

**FETAALISEN MIKROKIMERISMIN  
PITKÄAIKAISET VAIKUTUKSET:  
RETROSPEKTIIVINEN TUTKIMUS  
90-VUOTIAILLA NAISILLA**

Elisa Hepola  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
Mikrobiologia ja immunologia  
Toukokuu 2015

---

Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
Mikrobiologian ja immunologian tutkimusryhmä

HEPOLA ELISA: FETAALISEN MIKROKIMERISMIN PITKÄAIKAISET  
VAIKUTUKSET: RETROSPEKTIIVINEN TUTKIMUS 90-VUOTIAILLA  
NAISILLA

Kirjallinen työ, 21s.  
Ohjaaja: professori M. H.

Toukokuu 2015

Avainsanat: fetaalinen mikrokimerismi, qPCR, syöpä, Y-kromosomi, 90-  
vuotiaat

---

Jo 4.-6. raskausviikolta lähtien tapahtuu solujen siirtymistä istukan lävitse. Fetaalisessa mikrokimerismissä sikiön soluja kulkee istukan lävitse asettuen äidin elimistöön aiheuttamatta hyljintäreaktiota. Solut lienevät kantasolutyyppisiä, sillä niitä on voitu osoittaa äidin elimistöstä vielä vuosikymmeniä raskauden jälkeenkin. Määritimme 90-vuotiailta naisilta (N = 204) fetaalista mikrokimerismiä monistamalla heidän verinäytteistään eristetystä DNA:sta Y-kromosomaalista *DYS14* -geeniä ja selvitimme löytyykö fetaalisesta mikrokimerismistä yhteyttä kuolleisuuteen neljän vuoden seuranta-aikana, tulehdustekijöiden tasoihin tai kroonisiin sairauksiin tutkittavilla. Tutkimuksessamme osoitimme, että syöpää sairastavilta oli todennäköisemmin osoitettavissa fetaalista mikrokimerismiä verenkierrostaan, kuin terveiltä. Yhteyttä kuolleisuuden tai tulehdustekijöiden tasojen ja fetaalisen mikrokimerismin väliltä ei havaittu. Nykytutkimusten valossa voitaneen sanoa, että syöpäsairauksilla ja fetaalisella mikrokimerismillä on havaittavissa yhteys. Tarvitaan kuitenkin lisää tutkimuksia sekä suurempia aineistoja, jotta voitaisiin selvittää fetaalisen mikrokimerismin vaikutuksen suunta ja merkitys syöpäsairauksien yhteydessä.

# SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	1
1.1	Fetaalinen mikrokimerismi.....	1
1.2	Fetaalisen mikrokimerismin osoittaminen.....	2
1.3	Fetaalisen mikrokimerismin merkitys .....	3
1.4	Tutkimuksen tarkoitus ja tavoitteet .....	5
2	TUTKIMUSMETODI.....	7
2.1	Aineisto.....	7
2.2	Menetelmät .....	7
2.2.1	Näytteiden keruu ja DNA:n eristys .....	7
2.2.2	Kvantitatiivinen PCR .....	8
2.2.3	Tilastollinen käsittely .....	12
3	TULOKSET .....	14
4	POHDINTA .....	16
	LÄHTEET.....	20



