškaraca i 20 žena.

U ispitivanoj skupini nalazilo se 20 roditelja, 10 parova majki i očeva kod kojih su žene u dobi mlađoj od 35 godina imale trudnoću ili dijete rođeno sa slobodnim oblikom DS-a. U svih parova ispitivane skupine trisomija 21 utvrđena je u okviru rutinskoga rada Odjela za laboratorijsku citogenetiku. Citogenetska analiza stanica korionskih resica ili plodove vode (slika 3) provedena je u slučaju prenatalne dijagnostike ili kariotipizacije perifernih krvi u djece s DS-om. Roditelji ispitivane skupine u istraživanju su sudjelovali u razdoblju od godinu dana nakon dijagnosticirane trudnoće s DS-om.



Slika 3. Kariotip muškoga ploda sa slobodnim oblikom Downova sindroma dobiven citogenetskom analizom kulture stanica plodove vode

Izvor: Iz arhive Odjela za laboratorijsku citogenetiku KB "Sveti Duh"

Usporedna skupina obuhvatila je jednak broj ispitanika, 20 roditelja (10 parova) koji imaju najmanje dva uredna poroda, bez povijesti spontanih pobačaja ili bilo kakvih reproduktivnih problema. Obiteljska anamneza na kromosomske i genske poremećaje im je negativna. Roditelji usporedne skupine odabrani su među parovima koji su na Klinici za ginekologiju i porodništvo KB „Sveti Duh“ kontrolirali trudnoću. Životna dob majki i očeva usporedne skupine usklađena je sa starosnom dobi parova ispitivane skupine.

Roditelji obiju skupina ispunili su anketni upitnik u kojem se navode prehrambene i druge životne navike, medicinska i reproduktivna anamneza, izloženost zračenju, konzumacija lijekova. Ispitanici kod kojih je utvrđena prisutnost neke kronične bolesti, izloženost pesticidima ili herbicidima, X-zračenju u posljednjih godinu dana, prisutnost akutne infekcije ili uzimanje određenih lijekova u posljednjih godinu dana isključeni su iz daljnjega istraživanja.

4.3. Metode

Nakon potpisivanja informiranoga pristanka ispitanicima se izvadilo po 3 ml krvi u epruvetu s antikoagulansom Na-heparinom. Iz uzoraka periferne krvi određivala se sklonost nepravilnom razdvajanju kromosoma tijekom mitotske diobe u limfocitima primjenom mikronukleus-testa.

Proveli smo mikronukleus-test na limfocitima periferne krvi uz zaustavljenu citokinezu prema prethodno opisanome protokolu (67). Uzorak krvi svakoga ispitanika uzgajao se u dvije odvojene kulture uz dodatak citohalazina B kao blokatora citokineze. Analiza MN-a provodila se prema postupnicama kolaboracijskoga projekta HUMN (48).

Korištene otopine i reagensi:

- Kompletni medij za kultivaciju periferne krvi (Gibco, PB-Max karyotyping medium kat. br. 12557-013)
- Cytochalasin B (Sigma, Ready Made Solution, 10 mg/ml in DMSO, kat. br. C2743)
- Ledena octena kiselina (Merck, Acetic acid (glacial) 100 %, kat. br. 1000631000)
- Metanol (Merck, kat. br. 1060092500)
- Giemsa boja (Merck, kat. br. 1.09204.2500)
- Fosfatni pufer (Gibco, "Gurr Buffer Tablets", kat. br. 10582-013)

4.3.1. Kultivacija

Uzorak krvi svakoga ispitanika nasadi se u dvije odvojene kulture (epruvete) tako da se u 5 ml kompletnoga hraništa doda 0.5 ml pune krvi (oko 10 kapi) i protrese. Tako pripremljena kultura inkubira se 72 sata na 37 ℃ uz 5 % CO_2. Nakon 44 sata u kulture se doda 1,5 µl citohalazina B (konačna koncentracija 3 µl/ml) te se nastavi inkubirati do 72 sata.

4.3.2. Prekid kulture

Nakon 72 sata inkubacije uzorci se centrifugiraju sedam minuta na 800 okretaja. Nakon centrifugiranja Pasteurovim pipetama uklanja se nadtalog, a dobiveni talog ručno se razbije protresanjem epruveta. Na talog se polako doda 5 ml fiksativa, metanol i octena kiselina u omjeru 3:1, epruveta se protrese da bi se razbio talog i ponovno se centrifugira sedam minuta na 800 okretaja. Postupak ispiranja i fiksacije stanične suspenzije ponovi se još tri puta te se kod posljednjega odvajanja nadtaloga u epruvetama ostavi oko 0.4 ml suspenzije. Dobivena stanična suspenzija čuva se na +4 ℃ do sljedećega dana kada slijedi izrada preparata.

4.3.3. Izrada preparata

Sljedećega se dana na suha predmetna stakalca pipetama nakapa jedna do dvije kapi dobivene suspenzije te se ostavi sušiti preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon toga preparati se boje u 20 %-tnoj Giemse 10 minuta, ispiru destiliranom vodom i suše na zraku.

4.3.4. Analiza preparata

Pripremljeni preparati analiziraju se svjetlosnim mikroskopom. Najprije se na povećanju 100x određuje ima li dovoljno binuklearnih limfocita s očuvanom citoplazmom za analizu. Nakon toga, promjenom objektiva na veća povećanja (600x i 1000x) uz dodatak imerzijskog ulja analiziraju se stanice pogodne za analizu. Kod svakoga uzorka analizira se 1000 binuklearnih stanica, po 500 stanica iz dvije odvojene kulture.

Analizom svakoga uzorka određuje se:

- učestalost MN-a na 1000 binuklearnih stanica
- učestalost MN-a na 1000 mononuklearnih stanica
- učestalost binuklearnih stanica s MN-ima na 1000 stanica
- raspodjela binuklearnih stanica s MN-ima, odnosno broj stanica s jednim, dva i više MN-a
- učestalost NPB-a na 1000 binuklearnih stanica
- učestalost NBUD-a na 1000 binuklearnih stanica
- indeks diobe jezgara (NDI).

Kriterij za analizu binuklearnih stanica:

- binuklearne stanice s očuvanom citoplazmom
- jezgre približno jednake veličine i obojenosti
- jezgre im se mogu dodirivati, ali se ne smiju preklapati.

Kriterij za analizu mikronukleusa:

- veličina mikronukleusa između 1/16 i 1/3 promjera glavne jezgre
- intenzitet boje mikronukleusa jednak intenzitetu boje glavne jezgre
- mogu dodirivati glavnu jezgru, ali se ne preklapaju.

Kriterij za nukleoplazmatske mostove:

- ne prelazi 1/4 promjera glavne jezgre
- intenzitet boje NPB-a jednak intenzitetu boja glavne jezgre
- stanica može, ali ne mora sadržavati mikronukleuse.

4.3.5. Indeks diobe jezgara

U ovome istraživanju uspoređene su vrijednosti NDI-ja limfocita periferne krvi između ispitivane i usporedne skupine. Na 500 stanica odredi se zastupljenost stanica s jednom, dvije, tri i više jezgara te se vrijednost NDI-ja računa primjenom formule:

$$NDI = (M1 + 2xM2 + 3xM3 + 4xM4) / N,$$

gdje M1-M4 predstavljaju brojeve stanica s jednom, dvije, tri i četiri jezgre, a N ukupan broj analiziranih stanica.

4.4. Statističke metode

Za osnovnu obradu korištena je deskriptivna statistika. Rezultati za varijable mjerene intervalnom ljestvicom prikazane su kao aritmetička sredina, standardna devijacija te interkvartilni raspon. Normalnost razdiobe za varijable mjerene intervalnom ljestvicom ispitane su Shapiro-Wilkovim testom. Za usporedbu ispitivane i usporedne skupine normalno distribuiranih varijabli koristio se Studentov t-test, a za varijable čija distribucija ne slijedi normalnu razdiobu korišten je Mann-Whitneyev U-test. Raspodjela među podskupinama majki i očeva ispitivane i usporedne skupine analizirana je Kruskal-Wallis analizom varijance (ANOVA). Za utvrđivanje povezanosti između varijabli određenih mikronukleus-testom koristio se Spearmanov korelacijski test. Za ukupan broj MN-a prikazana je i izračunata površina ispod ROC krivulje. Statistička analiza provedena je pomoću statističkoga programa MedCalc 17.2. (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium). Statistička značajnost postavljena je na 5 %, $P < 0,05$.

5. REZULTATI

U istraživanju je sudjelovalo 20 parova mlađe životne dobi raspoređenih u dvije skupine. U ispitivanoj skupini nalazilo se 10 parova roditelja od kojih je kod devet majki prenatalno bila dijagnosticirana trudnoća s trisomijom 21, dok je jedan par imao dijete rođeno s DS-om. Sve majke imale su po jednu trudnoću s DS-om, a osam ih je do sada imalo po jedan inducirani pobačaj (karakteristike trudnoća prikazane su u tablici 1). Kariotipizacijom utvrđeno je da su četiri ploda bila ženskoga spola, a šest muškoga spola.

Kriterij za odabir usporedne skupine bio je da se odabiru parovi kod kojih u anamnezi nema spontanih pobačaja, genetskih poremećaja, a imaju najmanje dvoje živorođene zdrave djece. U usporednoj je skupini devet majki imalo po dvije uredne trudnoće s jednako toliko poroda, a samo je jedna majka imala tri trudnoće koje su također rezultirale urednim porodom.