# 1 JOHDANTO

Vähentävätkö poikalapset äitiensä pitkäikäisyyttä? Vuonna 2002 tehtiin kirkonkirjoihin perustuva tutkimus selvittämään asiaa. Tutkimus osoitti, että poikalapset vähensivät äidin pitkäikäisyyttä tytärtä vastoin lisätessä sitä. (Helle ym. 2002) Tulokset herättivät runsaasti kritiikkiä ja synnyttivät useita tutkimuksia lisää samasta aiheesta, useimpien kuitenkin enää löytämättä vastaavanlaista yhteyttä (Cesarini ym. 2009). Tiedetään, että pojat vaativat äidiltään enemmän fysiologisesti kuin tytöt, johtuen esimerkiksi poikien nopeammasta intrauteriinisestä kasvusta sekä suuremmasta syntymäpainosta. (Helle ym. 2002) Myöskin sosiaaliselta kannalta katsottuna poikien kasvattaminen voi olla äidille rasittavampaa, sillä etenkin historiassa on ajateltu, että tyttäret helpottaisivat äidin elämää olemalla apuna kotiaskareissa. (Cesarini ym. 2009) On yhä avoinna vaikuttavatko poikalapset äidin pitkäikäisyyteen. Voidaan kuitenkin pohtia mitä vaikutuksia jälkeläisillä, sukupuoleen katsomatta, on äidin terveydelle ja millä mekanismeilla vaikutukset välittyvät.

## 1.1 Fetaalinen mikrokimerismi

Raskauden aikana jo alkaen 4.-6. raskausviikolta tapahtuu solujen siirtymistä istukan lävitse (Fugazzola ym. 2011). Soluja siirtyy sekä äidistä sikiöön, että sikiöstä äitiin. Puhutaan mikrokimerismistä, kun yksilön kudoksissa tai verenkierrossa on pieniä määriä soluja tai DNA:ta, jotka ovat peräisin toisesta, perimältään erilaisesta yksilöstä. (Gammill ja Nelson 2010) Yksilöstä voi tulla

kimera raskauden lisäksi myös veren- tai elinsiirron seurauksena (Boyon ym. 2011). Fetaalisessa mikrokimerismissä sikiön soluja asettuu äidin elimistöön ilman, että äidin immuunipuolustus hyökkää näiden vieraiden solujen kimppuun, siis aiheuttamatta lainkaan hyljintäreaktiota (Liegeois ym. 1977). Nykytietämyksen mukaan solut asettunevat äidin luuytimeen. Lisäksi solujen uskotaan olevan kantasolutyyppisiä, sillä niitä voidaan havaita äidin verenkierrossa ja kudoksissa jopa vuosikymmeniä raskauden jälkeen. (O'Donoghue ym. 2004) Sikiöstä peräisin olevilla soluilla näyttää siis olevan kantasolujen kyky jakautua rajattomasti sekä erilaistua. On voitu osoittaa, että sikiön alkuperää olevista hematopoieettisista kantasoluista syntyy äidin elimistöön verta muodostavia soluja kuten B- ja T- lymfosyyttejä sekä luonnollisia tappajasoluja, mesenkymaalisisista kantasoluista puolestaan kehittyy muun muassa epiteelisoluja, jotka voivat erilaistua ja asettua kudoksiin äidin omien solujen joukkoon. Erilaistuneita sikiön alkuperää olevia epiteelisoluja on voitu osoittaa muun muassa äidin maksasta, kilpirauhasesta sekä suolen epiteelistä. (Boyon ym. 2011)

## **1.2 Fetaalisen mikrokimerismin osoittaminen**

Fetaalista mikrokimerismiä tutkittaessa voidaan määrittää joko mikrokimeeristä DNA:ta tai kokonaisia mikrokimeerisiä soluja äidin plasmasta tai kudoksista. Mikrokimeeriset solut voidaan osoittaa äidin kudoksesta käyttämällä fluoresenssi in situ hybridisaatio- eli FISH-menetelmää. Toinen vaihtoehto fetaalisen mikrokimerismin osoittamiseksi on sikiön DNA:n osoittaminen äidin plasmasta eristetystä DNA:sta polymeerasiketjureaktiolla (engl. polymerase chain reaction, PCR). (Gammill ja Nelson 2010) Vaikka mikrokimeerisiä soluja siirtyy äitiin sekä tyttö- että poikasikiöistä, valitaan