Tablica 1. Prikaz ishoda trudnoća između ispitivane i usporedne skupine.

	Ispitivana skupina	**Usporedna skupina**
Broj trudnoća aritmetička sredina (SD) (raspon)	2,1 (1,20) (1 - 5)	2,1 (0,32) (2 - 3)
Broj spontanih pobačaja aritmetička sredina (SD) (raspon)	0,2 (0,63) (0 - 2)	0 (0)
Broj induciranih pobačaja aritmetička sredina (SD) (raspon)	0,8 (0,42) (0 - 1)	0 (0)
Broj poroda aritmetička sredina (SD) (raspon)	1,1 (0,57) (0 - 2)	2,1 (0,32) (2 - 3)

SD – standardna devijacija

5.1. Medicinska anamneza, životne navike ispitanika i izloženost okolišnim čimbenicima

U ispitivanoj skupini jedan roditelj ima poremećaj štitne žlijezde, jedan hipertenziju, a jedan psorijazu i hipertenziju. U usporednoj skupini samo je jedna majka imala poremećaj štitne žlijezde u trudnoći. S obzirom na navedene dijagnoze, ispitanici koriste sukladno tome i propisane lijekove.

U obje skupine imamo jednak broj aktivnih pušača, svega tri osobe, a što se tiče konzumacije alkohola i droga, ispitanici su potvrdili da ne konzumiraju nikakve droge ni alkohol u većim količinama.

Izloženost štetnim okolišnim čimbenicima podjednaka je u ispitivanoj i usporednoj skupini te se uglavnom odnosila na izloženost na radnome mjestu. Pri tome se u ispitivanoj skupini nalazi dvoje zdravstvenih djelatnika, a u usporednoj skupini troje, koji su za vrijeme svakodnevnoga rada izloženi biološkim materijalima te različitim kemikalijama.

5.2. Životna dob roditelja

Aritmetička sredina životne dobi roditelja ispitivane skupine je 33,2 godine, a aritmetička sredina životne dobi usporedne skupine 33,3 godine. Kao što se može vidjeti iz priložene tablice (tablica 2), Mann-Whitney U korelacijskim-testom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u dobi roditelja između ispitivane i usporedne skupine ($U = 200$; $z = 0,014$; $P = 0,989$), kao ni među podskupinama majki i očeva ispitivane i usporedne skupine (Kruskal Wallis test, $P = 0,240$).

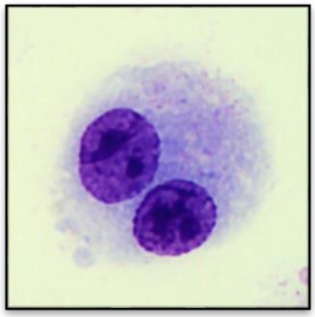
Tablica 2. Usporedba dobi između ispitivane i usporedne skupine.

Skupina	N	Dob (raspon)	25. perc	Medijan	75. perc	P
Ispitivana skupina	20	29 - 35	31,5	33,5	35	0,989
Usporedna skupina	20	28 - 36	32,5	33,5	35	
Očevi						
Ispitivana skupina	10	29 - 35	33	35	35	0,937
Usporedna skupina	10	29 - 36	33	34,5	35	
Majke						
Ispitivana skupina	10	30 - 35	31	32,5	35	0,849
Usporedna skupina	10	28 - 35	32	33	34	

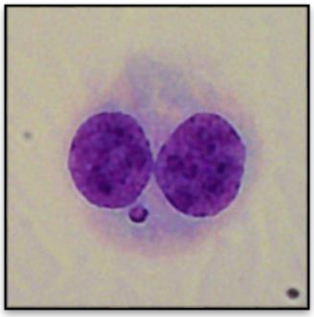
N - broj ispitanika, P - prema Mann-Whitney U-testu

5.3. Rezultati mikronukleus-testa

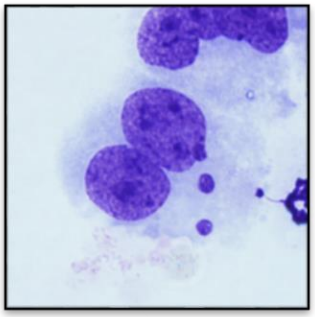
U ispitivanoj i usporednoj skupini određena je učestalost MN-a na 1000 mononuklearnih i 1000 binuklearnih stanica te učestalost NPB-ova i NBUD-ova na 1000 binuklearnih stanica. Svi navedeni parametri uspoređeni su između obiju skupina i određena je statistička značajnost za svaki pojedini parametar. Na slici 4 prikazani su rezultati MNT-a u ispitivanoj skupini.



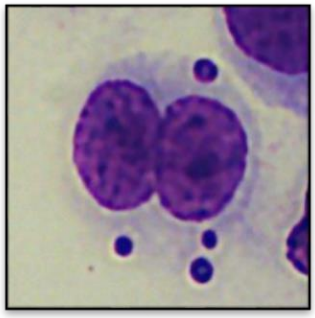
a) binuklearna stanica



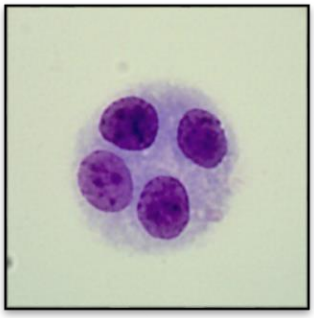
b) binuklearna stanica s mikronukleusom



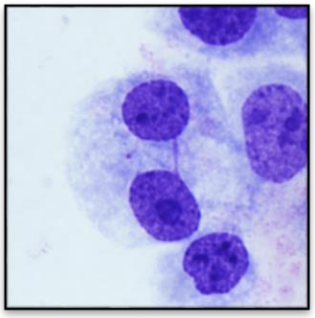
c) binuklearna stanica s tri mikronukleusa



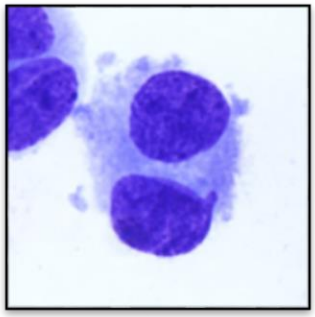
d) binuklearna stanica s četiri mikronukleusa



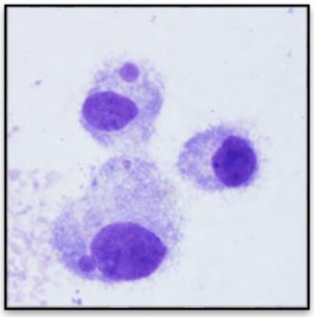
e) tetranuklearna stanica



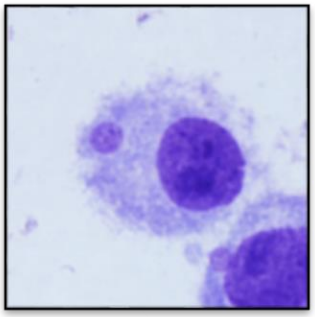
f) binuklearna stanica s nukleoplazmatskim mostom



g) binuklearna stanica s nuklearnim pupom



h) dvije mononuklearne stanice s jednim mikronukleusom i jedna mononuklearna stanica



i) mononuklearna stanica s mikronukleusom

Slika 4. Prikaz rezultata mikronukleus-testa u ispitivanoj skupini

5.3.1. Učestalost mikronukleusa

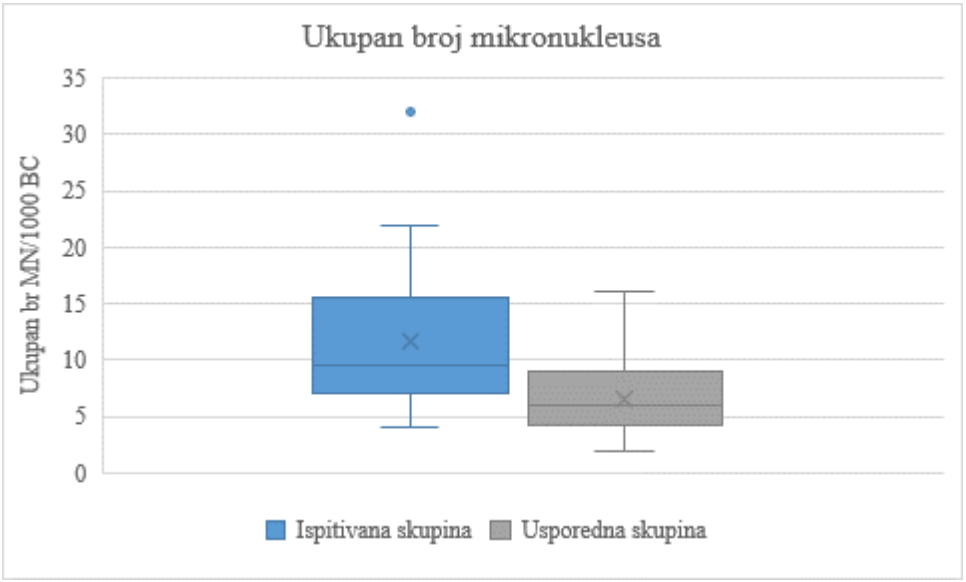
U tablici 3 prikazana je učestalost MN-a na 1000 binuklearnih stanica. U ispitivanoj skupini utvrđena je veća učestalost MN-a u odnosu na usporednu skupinu te je Mann-Whitney U-testom utvrđena statistički značajna razlika (U = 90; Z = 2,982; P = 0,002). Na slici 5 prikazan je odnos učestalosti MN-a između skupina. Najveći broj MN-a nađen je kod majki u ispitivanoj skupini, (32 MN) dok je taj broj kod ispitivane skupine očeva gotovo dvostruko manji (17 MN) (slike 6 i 7).

Tablica 3. Prikaz učestalosti mikronukleusa na 1000 binuklearnih stanica.

Ukupan broj MN	**Aritmetička sredina**	**SD**	**Min**	**Max**	**25. perc.**	**Medijan**	**75. perc.**
Ispitivana skupina	11,75	6,96	4	32	7	9,5	15
Usporedna skupina	6,60	3,20	2	16	4,5	6	9
Očevi							
Ispitivana skupina	9,70	4,50	4	17	6	8,5	14
Usporedna skupina	5,80	2,78	2	10	4	5	9
Majke							
Ispitivana skupina	13,80	8,52	6	32	8	10	21
Usporedna skupina	7,40	3,53	4	16	5	6	9

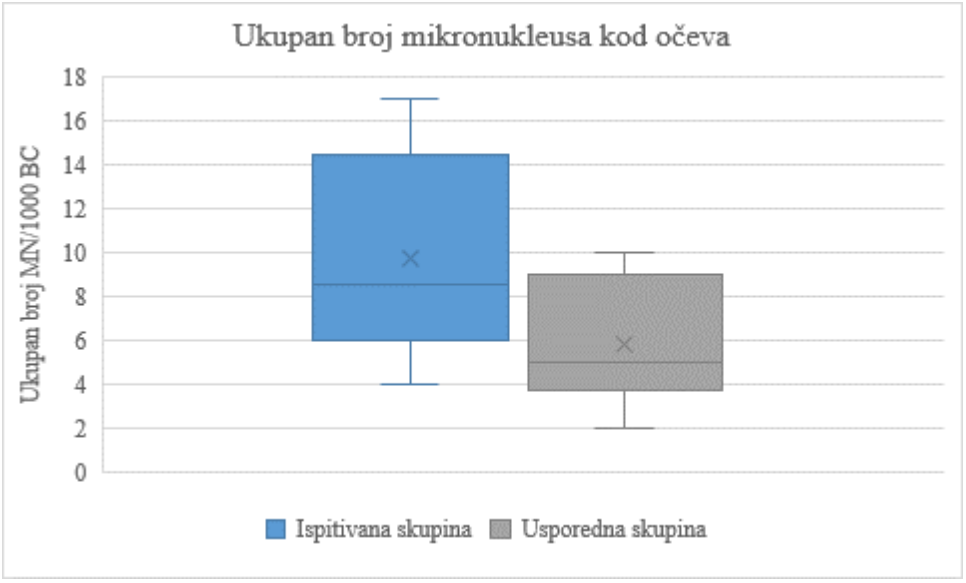
SD - standardna devijacija, MN - mikronukleus

Kruskal-Wallis testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u učestalosti MN-a između podskupina majki i očeva ispitivane i usporedne skupine (P = 0,038). Zasebnom usporedbom utvrđena je statistički značajna razlika u učestalosti MN-a u podskupini majki ispitivane skupine u odnosu na usporednu skupinu (Mann-Whitney U-test: U = 19; Z = 2,248; P = 0,019). U podskupini očeva ispitivane skupine uočena je veća vrijednost učestalosti MN-a, no razlika u odnosu na usporednu skupinu nije bila statistički značajna (Mann-Whitney U-test: U = 24; Z = 1,967; P = 0,05).



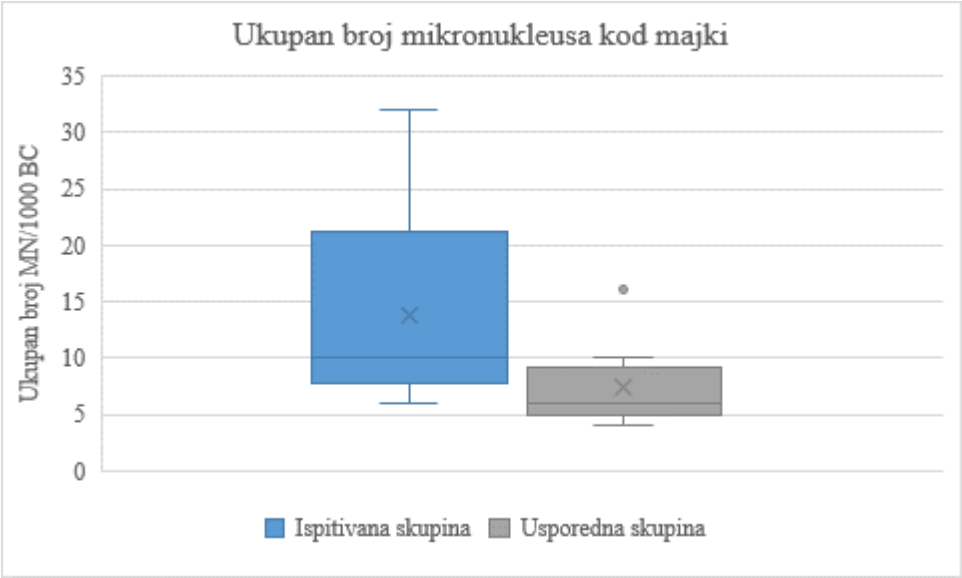
MN - mikronukleus, BC - binuklearne stanice

Slika 5. Usporedba učestalosti mikronukleusa između roditelja ispitivane i usporedne skupine.



MN – mikronukleus, BC – binuklearne stanice

Slika 6. Usporedba učestalosti mikronukleusa između očeva ispitivane i usporedne skupine.



MN – mikronukleus, BC – binuklearne stanice

Slika 7. Usporedba učestalosti mikronukleusa između majki ispitivane i usporedne skupine.

5.3.2. Učestalost binuklearnih stanica s mikronukleusima te raspodjela binuklearnih stanica s mikronukleusima

Aritmetička sredina broja binuklearnih stanica s MN-ima u ispitivanoj skupini je 9,65 sa standardnom devijacijom SD = 5,06, a u usporednoj je 6,15; SD = 2,74. Utvrđena je statistički značajna razlika između ovih skupina (Mann-Whitney U-test: U = 102,5; Z = 2,648; P = 0,008) kao i u stanicama s dva MN-a (aritmetička sredina u ispitivanoj skupini: 1,05; SD = 0,89, u usporednoj skupini: 0,4; SD = 0,69, Mann-Whitney U- test: U = 115; Z = 2,466; P = 0,014). U broju stanica s jednim MN-om nisu utvrđene statistički značajne razlike među skupinama (aritmetička sredina za ispitivanu skupinu: 7,95; SD = 4,48, za usporednu skupinu: 5,8; SD = 2,35, Mann-Whitney U-test: U = 132; Z = 1,849; P = 0,064). Uspoređujući učestalost binuklearnih stanica s više mikronukleusa uočeno je da za razliku od ispitivane skupine u usporednoj skupini nisu uočene stanice s više MN-a (Tablica 4) te je utvrđena statistički značajna razlika među skupinama (Mann-Whitney U-test: U = 150; Z = 2,177; P = 0,030).

Tablica 4. Prikaz raspodjele binuklearnih stanica s različitim brojem mikronukleusa u ispitivanoj i usporednoj skupini te podskupinama majki i očeva.

	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	25. perc.	Medijan	75. perc.
Ispitivana skupina (N=20)							
Broj BC s 1 MN	7,95	4,48	0	20	5,5	6,5	10,5
Broj BC s 2 MN	1,05	0,89	0	3	0	1	2
Broj BC s više MN	0,35	0,67	0	2	0	0	0,5
Broj BC s MN	9,65	5,06	4	24	6	8	12,5
Usporedna skupina (N=20)							
Broj BC s 1 MN	5,80	2,35	2	12	4	5	7
Broj BC s 2 MN	0,40	0,68	0	2	0	0	1
Broj BC s više MN	0	0	0	0	0	0	0
Broj BC s MN	6,15	2,74	2	14	4,5	5	8
Ispitivana skupina majke (N=10)							
Broj BC s 1 MN	9,30	5,54	0	20	6	8	14
Broj BC s 2 MN	1,20	0,92	0	2	0	1,5	2
Broj BC s više MN	0,40	0,70	0	2	0	0	1
Broj BC s MN	11,50	5,95	6	24	7	8,5	17
Usporedna skupina majke (N=10)							
Broj BC s 1 MN	6,20	2,49	4	12	5	5,5	6
Broj BC s 2 MN	0,60	0,84	0	2	0	0	1
Broj BC s više MN	0	0	0	0	0	0	0
Broj BC s MN	6,80	2,94	4	14	5	6	8
Ispitivana skupina očevi (N=10)							
Broj BC s 1 MN	6,60	2,76	4	12	5	6	7
Broj BC s 2 MN	0,90	0,88	0	3	0	1	1
Broj BC s više MN	0,30	0,67	0	2	0	0	0
Broj BC s MN	7,80	3,33	4	14	6	6,5	9
Usporedna skupina očevi (N=10)							
Broj BC s 1 MN	5,40	2,27	2	9	4	5	7
Broj BC s 2 MN	0,20	0,42	0	1	0	0	0
Broj BC s više MN	0	0	0	0	0	0	0
Broj BC s MN	560	2,50	2	9	4	5	8

BC - binuklearne stanice, SD - standardna devijacija, N - broj ispitanika

5.3.3. Učestalost mikronukleusa u mononuklearnim stanicama, učestalost nukleoplazmatskih mostova i nuklearnih pupova

Učestalost NPB-a i NBUD-ova na 1000 binuklearnih stanica te učestalost MN-a na 1000 mononuklearnih stanica prikazana je u tablici 5. Unatoč većoj aritmetičkoj sredini NPB-a u ispitivanoj u odnosu na usporednu skupinu (0,95; SD = 1,10 prema 0,35 SD = 0,49), nije uočena statistički značajna razlika među ovim skupinama (Mann-Whitney U-test: U = 136; Z = 1,987; P = 0,058). Kruskal-Wallis testom nije uočena statistički značajna razlika ni u podskupinama očeva i majki ispitivane i usporedne skupine. Statistička značajnost također nije utvrđena ni za učestalost NBUD-ova između ispitivane i usporedne skupine (Mann-Whitney U-test: U = 189; Z = 0,351; P = 0,725) niti za učestalost MN-a u mononuklearnim stanicama (Mann-Whitney U-test: U = 151; Z = 1,356; P = 0,175).