useimmiten tutkimuskohteeksi äidit, jotka ovat synnyttäneet poikalapsen tai -lapsia. Tällöin voidaan valita jokin vain Y-kromosomille ominainen geeni, jota lähdetään monistamaan PCR-menetelmällä. Mikäli haluttaisiin osoittaa tyttölapsesta lähtöisin olevaa fetaalista mikrokimerismiä äidistä, täytyisi ensin selvittää sekä äidin että tyttären HLA-tyypit ja valita sellainen geeni, joka poikkeaa äidin ja jälkeläisen välillä. (Fugazzola ym. 2011, Nelson 2012) Kvantitatiivisten tutkimusten mukaan fetaalisen DNA:n määrä on noin 3-6 % äidin plasmasta eristetyn DNA:n kokonaismäärästä (Lo ym. 1998). Tutkimiseen käytetyt menetelmät ovat nykyisin hyvin herkkiä, niillä voidaan osoittaa yksi XY-solu 1 000 000 XX-solun joukosta (Boyon ym. 2011).

### **1.3 Fetaalisen mikrokimerismin merkitys**

Sitä mukaa, kun on käynyt selväksi miten laajasta ilmiöstä fetaalisessa mikrokimerismissä on kyse ja on kehittynyt käytäntöjä, joilla sitä voidaan tutkia, on ryhdytty pohtimaan, mitä merkitystä sikiön solujen pitkäaikaisella oleskelulla äidin elimistössä on äidin terveydelle. Aihetta on lähestytty useasta eri näkökulmasta, mutta varmaa vastausta ei ole vielä löytenyt. Eräs hypoteesi esittää, että sikiön solut herättäisivät äidin immuunivasteen ja sitä seuraava pitkittynyt tulehduksellinen tila kudosvaurioineen toimisi autoimmuunitaudin alkuunpanijana. Tilastot puhuvat väitteen puolesta, sillä tiedetään, että monet autoimmuunitaudit ovat yleisempiä naisilla ja usein puhkeavat raskauden aikana tai sen jälkeen. (Boyon ym. 2011, Fugazzola ym. 2011) Korrelaatiota fetaalisen mikrokimerismin ja autoimmuunitautien, kuten autoimmuunityreoidiitin, nivelreuman tai systeemisen skleroosin välillä on selvitelty useissa tutkimuksissa. Niissä on osoitettu, että autoimmuunitautia sairastavan naisen

fetaalisen mikrokimerismin solujen tasot ovat korkeammat kuin terveen verrokin. Tämän lisäksi on kuitenkin useita tutkimuksia, joiden tulokset kumoavat väitteen, löytämättä minkäänlaista yhteyttä autoimmuunitautien ja fetaalisen mikrokimerismin väliltä jättäen kysymyksen vielä avoimeksi. (Fugazzola ym. 2011)

Aluksi ajateltiin, että fetaalisen mikrokimerismin vaikutukset olisivat yksinomaan haitallisia. Viime aikoina on kuitenkin väläytelty myös mahdollisuutta, että sikiön solut olisivatkin potentiaalisesti edullisia äidin terveyden kannalta. Tiedetään, että sikiön solut voivat erilaistua äidin elimistössä, alkaa erilaistuessaan ilmentää samoja pintamarkkereita kuin äidin omatkin solut ja sitten asettua kudoksiin, esimerkiksi maksaan tai kilpirauhaseen, äidin omien solujen joukkoon. Toistaiseksi on avoinna, minkä vuoksi solut asettuvat kudoksiin. (Gammill ja Nelson 2010, Khosrotehrani ja Bianchi 2005). Herää ajatus voisivatko ne kantasoluominaisuuksiensa ansiosta olla mukana osallistumassa kudosten uudismuodostukseen ja korjaamiseen?