Spearmanovim korelacijskim testom uočena je pozitivna korelacija između učestalosti MN-a u binuklearnim stanicama i NPB-a (ispitivana skupina: r = 0,73; P < 0,001; usporedna skupina: r = 0,50; P = 0,026) te između učestalosti MN-a u binuklearnim i MN-a u mononuklearnim stanicama (ispitivana skupina: r = 0,75; P < 0,001; usporedna skupina: r = 0,73; P < 0,001).

Tablica 5. Prikaz učestalosti nukleoplazmatskih mostova i nuklearnih pupova na 1000 binuklearnih stanica te učestalost mikronukleusa na 1000 mononuklearnih stanica.

	Aritmetička sredina	**SD**	**Min**	**Max**	**25. perc.**	**Medijan**	**75. perc.**
Ispitivana skupina (N=20)							
NPB	0,95	1,10	0	4	0	1	1
NBUD	0,60	1,10	0	4	0	0	1
Broj MN u MC	1,85	1,66	0	7	0,5	2	3
Usporedna skupina (N=20)							
NPB	0,35	0,49	0	1	0	0	1
NBUD	0,40	0,68	0	2	0	0	1
Broj MN u MC	1,20	110	0	4	0	1	2
Ispitivana skupina majke (N=10)							
NPB	1,20	1,32	0	4	0	1	1
NBUD	0,80	0,92	0	3	0	1	1
Broj MN u MC	2,20	2,04	0	7	1	2	3
Usporedna skupina majke (N=10)							
NPB	0,40	0,52	0	1	0	0	1
NBUD	0,60	0,84	0	2	0	0	1
Broj MN u MC	1,70	1,16	0	4	1	1,5	2
Ispitivana skupina očevi (N=10)							
NPB	0,70	0,82	0	2	0	0,5	1
NBUD	0,40	1,26	0	4	0	0	0
Broj MN u MC	1,50	1,18	0	3	0	2	2
Usporedna skupina očevi (N=10)							
NPB	0,30	0,48	0	1	0	0	1
NBUD	0,20	0,42	0	1	0	0	0
Broj MN u MC	0,70	0,82	0	2	0	0,5	1

SD - standardna devijacija, N - broj ispitanika, MC - mononuklearne stanice

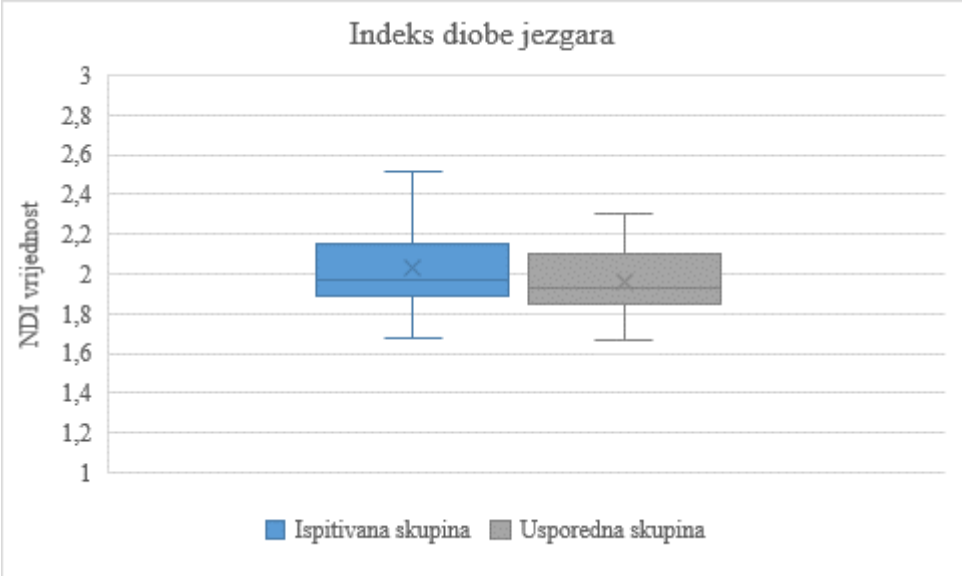
5.3.4. Vrijednosti indeksa diobe jezgara

Studentovim t-testom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u vrijednosti NDI-ja između ispitivane i usporedne skupine (P = 0,258). Prikaz NDI vrijednosti nalazi se u tablici 6 i slici 8.

Tablica 6. Prikaz vrijednosti indeksa diobe jezgara u ispitivanoj i usporednoj skupini te podskupinama majki i očeva.

	Aritmetička sredina	**SD**	**Min**	**Max**	**25. perc.**	**Medijan**	**75. perc.**
Ispitivana skupina NDI							
Ukupno	2,03	0,21	1,68	2,52	1,90	1,97	2,15
Majke	1,96	0,12	1,82	2,15	1,88	1,94	2,01
Očevi	2,01	0,26	1,68	2,52	1,90	2,10	2,30
Usporedna skupina NDI							
Ukupno	1,96	0,17	1,67	2,30	1,86	1,93	2,08
Majke	1,96	0,21	1,67	2,30	1,80	1,95	2,15
Očevi	1,98	0,14	1,82	2,20	1,86	1,96	2,08

NDI – indeks diobe jezgara, SD – standardna devijacija

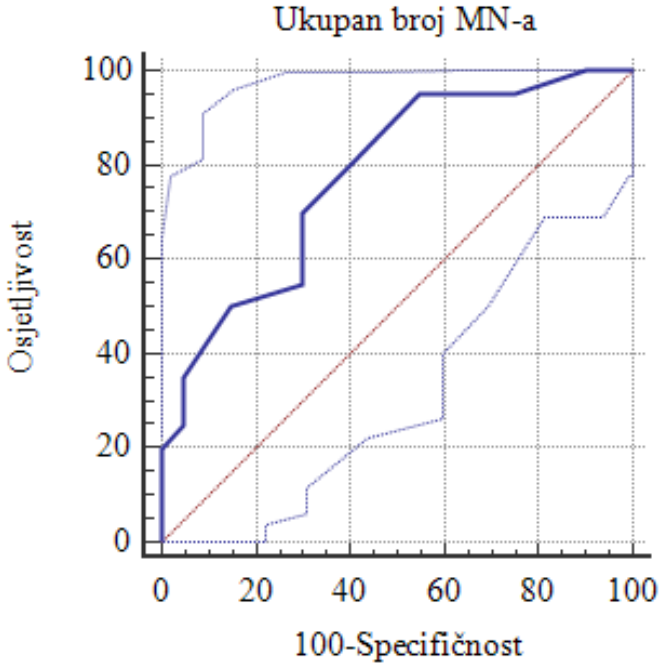


NDI – indeks diobe jezgara

Slika 8. Usporedba vrijednosti indeksa diobe jezgara između roditelja ispitivane i usporedne skupine.

5.4. Analiza krivulje osjetljivosti

Samo je kod vrijednosti ukupnih MN-a uočena statistički značajna razlika između ispitivane i usporedne skupine, stoga je kod ukupnih MN-a na 1000 binuklearnih stanica ispitana krivulja osjetljivosti (ROC). Veličina površine ispod krivulje (AUC) iznosi 0,775. Prema kategorizaciji točnosti testa naš test s veličinom površine ispod krivulje od 0,775 spadao bi u test osrednje osjetljivosti. Za graničnu vrijednost ukupnoga broja MN-a utvrđena vrijednost je > 16 MN. Prema ROC krivulji, s osjetljivošću metode od 20 % i specifičnošću od 100 %, roditelji s više od 16 MN-a imali bi veći rizik za trudnoću/dijete s DS-om (slika 9 i tablica 7).



MN - mikronukleus

Slika 9. Krivulja osjetljivosti za ukupan broj mikronukleusa.

Tablica 7. Rezultati krivulje osjetljivosti za ukupan broj mikronukleusa.