Sikiöstä peräisin olevat immuunijärjestelmän solut sen sijaan saattaisivat olla osallisina puolustauduttaessa maligniteetteja vastaan. On esitetty hypoteeseja, että vierasperäiset sikiön solut voisivat erilaistuessaan immuunijärjestelmän soluiksi tehostaa äidin immuunivastetta esimerkiksi syöpäsoluja vastaan. Toisaalta on päinvastaisia hypoteeseja, joiden mukaan sikiön alkuperää olevien mesenkymaalisten kantasolujen asettautuminen kasvaimiin ja niiden ympäristöön sekä siellä erilaistuminen strooman elementeiksi saattaisi edesauttaa syöpäkasvaimen selviytymistä ja kasvua esimerkiksi lisäämällä verisuonten uudismuodostusta tai tarvittavien kasvutekijöiden määrää. (Gadi 2009)



## 1.4 Tutkimuksen tarkoitus ja tavoitteet

Vastasyntyneen elinajanodote on kasvanut 1860-luvulta alkaen ja 2000-luvun alusta lähtien on havaittu nouseva trendi 90-vuotiaiden elinajanodotteessa. Tämä tarkoittaa sitä, että yhä useampi meistä elää yli 90-vuotiaaksi. Vuosien 1995 ja 2010 välisenä aikana yli 90-vuotiaiden määrä kaksinkertaistui ja näyttää siltä, että trendi on yhä kasvava (Jylhä ym. 2013). Tämä tarkoittaa sitä, että yhteiskunnassamme meillä on koko ajan suurentuva joukko vanhuksia, jotka tarvitsevat hoivaa ja apua jokapäiväisessä elämässään. Monilla heistä on useitakin kroonisia sairauksia, joiden myötä he tarvitsevat runsaasti terveydenhuollon palveluita. Vanhusten riskiä joutua terveydenhuollon piiriin lisää se, että heidän elimistönsä puolustusjärjestelmät heikkenevät iän myötä, mikä johtaa siihen, että sairastuvuus ja kuolleisuus infektioihin on merkittävästi lisääntynyt. Tämänhetkisen tutkimustiedon valossa tiedetään jo melko paljon siitä, mitä solu- ja molekyyli-tason muutoksia vanhusten immunitetissa tapahtuu verrattuna nuorempiin. Esimerkiksi tulehduksen perustason selittämätön nousu, niin kutsuttu ”inflamm-aging” -ilmiö on yksi havaituista ilmiöistä. Kuitenkin vanhuuteen liittyvien immuunijärjestelmän heikkenemismuutosten perimmäinen syy ja mekanismi on vielä selvittämättä. (Hurme 2013)

Tutkimuksemme tavoitteena on selvittää selittääkö fetaalinen mikrokimerismi vanhusten kuolleisuutta. Vertaamme tuloksiamme fetaalisen mikrokimerismin ilmenemisestä neljän vuoden kuolleisuustietoihin. Pohdimme myös voisiko allogeenisten fetaalisen mikrokimerismin solujen pitkäaikainen oleskelu äidin kehossa olla yksi syy vanhuuteen liittyvään tulehdustason nousuun. Lisäksi tutkimme löytyykö fetaalisen mikrokimerismin ja vanhuksilla yleisimpien kroonisten sairauksien välillä yhteyttä.

Mikäli edellä mainittuihin ikääntymiseen liittyviin immuunijärjestelmän muutoksiin tai lisääntyneeseen sairastavuuteen löytyisi selitys fetaalisesta mikrokimerismistä, voitaisiin tulevaisuudessa paremmin kehitellä terapeuttisia keinoja muutosten estämiseksi tai parantamiseksi.

## **2 TUTKIMUSMETODI**

### **2.1 Aineisto**

Tutkimuksen populaation muodostavat vuosina 1909 ja 1910 syntyneet naiset, jotka ovat asuneet Tampereella aineistoa kerättyä tammikuussa 2000. Naiset ovat osallisena Tervaskanto 90+ -hankkeessa. Tervaskanto 90+ -tutkimus on prospektiivinen väestötutkimus, joka on toteutettu Tampereella. Verinäytteiden keruu, fysiologiset mittaukset, haastattelut sekä muut vaadittavat suoritukset toteutettiin sairaanhoitajan kotikäynnein. Tiedot kroonisista sairauksista on kerätty sairauskertomuksista ja tiedot kuolinpäivämääristä on saatu Väestörekisterikeskuksesta. Tervaskanto 90+ -hankkeeseen kerätystä aineistosta tutkimuksemme otoksen muodosti 219 naista.

Tervaskanto 90+ -aineiston käytölle ja tutkimuksen toteuttamiselle on lupa Pirkanmaan sairaanhoitopiirin sekä Tampereen terveyskeskusten eettisiltä toimikunnilta. Tervaskanto 90+ -aineiston keräämiselle on lupa Tampereen kaupungin tutkimuslupatoimikunnalta. Aineiston tarkempi kuvailu (Goebeler ym. 2003).

### **2.2 Menetelmät**

#### **2.2.1 Näytteiden keruu ja DNA:n eristys**

Sairaanhoitajat keräsivät tutkittavista naisista verinäytteet kotikäynneillä. Verinäytteet otettiin EDTA -putkiin ja kaikki näytteet otettiin aamulla kello 8 ja

12 välillä vuoden 2000 tammikuun aikana. Näytteitä säilytettiin pakasteessa -80 asteessa. Keväällä 2013 tutkittavien kokoverinäytteistä eristettiin DNA. 15 näytteessä DNA-pitoisuus oli liian pieni tutkimuksessa käytettävän kvantitatiivisen polymeerasiketjureaktio-menetelmän (qPCR) suorittamiseen, joten tutkimuksen lopulliseksi otoskooksi muodostui N = 204 naista.

## 2.2.2 Kvantitatiivinen PCR

Fetaalisen mikrokimerismin solut äidissä ovat peräisin kohdussa olleesta sikiöstä, työstä tai pojasta. Johtuen Y-kromosomin spesifisyydestä, on helpoin tapa määrittää ja tutkia fetaalista mikrokimerismiä käyttämällä menetelmää, joka tunnistaa äidin verestä Y-kromosomaalista DNA:ta. Määritimme 204 näytteestä eristetystä DNA:sta Y-kromosomissa sijaitsevan *DYS14* -geenin (TSPY1, testis specific Y-encoded protein 1) pitoisuutta. Geeni on monikopioinen eli yksilöiden välillä on vaihtelua kuinka monta kopiota kyseistä geeniä Y-kromosomissa on. Kvantitatiivisella polymeerasiketjureaktiolla voidaan kuitenkin selvittää riittävällä herkkyydellä onko näytteessä tutkittavaa DNA-markkeria ja kuinka paljon. (Zhong ym. 2006)

Polymeerasiketjureaktio on DNA:n kopiointimenetelmä, jonka avulla voidaan monistaa yksittäinen DNA-molekyylä miljooniksi kopioiksi. Aluksi näyte ja muut reaktioon tarvittavat komponentit pipetoidaan näytelevyn kuoppiin. Levy asetetaan koneeseen, joka yhden ajon aikana suorittaa noin 40 sykliä. Syklin aluksi lämpötilaa ensin nostetaan, jolloin näytteessä oleva DNA denaturoituu. Tämän jälkeen lämpötila lasketaan sellaiselle tasolle, että alukkeet (engl. primers) ja koettimet (engl. probes) voivat sitoutua denaturoituun yksijuosteiseen DNA:han, niille ominaisille paikoilleen nukleotidijärjestyksensä mukaan eli

tässä tapauksessa tiettyyn kohtaan *DYS14* -geeniä. Alukkeet ovat DNA-pätkiä, jotka tunnistavat monistettavan DNA-alueen päät ja kiinnittyvät niihin. Niitä on kahdenlaisia, toiset kiinnittyvät DNA-alueen alkupäähän (forward primer) ja toiset sen loppupäähän (reverse primer).