AUC	0,775
Standardna greška	0,0736
95 % interval pouzdanosti	0,615 do 0,892
z statistic	3,738
Razina značajnosti P	0,002
Youden index J	0,400
Kriterij odabira (ukupan broj MN-a)	> 16
Osjetljivost	20,00
Specifičnost	100,00

6. RASPRAVA

U ovome se istraživanju ispitivala mogućnost primjene mikronukleus-testa kako bi se procijenio stupanj kromosomske nestabilnosti i nastajanje slobodnoga oblika DS-a kod parova mlađe životne dobi. Većina dosadašnjih istraživanja provedena je neovisno o majčinoj dobi ili je bila usmjerena na stariju majčinu dob kao glavni i do sada jedini potvrđeni uzrok pojave trudnoća s DS-om (13). Očevo porijeklo nastanka trisomije 21 rjeđe je proučavano, a mali broj provedenih istraživanja, koja se uglavnom temelje na očevoj dobi kao jednom od mogućih faktora za rađanje djece s DS-om, nisu dala jednoznačne rezultate. Nadalje, nedovoljno poznavanje etiologije slobodnoga oblika DS-a otežava procjenu rizika pojavnosti trisomije 21 u idućim trudnoćama. Prema novijim istraživanjima procjenjuje se da je rizik za ponavljanje trudnoće s DS-om 2,4 puta veći u odnosu na rizik dobi, a čak osam puta veći kod majki mlađih od 30 godina (18). Upravo iz tih razloga, ali i spoznaje da se velik broj trudnoća s DS-om javlja kod mlađih žena, u ovo su istraživanje uključeni mladi parovi. Do sada je svega nekoliko istraživanja poput ovoga provedeno na mlađoj populaciji, pri čemu je uočena povećana kromosomska nestabilnost u limfocitima perifernih krvi roditelja djece s DS-om (4, 10, 42, 69). Kao idealna metoda za proučavanje genomske nestabilnosti pokazao se mikronukleus-test.

Mikronukleus-testom u ovome istraživanju utvrđen je broj MN-a, NPB-a i NBUD-a na 1000 binuklearnih stanica te učestalost MN-a u mononukelaranim stanicama. Statističkom analizom utvrđena je značajno veća učestalost ukupnih MN-a u roditelja ispitivane skupine koji imaju trudnoću s DS-om u odnosu na usporednu skupinu sa zdravom djecom. Uočen je i statistički značajno veći broj MN-a u majki ispitivane skupine u odnosu na usporednu skupinu (P=,019). Drugi autori također uočavaju veću učestalost MN-a u populaciji majki djece s DS-om (5, 8, 59), što ide u prilog činjenici da se većina nerazdvajanja kromosoma 21, odnosno oko 95 %, zbiva za vrijeme oogeneze u žena (4, 48). Iako se još uvijek ne zna zbog čega do većega broja nepravilnoga razdvajanja kromosoma 21 dolazi u žena, za sada se glavnim uzročnim čimbenikom smatra razlika u periodu sazrijevanja spolnih stanica. U žena je taj period duži, traje od fetalnoga razdoblja do začeća, dok se kod muškaraca odvija od puberteta, kontinuirano, bez odgode. Iako statistički neznačajno, veći broj MN-a uočen je i u ispitivanoj skupini očeva u odnosu na usporednu skupinu (aritmetička sredina: 9,70 prema 5,80). Naši rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja Silva-Grecco i suradnika (42) koji su također uključili oba roditelja djece s DS-om te uočili povišene vrijednosti MN-a u majki i očeva djece s DS-om, u usporedbi s roditeljima zdrave djece. Prema dobivenim rezultatima zaključuju da povećan broj MN-a kao

markera kromosomskih promjena ukazuje na povećanu kromosomsku nestabilnost u parova s djecom s DS-om (42). Postoji nekoliko mogućih mehanizama citogenetskoga oštećenja koji dovode do nerazdvajanja kromosoma stvarajući MN-e. Neki su od mogućih mehanizama oštećenje diobenoga vretena te poremećen mehanizam folata koji dovodi do oštećenja centromera (42). Carria i suradnici (40) u istraživanje su osim roditelja djece s DS-om uključili i djecu sa slobodnim oblikom DS-a te su kod obiju skupina utvrdili veći broj MN-a.

Migliore i suradnici (4) utvrdili su i povezanost dobi s brojem MN-a. Oni uočavaju povećan, ali statistički neznačajan broj MN-a kod roditelja starije životne dobi. S obzirom na to da su u njihovu istraživanju sudjelovali stariji roditelji koji su u mlađoj dobi imali djecu s DS-om, starija životna dob roditelja u trenutku provođenja ispitivanja mogla bi se smatrati svojevrsnim nedostatkom ovoga istraživanja. U našemu istraživanju roditelji nisu stariji od 36 godina i uzorci krvi uzimani su u razdoblju unutar jedne godine od trudnoće s DS-om.

Budući da se klasičnom metodom MNT-a ne može odrediti porijeklo MN-a kako bi se utvrdilo je li MN nastao gubitkom cijeloga kromosoma ili acentričnoga dijela, uz MNT potrebno je koristiti dodatne metode. Migliore i suradnici (4) koristili su FISH s dvije DNA sonde, jednu karakterističnu za centromerna područja kromosoma 13 i 21, a drugu specifičnu za DSCR. Utvrdili su da postoji veći postotak nerazdvajanja kromosoma 21 u binuklearnim stanicama perifernih krvi majki ispitivane skupine u odnosu na usporednu skupinu. Jednake rezultate dobili su i Abdel Hady i suradnici (69) koji su MNT-om i FISH analizom utvrdili statistički značajno veću učestalost nerazdvajanja kromosoma 21 u mladih majki djece s DS-om.

Osim učestalosti MN-a u binuklearnim stanicama u ovome je istraživanju utvrđen i broj MN-a u mononuklearnim stanicama. Mikronukleusi u mononuklearnim stanicama, za razliku od onih u binuklearnima, daju nam podatke o kromosomskim oštećenjima nastalima tijekom godina u limfocitima, *in vivo*, prije kultivacije. Mi smo utvrdili veći broj MN-a u mononuklearnim stanicama roditelja ispitivane skupine u odnosu na usporednu skupinu iako nije bilo statistički značajne razlike, dok je Spearmanovim korelacijskim testom uočena pozitivna korelacija između učestalosti MN-a u mononuklearnim i MN-a u binuklearnim stanicama. Dobiveni rezultati usporedivi su s istraživanjem Carriae i suradnika (40) koji također ne uočavaju statističku značajnost kod MN-a u mononuklearnim stanicama djece s DS-om i njihovih roditelja.

Za razliku od našega istraživanja koje je obuhvatilo i određivanje učestalosti NPB-a i NBUD-ova, navedeni biomarkeri nisu do sada analizirani u istraživanjima citogenetskih osobitosti perifernih krvi roditelja djece sa slobodnim oblikom DS-a. Nukleoplazmatski mostovi pokazatelj su postojanja dicentričnih kromosoma u stanici koji se tijekom diobe nisu raspodijelili u stanice kćeri, a NBUD-ovi predstavljaju posrednu mjeru amplifikacije gena (50). Kod usporedbe NPB-a i NBUD-a između roditelja ispitivane skupine ni u jednome slučaju nije utvrđena statistička značajnost ovih parametara, ali je aritmetička sredina i NPB-a i NBUD-a veća u ispitivanoj skupini kao i unutar podskupina očeva i majki u odnosu na usporednu skupinu. Spearmanovim korelacijskim testom utvrđena je pozitivna korelacija između ukupnoga broja MN-a i NPB-a. S obzirom na to da nukleoplazmatski mostovi nastaju kao posljedica postojanja dicentričnih kromosoma koji nastaju uslijed nepravilnoga razdvajanja sestrinskih kromatida ili fuzije telomera na krajevima kromosoma, NPB-ovi se.smatraju i markerom za pogrešan popravak DNA ili fuzije telomera. U istraživanju Rudolph i suradnika (70) o poremećaju funkcije telomera uočena je veza između skraćivanja telomera i pojave NPB-a.

Određivanjem vrijednosti NDI-ja nije utvrđena statistički značajna razlika među skupinama. Indeks diobe jezgara prikaz je brzine proliferacije stanica, a pretpostavka je da će stanice s većim kromosomskim oštećenjem imati manji broj ciklusa dioba te niže vrijednosti NDI-ja (60). Također, indeks diobe jezgara služi kao pokazatelj odgovora na stimulaciju diobe limfocita mitogenima. Karttunen i suradnici (29) u osoba s DS-om uočavaju slabiji odgovor limfocita perifernih krvi na stimulaciju fitohemaglutininom. Suprotno, u našem istraživanju nije uočena razlika u odgovoru stanica na stimulaciju fitohemaglutininom.

Poznato je da brojni čimbenici utječu na učestalost MN-a. Pretpostavlja se da bi životne navike poput konzumacije alkohola i duhana, uzimanje lijekova, izloženost x-zračenju te nedostatan unos folata mogle imati utjacaj na povišenu učestalost MN-a. Za vrijeme provedbe našega istraživanja ispitanici obiju skupina ispunili su anketni upitnik u kojem navode svoje životne navike i medicinsku anamnezu. Nitko od roditelja obiju skupina ne konzumira alkohol ni droge, a jednak broj pušača nalazi se u ispitivanoj i usporednoj skupini. Iako se za pušenje očekuje da će uzrokovati MN-e pošto su spojevi nastali pušenjem genotoksični, većina istraživanja ne uočava povezanost pušenja s povećanim stvaranjem MN-a (49). Samo neki autori uočavaju više vrijednosti MN-a kod pušača u odnosu na nepušače (48, 50). Nadalje, u posljednjih deset godina gotovo su svi ispitanici bili izloženi manjim dozama zračenja pri medicinskim pregledima. Ionizirajuće zračenje jedno je od genotoksičnih tvari koje uzrokuje

genomsku nestabilnost, međutim, manje doze zračenja za vrijeme većine dijagnostičkih pretraga ne smatraju se uzrokom većih oštećenja (50). U našemu istraživanju odabran je jednak broj roditelja u ispitivanoj i usporednoj skupini izloženih navedenim čimbenicima, čime smo nastojali otkloniti eventualni mogući utjecaj na rezultate istraživanja.

U ovome smo istraživanju uočili veću učestalost MN-a u majki i očeva ispitivane skupine, što upućuje na povećanu kromosomsku nestabilnost u mladih roditelja sa slobodnim oblikom DS-a u anamnezi. S obzirom na to da do danas nije razjašnjena etiologija nastanka slobodnoga oblika DS-a, a posebice pojavnost trisomije 21 kod mladih parova, mikronukleus-metoda zajedno s drugim dijagnostičkim testovima mogla bi poslužiti kao važan biomarker za prekoncepcijsku procjenu rizika nastajanja trisomije 21.

7. ZAKLJUČCI

Iz rezultata ovoga rada proizlaze sljedeći zaključci:

- Statistički značajno veća učestalost mikronukleusa na 1000 binuklearnih stanica nađena je u roditelja ispitivane skupine u odnosu na usporednu (P = 0,002).
- Značajno veća učestalost ukupnih mikronukleusa nađena je u podskupini majki ispitivane skupine u odnosu na usporednu (P = 0,019), dok u očeva nije utvrđena statistički značajna razlika (P = 0,05) unatoč povećanom broju mikronukleusa u ispitivanoj skupini.
- Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti MN-a u mononuklearnim stanicama između ispitivane i usporedne skupine (P = 0,175).
- Nema statistički značajne razlike u učestalosti nukleoplazmatskih mostova (P = 0,058) ni učestalosti nuklearnih pupova na 1000 binuklearnih stanica između ispitivane i usporedne skupine (P = 0,725).
- Vrijednosti indeksa diobe jezgara nisu se statistički značajno razlikovale između ispitivane i usporedne skupine (P = 0,258).
- Analizom krivulje osjetljivosti za učestalost mikronukleusa utvrđena je granična vrijednost mikronukleusa >16 u skupini parova koji su imali trudnoću s Downovim sindromom, uz osjetljivost metode od 20,00 % i specifičnost od 100 %.
- Prema kategorizaciji točnosti testa naš test s veličinom površine ispod krivulje (AUC) od 0,775 spadao bi u test osrednje osjetljivosti. S obzirom na dobivenu osjetljivost, mikronukleus-test ne bismo predložili kao samostalan biomarker za procjenu rizika, već bi se uz primjenu drugih dijagnostičkih metoda mogao koristiti za korekciju procjene rizika rađanja kromosomski bolesnoga ploda u idućim trudnoćama.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Downov sindrom smatra se najčešćim kromosomskim poremećajem u ljudi. Otprilike polovica trudnoća sa slobodnim oblikom Downova sindroma otkrije se u majki mlađih od 35 godina, dok uzroci nastanka trisomije 21 u mladih parova do danas nisu poznati. Mikronukleus metodom moguće je odrediti kromosomsko nerazdvajanje i lomove, stoga je cilj ovoga istraživanja bio utvrditi može li se mikronukleus-test koristiti u procjeni kromosomske nestabilnosti kod mladih parova koji u svojoj anamnezi imaju trudnoću sa slobodnim oblikom Downova sindroma.

Nacrt studije: Prospektivna poredbena studija.

Ispitanici i metode: Istraživanje je uključivalo 40 roditelja. U ispitivanoj skupini nalazilo se 20 parova majki i očeva koji imaju trudnoću/dijete sa slobodnim oblikom Downova sindroma, a u usporednoj skupini bio je jednak broj parova koji su imali barem dvoje zdrave djece te negativnu obiteljsku anamnezu na kromosomske i genske poremećaje. Za utvrđivanje sklonosti nepravilnome razdvajanju kromosoma u roditelja koristila se metoda mikronukleus-testa na limfocitima periferne krvi.

Rezultati: Statističkom analizom utvrđena je značajno veća razlika u učestalosti mikronukleusa u binuklearnim stanicama ispitivane skupine u odnosu na usporednu skupinu ($P = 0,002$) te u podskupini majki ispitivane skupine ($P = 0,019$). Analizom krivulje osjetljivosti utvrđena je granična vrijednost za ukupne mikronukleuse vrijednosti >16 za osjetljivost od 20 % i specifičnost 100 %. Usporedbom učestalosti mikronukleusa u mononuklearnim stanicama nije uočena statistička značajnost između ispitivanih skupina ($P = 0,175$), kao ni kod usporedbe učestalosti nukleoplazmatskih mostova ($P = 0,058$) i nuklearnih pupova ($P = 0,725$).

Zaključak: Rezultati istraživanja upućuju da mladi roditelji djece sa slobodnim oblikom Downova sindroma imaju povećanu sklonost nerazdvajanju kromosoma. S obzirom na osrednju osjetljivost metode, mikronukleus-test bi se uz primjenu drugih dijagnostičkih metoda mogao koristiti za korekciju procjene rizika rađanja kromosomski bolesnoga ploda u idućim trudnoćama.

Ključne riječi: Downov sindrom; kromosomska nestabilnost; mikronukleus, mikronukleus-test; trisomija 21

9. SUMMARY

SIGNIFICANCE OF MICRONUCLEUS ASSAY IN ESTIMATION OF CHROMOSOME INSTABILITY AND OCCURRENCE OF REGULAR FORM OF DOWN SYNDROME IN YOUNG COUPLES

Objectives: Down syndrome is one of the most common chromosomal disorder in humans. About half of pregnancies with the regular form of Down syndrome are detected in mothers under 35, while the causes of trisomy 21 in young couples still remain unknown. The micronucleus assay can determine chromosomal nondisjunction and breakage, therefore, the aim of this study was to determine whether a micronucleus assay could be used to evaluate chromosomal instability in young couples with history of regular form of Down syndrome pregnancy.

Study design: Prospective comparative study.

Subjects and Methods: The study included 40 parents. Study group consisted of 20 pairs of mothers and fathers with pregnancy / child having a regular form of Down syndrome and the control group with an equal number of couples who had at least two healthy children and a negative family history for chromosomal and gene disorders. A micronucleus assay on peripheral blood lymphocytes was used to determine parental chromosomal instability.

Results: Statistical analysis revealed significantly higher frequency of micronuclei in binucleated cells of parents in the study group compared to parents in the control group ($P = 0.002$) and the maternal subgroup ($P = 0.019$). A receiver operating characteristic curve (ROC) established a cut-off value for total number of micronuclei > 16 for sensitivity of 20 % and specificity of 100 %. Comparing the frequency of micronuclei in mononuclear cells there was no statistically significant difference noted between analysed groups ($P = 0.175$), nucleoplasmatic bridges ($P = 0.058$) and nuclear buds ($P = 0.725$).

Conclusion: Results suggest that young pairs of children with regular form of Down syndrome have an increased tendency for chromosome nondisjunction. Given the mediocre sensitivity, the micronucleus assay combined with other diagnostic methods could be used to correct the risk assessment of having chromosomal abnormality in subsequent pregnancies.

Keywords: chromosomal instability, Down syndrome, micronucleus test, micronuclei, trisomy 21

10. LITERATURA

1. Megarbane A, Ravel A, Mircher C, Sturtz F, Grattaz Y, Rethore J-M, i sur. The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: The past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. Genetics in medicine. 2009;11:611-616.
2. Watkins PC, Tanzi RE, Cheng SV, Gusella JF. Molecular genetics of human chromosome 21. J Med Genet. 1987;24:257-270.
3. Omori S, Tanabe H, Banno K, Tsuji A, Nawa N, Hirata K, i sur. A Pair of Maternal Chromosomes Derived from Meiotic Nondisjunction in Trisomy 21 Affects Nuclear Architecture and Transcriptional Regulation. Scientific Reports. 2017;7:764.43
4. Migliore L, Boni G, Bernardini R, Trippi F, Colognato R, Fontana I, i sur. Susceptibility to chromosome malsegregation in lymphocytes of women who had a Down syndrome child in young age. Neurobiology of Aging. 2006;27:710-716.
5. Bhatnagar N, Nizery L, Tunstall O, Vyas P, Roberts I. Transient Abnormal Myelopoiesis and AML in Down Syndrome: an Update. Curr Hematol Malig Rep. 2016;11:333–341.
6. Sherman SL, Allen EG, Bean LH, Freeman SB. Epidemiology of Down Syndrome. Wiley InterScience. 2007;13:221-227.
7. Kolgeci S, Kolgeci J, Sopjani M, Azemi M, Shala-Beqiraj R, Gashi Z, i sur. Cytogenetic Study in Children with Down Syndrome Among Kosova Albanian Population Between 2000 and 2010. Mat Soc Med. 2013;2:131-135.
8. Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park H-S, i sur. The DNA sequence of human chromosome 21. Nature. 2000;405:311-319.
9. Kazemi M, Salehi M, Kheirollahi M. Down Syndrome: Current Status, Challenges and Future Perspectives. Int J Mol Cell Med. 2016;5:125-133.
10. Migliore L, Migheli F, Coppede F. Susceptibility to Aneuploidy in Young Mothers of Down Syndrome Children. Sci. World J. 2009;9:1052-1060.
11. Graves Allen E, Freeman SB, Druschel C, Hobbs CA, O'Leary LA, Romitti PA. Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects. Hum Genet. 2009;125(1):41–52.
12. Lamb NE, Yu K, Shaffer J, Feingold E, Shermann SL. Association between Maternal Age and Meiotic Recombination for Trisomy 21. Am. J. Hum. Genet. 2005;76:91–99.