Alukkeiden ja nukleotidien sekvenssit olivat seuraavat:  
*DYS14* forward: 5'-GGG CCA ATG TTG TAT CCT TCT C-3'  
*DYS14* reverse: 5'-GCC CAT CGG TCA CTT ACA CTT C-3'  
*DYS14* probe: 5'-TCT AGT GGA GAG GTG CTC-3. (Zimmermann B ym. 2005)

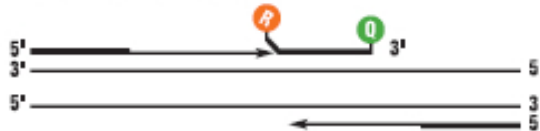
Seuraavassa vaiheessa lämpötilaa nostetaan jälleen, nyt siten että olosuhteet muuttuvat suotuisiksi DNA-polymeraasientsyymille. DNA-polymeraasi tunnistaa DNA-juosteeseen kiinnittyneet alukkeet ja alkaa syntetisoida forward primeristä eteenpäin ja reverse primeristä taaksepäin yksijuosteisen DNA:n rinnalle uutta juostetta emäspariperiaatteen mukaan. Tarvittavat nukleotidit uuden DNA:n muodostamiseen on lisätty näytelevyn kuoppaan yhdessä muiden reaktiokomponenttien kanssa. Koettimet ovat myöskin lyhyitä DNA-pätkiä, mutta niihin on liitetty fluoresoiva molekyyli. Koettimien tehtävänä on tunnistaa näytteessä monistuvaa DNA:ta ja mahdollistaa sen havaitsemisen laitteella. Kun DNA-polymeraasi syntetisoi uutta DNA-juostetta yksijuosteisen DNA:n rinnalle, se kohtaa juosteeseen liittyneen koettimen, syrjäyttää sen ja tämän seurauksena koettimeen liitetty molekyyli vapautuu ja alkaa lähettää fluoresenssia, jonka laite havaitsee. (Kuva 1)

## TAQMAN® PROBE-BASED ASSAY CHEMISTRY

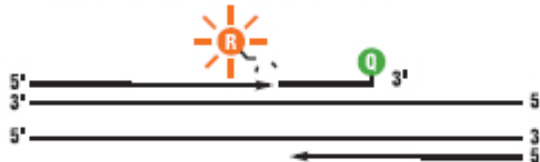
1. **Polymerization:** A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan® probe, respectively.



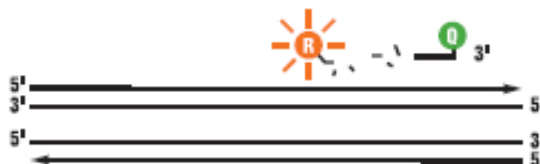
2. **Strand displacement:** When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. **Cleavage:** During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



4. **Polymerization completed:** Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.



**Kuva 1** DNA:n monistaminen PCR:llä, Taqman-menetelmällä. Lähde: [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)

Yhden syklin aikana monistettava DNA siis kaksinkertaistuu ja kun syklejä kertyy useita kymmeniä DNA:n määrä kasvaa eksponentiaalisesti samoin kuin näytteestä syntyvän fluoresenssin määrä. Laitteeseen on asetettu tietty kynnsarvo fluoresenssille, jonka ylittyminen tulkitaan positiiviseksi signaaliksi. Mitä suurempi määrä monistettavaa DNA:ta alkuperäisessä näytteessä on, sitä vähemmän syklejä tarvitaan tuottamaan fluoresoivaa säteilyä kynnsarvon ylittämiseen. Tätä syklien määrää kuvaamaan laite antaa jokaiselle näytteelle arvon, jota kutsutaan Ct-arvoksi. (Life Technologies: Real Time PCR (qPCR))

Kun asetetaan näytteiksi standardiliuoksia, joiden DNA-pitoisuudet tiedetään, voidaan niistä saatujen Ct-arvojen perusteella muodostaa standardisuora. Standardisuoran avulla voidaan sitten selvittää jokaisen tutkittavan näytteen Ct-arvoa vastaava DNA-pitoisuus.