13. Loane M, Morris JK, Addor M-C, Arriola L, Budd J, Dorray B, i sur. Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening. European Journal of Human Genetics. 2013;21:27–33.
14. Bukvic N, Gentile M, Susca F, Fanelli M, Serio G, Buonadonna L, Capurso A, Guanti G. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. Mutat Res 2001;498(1-2):159-167.
15. Hultén MA, Öijerstedt L, Iwarsson E, Jonasson J. Maternal Germinal Trisomy 21 in Down Syndrome. J Clin Med. 2014;3(1):167-75.
16. Martin RH. Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. Reprod BiomedOnline. 2008;16(4):523-31.
17. Balarin MAS, Cintra MTR, Cordeiro F, Naves L, da Silva-Grecco RL. Screening of sixpolymorphisms related with folate metabolism in parents of individuals with Down syndrome. J Matern Fetal Neonatal Med. 2017;27:1-7.
18. Warburton D. Biological aging and the etiology of aneuploidy. Cytogenet Genome Res. 2005;111(3-4):266-72.
19. Freeman SB, Yang Q, Allran K, Taft LF, Dherman SL. Women with a reduced ovarian complement may have an increased risk for a child with Down syndrome. Am J Hum Genet.2000;66:1680–1683.
20. Ghosh S, Feingold E, Chakraborty S, Dey SK. Telomere length is associated with types of chromosome 21 nondisjunction: a new insight into the maternal age effect on Down syndrome birth. Hum Genet. 2010;127(4):403-9.
21. Ghosh S, Bhaumik P, Ghosh P, Dey SK. Chromosome 21 non-disjunction and Down syndrome birth in an Indian cohort: analysis of incidence and aetiology from family linkage data. Genet.Res.Camb.2010; 92: 189-197.
22. Asim A, Agarwal S, Kulkarni SS, Panigrahi I. Folate Metabolism and Genetic Variant in Down Syndrome: A Meta-Analysis. J Genet Syndr Gene Ther. 2015; 6:3.
23. Coppede F. The complex relationship between folate/Homocysteine metabolism and risk of Down syndrome. Mutat. Res. 2009;682:54-70.
24. Coppedè F, Bosco P, Lorenzoni V, Migheli F, Barone C, Antonucci I i sur. The MTR2756A>G polymorphism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome: a case-control study and a meta-analysis. Mol Biol Rep. 2013;40(12):6913-25.
25. Yang Q, Sherman SL, Hassold TJ, Allran K, Taft L, Pettay D i sur. Risk factors for trisomy 21: maternal cigarette smoking and oral contraceptive use in a population-based case-control study. Genet Med. 1999;1(3):80-8.

26. Hildebrand E, Källén B, Josefsson A, Gottvall T, Blomberg M. Maternal obesity and risk of Down syndrome in the offspring. Prenat Diagn. 2014;34(4):310-5.
27. Czeizel AE, Puhó E. Maternal use of nutritional supplements during the first month of pregnancy and decreased risk of Down's syndrome: case-control study. Nutrition. 2005;21(6):698-704.
28. Palekar AG.Preconceptional intake of folate and vitamin B12 in the prevention of neural tube defects and Down syndrome. Am J Obstet Gynecol. 2001;184(3):517.
29. Karttunen R, Nurmi T, Ilonen J, Surcel HM. Cell-mediated immunodeficiency in Down's syndrome: normal IL-2 production but inverted ratio of T cell subsets. Clin Exp Immunol. 1984;55(2):257-63.
30. Thompson JA. Disentangling the roles of maternal and paternal age on birth prevalence of down syndrome and other chromosomal disorders using a Bayesian modeling approach. BMC Medical Research Methodology. 2019; 19:82.
31. Kazaura MR, Lie RT. Down's syndrome and paternal age in Norway. Paediatr Perinat Epidemiol 2002;16:314–9.
32. Zhu JL, Madsen KM, Vestergaard M, Olsen AV, Basso O, Olsen J. Paternal age and congenital malformation.Human Reproduction.2005;20:3173-3177.
33. Yang Q, Wen SW, Leader A, Chen XK, Lipson J, Walker M. Paternal age and birth defects:how strong is the association? Human Reproduction.2007;22:696-701.
34. Oliver TR, Bhise A, Feingold E, Tinker S, Masse N, Sherman SL. Investigation of factors associated with paternal nondisjunction of chromosome 21. Am J Med Genet A. 2009;149A(8):1685-90.
35. Coppedè F. Risk factors for Down syndrome. Arch Toxicol. 2016;90(12):2917-29.
36. Herrera LA, Prada D, Andonegui MA, Dueñas-González A. The Epigenetic Origin of Aneuploidy. Curr Genomics. 2008;8(1):43-50.
37. Cagnetta A, Lovera D, Grasso R, Colombo N, Canepa L, Ballerini F, Calvio M, Miglino M, Gobbi M, Lemoli R, Cea M. Mehanisms and Clinical Applications of Genome Instability in Multiple Myeloma. Biomed Res Int.2015;2015:943096.
38. Hultén MA, Jonasson J, Iwarsson E, Uppal P, Vorsanova SG, Yurov YB i sur. Trisomy 21 mosaicism: we may all have a touch of Down syndrome. Cytogenet Genome Res. 2013;139(3):189-92.
39. Kovaleva NV. Germ-line transmission of trisomy 21: Data from 80 families suggest an implication of grandmaternal age and a high frequency of female-specific trisomy rescue. Molecular Cytogenetics. 2010;3:7.

40. Caria H, Chaveca T, Rueff J. Aneuploidy induced in lymphocytes of parents of trisomic 21 children. Teratog Carcinog Mutagen. 2001;21(5):369-82.
41. Frias S, Ramos S, Molina B, del Castillo V, Mayén DG. Detection of mosaicism in lymphocytes of parents of free trisomy 21 offspring. Mutat Res. 2002;520(1-2):25-37.
42. Silva-Grecco GL, Navarro GC, Cruz MR, Balarin MAS. Micronucleated lymphocytes in parents of Down syndrome children. Braz J Med Biol Res. 2012;45(7):573-577.
43. Tucker JD, Cheong HSJ, Seth I, Joiner MC. Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. Mutagenesis. 2013;28:433–440.
44. Mishima M. Chromosomal aberrations, clastogens vs aneugens. Scholar. 2017;9:1-16.
45. Speit G, Zeller J, Nuss S. The in vivo or ex vivo origin of micronuclei measured in human biomotoring studies. Mutagenesis. 2011;26:107-110.
46. Kirsch-Volders M, Fenech M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. Mutagenesis. 2001;16:51-58.
47. Fenech M. Cytokinesis-block micronuckleus cytome assay. Nat. Protoc. 2007;2:1084-1104.
48. Bonassi S, Lando C, Ceppi M, Fenech M, Lin Y-p, Chang WP, i sur. HUman MicroNucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria, and Host Factors on the Frequency of Micronuclei. Environmental and Molecular Mutagenesis. 2001;37:31–45.
49. Kovalchuk O, Luzhna L, Kathiria P. Micronuclei in genotoxicity assessment: fro genetics to epigenetics and beyond. Front Genet. 2013;4:1-17.
50. Kopjar N, Kašuba V, Milić M, Rozgaj R, Želježić D, Gajski G i sur. Normal and Cut-Off Values of the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay on Peripheral Blood Lymphocytes in the Croatian General population. Arh Hig Rada Toksikol. 2010;61(2):219-34.
51. Hayashi M. The micronucleus test most widely used in vivo genotoxicity test. Genes and Environment. 2016;38:18.
52. Sears DA, Udden MM. Howell-Jolly Bodies;A Brief Historical Review. Am J Med Sci. 2012;343(5):407-409.
53. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, i sur. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. Mutagenesis. 2011;26:125–132.

54. Bonassi S, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Znaor A, Chang WP, i sur. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Carcinogenesis. 2007;3(28):625-631.
55. Iarmarcovai G, Botta A, Orsiere T, Bonassi S, Baan RA. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. Mutat. Res. 2008;658:215-233.
56. Shimizu N. Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extrachromosomal elements. Mutagenesis. 2011;26:119-123.
57. Genesca A, Terradas M, Martin M, Tusell L. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? Mutat. Res. 2010;705:60-67.
58. Shimizu N, Utani K-i, Okamoto A. Generation of Micronuclei during Interphase by Coupling between Cytoplasmic Membrane Blebbing and Nuclear Budding. PLoS ONE. 2011;6:1-12 .
59. Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, Wahl GM. Selective Entrapment of Extrachromosomally Amplified DNA by Nuclear Budding and Micronucleation during S Phase. The Journal of Cell Biology. 1998;140:1307-1320.
60. Ionescu ME, Ciocirlan M, Becheanu G, Nicolaie T, Ditescu C, Teiusanu AG i sur. Nuclar Division Index may Predict Nucleoplastic Colorectal Lesions. Maedica (Buchar). 2011;6: 173-178.
61. Andreassi MG, Barale R, Iozzo P, Pican E. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. Mutagenesis. 2011;26:77-83.
62. Akyil D, Ozkara A, Feyza Erdogmus S, Eren Y, Konuk M, Saglam E. Micronucleus assay in human lyphocyes after exposure to alloxydim sodium herbicide in vitro. Cytotehnology. 2015;6:1059-1066.
63. Bolognesi C, Creus A, Ostrosky-Wegman P, Marcos R. Micronuclei and pesticide exposure. Mutagenesis. 2011;26:19-26 .
64. Zhao H, Lu X, Li S, Chen D-Q, Liu Q-J. Characteristics of nucleoplasmic bridges induced by 60Co γ-rays in human peripheral blood lymphocytes. Mutagenesis. 2013;29:49-54.
65. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic disfunction and cell death. Mutat Res. 2006;600:58-66.
66. Thomas P, Umegaki P, Fenech M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. Mutagenesis. 2003;18:187-194.
67. Fenech M. The in vitro micrunucleus technique. Mutat. Res. 2000;455:81-95.