#### Taulukko 1.

Tutkimuksessa qPCR-reaktioon vaadittavat komponentit ja niiden määrät

Reaktion komponentit	Tilavuus (µl)
TaqMan universal PCR Master Mix	10
Reverse Primer	0,8
Forward Primer	0,8
Probe	0,8
DNA + vesi	7,6
Yhteensä	20

Käytimme tutkimuksessamme ABI Prism 7900 qPCR-laitetta ja 96-kuoppaista levyä. Negatiivisena kontrollina käytimme steriloitua vettä. Standardisuoran muodostamiseen käytettiin miesperäistä DNA:ta, joiden tunnetut DNA-pitoisuudet olivat: 1 ng/µl, 0,1 ng/µl, 0,01 ng/µl, 0,001 ng/µl ja 0,0001 ng/µl. Jokainen näyte analysoitiin kolmeen kertaan tulosten luotettavuuden parantamiseksi. Analysointia varten kuhunkin näytelevyn kuoppaan pipetoitiin yhteensä 90 nanogrammaa tutkittavaa DNA:ta. Kun

näytteiden DNA-pitoisuudet oli määritetty, laskimme pitoisuuksien perusteella kuinka paljon ( $\mu\text{l}$ ) kutakin näytettä tarvitaan analysointiin. Tilavuudet vaihtelivat 1,5 ja 7,6 mikrolitran välillä. Lisäsimme näytteisiin steriloitua vettä, niin että kaikkien kuoppalevyjen pohjalle tuleva lopullinen kokonaistilavuus oli sama. Forward ja reverse primerien pitoisuudet olivat molempien 500 nmol/l ja proben 250 nmol/l. Lisäksi lisättiin TaqMan universal PCR Master Mix -liuosta, joka on laitteen valmistajan tuottama seos sisältäen muun muassa DNA-polymeraasia, nukleotidejä sekä muutamia muita reaktion vaatimia ioneja ja entsyymejä. Reaktioon vaadittavien komponenttien määrät löytyvät taulukosta 1.

### 2.2.3 Tilastollinen käsittely

qPCR-menetelmällä saimme määritettyä jokaisesta näytteestä sen *DYS14* -geenisekvenssiä vastaavasta DNA:n pitoisuudesta kertovan kopioluvun. Jokainen näyte analysoitiin kolmeen kertaan ja valitsimme tulokseksi kahden lähimpänä toisiaan olevan Ct-arvon keskiarvon. Muodostimme tuloksista numeerisen muuttujan, joka kertoo kuinka monta kopiolukua *DYS14* -geeniä on yhdessä millissä kokoverta. Koska tutkittu geeni on kuitenkin monikopioinen, eikä sen määrä tämän vuoksi korreloi suoraan fetaalisen mikrokimerismin solujen määrään, päätimme käyttää analyyseissämme luokiteltua muuttujaa, jossa arvon 0 (*DYS14* -negatiivinen) saivat ne näytteet, jotka eivät antaneet yhtään kopiolukua ja arvon 1 (*DYS14* -positiivinen) ne näytteet, joissa kopiolukuja oli 1 tai enemmän.

qPCR-analysoinnin tuloksia verrattiin tutkimushenkilöistä kerättyihin tietoihin heidän sairastamistaan kroonisista sairauksista ja verestään mitattujen



tulehdustekijöiden tasoista. Lisäksi tutkimme korreloivatko analysoinnin tulokset neljän vuoden kuolleisuusseurantatietoihin. Tulehdustekijöistä verrattavana olivat seuraavien muuttujien pitoisuudet: interleukiinit 6 ja 7, C-reaktiivinen proteiini, immunoglobuliinit A, G ja M, joista lisäksi immunoglobuliinin G eri alayksiköt 1-4 erikseen mitattuina sekä IDO-aktiivisuus (kynureiinin suhde tryptofaaniin). Kroonisista sairauksista käytettävissämme olivat tiedot potilailla diagnosoiduista syövästä, tiedot dementioista, depressiosta, reumasairauksista sekä sydän- ja verisuonisairauksista. Syöpätaudeista tutkimme lisäksi erikseen yhteyttä rintasyöpään tai muuhun kuin rintasyöpään.