68. Swets JA, Dawes RM, Monahan J. Psychological Science Can Improve Diagnostic Decisions. Psychol Sci Public Interest. 2000;1(1):1-26.
69. Abdel Hady S, Afifi HH, Abdel Ghany EA, Taher MB, Eid MM. Micronucleus assay as a biomarker for chromosome malsegregation in young mothers with Down syndrome children. Genet Couns. 2015;26(1):13-9.
70. Rudolph KL, Millard M, Bosenberg MW, DePinho RA. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. Nat Genet. 2001;28(2):155

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Ivana Lazar

Datum rođenja: 02.12.1993.

Adresa: Natkrižovljan 57, 42208 Cestica

Broj mobilnoga telefona: 0923066040

E-mail: ivanalazar5@gmail.com

RADNO ISKUSTVO

01/2019. - danas - Opća bolnica Varaždin - Odjel za patologiju, citologiju i sudsku medicinu

10/2017. - 01/2019. - Opća bolnica Varaždin - Medicinsko-biokemijski laboratorij

12/2015. - 12/2016. - Opća bolnica Varaždin - Stručno osposobljavanje bez zasnivanja radnoga odnosa

OBRAZOVANJE

(2016. - danas) - Medicinski fakultet Osijek

Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

(2012. - 2015.) - Medicinski fakultet Rijeka (Fakultet zdravstvenih studija)

Preddiplomski stručni studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika

VŠS (bacc.med.lab.diagn.)

(2009. - 2012.) - Druga gimnazija Varaždin

Opći smjer

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik: hrvatski

Ostali jezici: dobro poznavanje engleskoga jezika, osnovno poznavanje španjolskoga i slovenskoga jezika

Računalne vještine: osnove rada na računalu, poznavanje rada u MS Officeu.

DODATNE INFORMACIJE

Projekti i konferencije:

2017. - 10th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Dubrovnik

2015. - Youthpass, "Zaposli me, sosed", Rakičan, Slovenija

2015. - Youthpass, "Where in Europe..?", Prag, Češka

12. PRILOZI

1. Anketni upitnik za roditelje

ANKETA ZA ISPITANIKA

Broj ankete:

Mjesto i datum ispunjavanja ankete:_____

1. OPĆI PODACI

1. Koliko imate godina?
2. Mjesto stanovanja: _____
3. U kojem predjelu grada živite?
   1) Predgrađe
   2) Industrijska zona
   3) Stambeno naselje
   4) Seosko naselje
   5) Ne znam/ne želim odgovoriti

2. MEDICINSKA ANAMNEZA

1. Koliko ste do sada imali trudnoća?
2. Ishod prethodnih trudnoća: _____
   _____
3. Jeste li imali sljedećih reproduktivnih problema:
   1) Teško ste zatrudnjeli DA NE
   2) Imali ste više spontanih pobačaja DA NE
   3) Sterilitet (koristili ste postupak medicinski potpomognute oplodnje – IVF postupak) DA NE
      navedite koji _____
4. Je li Vam ikad dijagnosticirana neka od sljedećih bolesti?

Bolesti			Dob kada je bolest dijagnosticirana
a. Dijabetes	DA	NE	
b. Bolesti srca	DA	NE	
c. Poremećaj zgrušavanja krvi	DA	NE	
d. Bolesti bubrega	DA	NE	
e. Poremećaj funkcije štitne žlijezde	DA	NE	
f. Tuberkuloza	DA	NE	
g. HIV infekcija	DA	NE	
h. Anksioznost	DA	NE	
i. Depresija	DA	NE	

j. Bolesti mokraćnoga sustava	DA	NE	
k. Kronična upala debeloga crijeva	DA	NE	
l. Tumor organa spolnoga sustava			
m. Drugo (navedite) _____ _____			

5. Je li Vam ikad dijagnosticiran neki oblik karcinoma? DA NE

   (Ako je odgovor „DA“, molimo odgovorite na sljedeća pitanja.)

   1) O kojoj vrsti karcinoma je bila riječ?_____
   2) Koje godine Vam je dijagnosticiran?_____
   3) Koju vrstu liječenja ste primili? (npr. zračenje, kemoterapija, ako znate navedite lijekove koje ste primali) _____

6. Jeste li u posljednjih 10 godina bili na rendgenskom snimanju? DA NE

   (Ako je odgovor „DA“, ispunite sljedeću tablicu.)

Broj snimanja	Godina snimanja	Dio tijela koji je sniman	Razlog snimanja

7. Jeste li u posljednjih 10 godina bili na CT/CAT snimanju (kompjuterizirana tomografija)? DA NE NE ZNAM

   (Ako je odgovor „DA“, ispunite sljedeću tablicu.)

Broj snimanja	Godina snimanja	Dio tijela koji je sniman	Razlog snimanja

8. Patite li od alergijskih bolesti kao što su:
    1) Alergijska astma DA NE
    2) Atopijski dermatitis DA NE
    3) Ekcem DA NE
    4) Drugo: _____
9. Jeste li u posljednjih godinu dana uzimali ili uzimate neke lijekove? (Uključujući i biljne lijekove, kortikosteroidne kreme. Ne navoditi vitamine i minerale!) DA NE
   (Ako je odgovor „D“, ispunite sljedeću tablicu.)

Naziv lijeka	Razlog uzimanja (bolest)	Razdoblje uzimanja	Uzimana doza lijeka

10. Jeste li u posljednjih godinu dana bili cijepljeni? DA NE
    (Ako je odgovor „DA“, navedite cjepivo.) _____

11. Je li netko od članova Vaše uže ili šire obitelji rođen sa:
    1) Nasljednom ili kromosomskom bolešću DA NE NE ZNAM
    2) Urođenom malformacijom DA NE NE ZNAM
    3) Nekom drugom bolešću DA NE NE ZNAM

    (Ako je odgovor „DA“, ispunite tablicu.)

Vrsta bolesti	Oboljeli član obitelji

3. ŽIVOTNE NAVIKE

1. Jeste li posljednjih godinu dana uzimali neke od navedenih vitamina, minerala, Omega 3 ili drugih dodataka prehrani? DA NE

(Ako je odgovor „DA“, zaokružiti koji preparat.)

a) Vitamin C
b) Multivitamini s mineralima (navesti koji)_____
c) Omega 3
d) Vitamini B kompleksa
e) Željezo
f) Vitamin B12
g) Kalcij/Magnezij
h) Selen
i) Folna kiselina
j) Preparat češnjaka
k) Beta glukan
l) Antioksidansi (Cink)
m) Multivitamini bez minerala
n) Drugi pojedinačni vitamini ili minerali (navesti koji) _____

2. Konzumirate li alkohol? DA NE

(Ako je odgovor „DA“, zaokružite koliko često ga konzumirate.)

a) 6-7 puta tjedno
b) 4-5 puta tjedno
c) 2-3 puta tjedno
d) Jednom tjedno
e) 1-3 puta mjesečno
f) Manje od jednom mjesečno

3. Pušite li? DA NE
4. Jeste li ikada pušili? (Misli se na barem jednu cigaretu dnevno tijekom barem godine dana.) DA NE

(Ako je odgovor „DA“, koliko ste dnevno cigareta pušili?) _____

5. Jeste li ikada koristili opojna sredstva? DA NE
   (Ako je odgovor „DA“, navedite koja.) _____

4. IZLOŽENOST OKOLIŠNIM ČIMBENICIMA

1. Vaše trenutačno radno stanje?
   a) Zaposlen/a
   b) Nezaposlen/a
   c) Student/ica
   d) Kućanica
   e) Drugo (navedite) _____
2. Jeste li na sadašnjemu ili nekome od prošlih poslova (u posljednjih 10 godina) bili izloženi kemikalijama, zračenju, biološkim agensima? DA NE
   (Ako je odgovor „DA“, opišite izloženost i razdoblje izloženosti.)

   _____
3. Koristite li pesticide, insekticide, herbicide itd.? DA NE
   (Ako je odgovor „DA“, navedite koje i koliko često.)

   _____
4. Nalazi li se Vaš dom blizu nekoga staklenika ili poljoprivrednoga zemljišta? DA NE
5. Nalazi li se Vaš dom blizu tvornice? DA NE
   (Ako je odgovor „DA“, navedite o kojoj je vrsti tvornice riječ, npr. tekstilna industrija, prehrambena itd.)

   _____