Tutkimme eri muuttujien riippuvuutta *DYS14* -positiivisuuteen käyttämällä Mann-Whitneyn U-testiä tutkittavan muuttujan ollessa numeerinen. Kun molemmat muuttujat olivat luokiteltuja, käytimme ristiintaulukointia. Tilastolliseen testaukseen käytimme  $X^2$ -riippumattomuustestiä ja mikäli testin käyttöedellytykset eivät täytyneet käytimme Fisherin Exactia testiä. Kuolleisuuden ja fetaalisen mikrokimerismin välisen yhteyden tarkastelemiseen neljän vuoden seuranta-aikana käytimme Coxin regressioanalyysiä. Tilastollinen analysointi suoritettiin käyttämällä SPSS-ohjelmaa (SPSS Statistics version 20, SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Tilastollisesti merkitsevänä pidettiin P:n arvoa <0,05.

### 3 TULOKSET

Aineistossamme *DYS14* -geenin kopiolukujen määrä millissä kokoverta vaihteli 0 ja 3682 välillä. Keskiarvo koko kohortissa oli 39 kopiolukua. Fetaalisen mikrokimerismin esiintyvyys, kun sitä mitattiin selvittämällä *DYS14* -geenin olemassaoloa näytteissä, oli aineistossamme 19,1 % (39 positiivista, N = 204).

Kuolleisuus neljän vuoden seuranta-aikana tutkimusjoukossamme oli 56,4 % (N = 115/204). Fetaalisen mikrokimerismin ja kuolleisuuden välillä ei löytynyt merkitsevää yhteyttä, kun sitä tarkasteltiin neljän vuoden seuranta-aikana käyttämällä Coxin regressioanalyysia (p = 0,406; 95 %:n luottamusväli 0,757 - 1,988).

#### Taulukko 2.

*DYS 14* –positiivisuuden riippuvuus tulehdustekijöistä N= 204.

Tulehdustekijät	P-arvo <sup>a</sup>
CRP	0,546
IDO	0,080
IgA	0,630
IgG	0,693
IgG1	0,398
IgG2	0,864
IgG3	0,689
IgG4	0,142
IgM	0,914
IL-6	0,545
IL-7	0,346

<sup>a</sup> Mann-Whitney U-testi

Lyhenteet: CRP, C-reaktiivinen proteiini; IDO, indoliamiini-2, 3-dioksigenaasi -aktiivisuus; Ig, immunoglobuliini; IL, interleukiini; TNF- $\alpha$ , tuumorinekroositekijä alfa.

Eri tulehdustekijämarkkereista ei löytynyt merkitsevää yhteyttä fetaaliseen mikrokimerismiin aineistossamme. (Taulukko 2)

Kroonisten sairauksien tiedot olivat saatavilla 184 tutkittavalta (N = 204). Kroonisista sairauksista havaittiin riippuvuus fetaalisen mikrokimerismin ja syövän välillä ( $X^2 = 4,240$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,039$ ). Koska rintasyöpää sairastavia oli tutkimusjoukossamme vain 10 henkilöä, emme saaneet osoitettua mahdollista yhteyttä rintasyövän ja fetaalisen mikrokimerismin välillä (kaksisuuntaisen Fisherin Exact testin p-arvo = 0,098). Muuta syöpää kuin rintasyöpää sairastavien joukossa yhteys säilyi (kaksisuuntaisen Fisherin Exact testin p-arvo = 0,034) pysyen myöskin saman suuntaisena kuin osoitettu yhteys syöpää sairastavilla. Tutkimuksessamme havaittiin siis, että fetaalinen mikrokimerismi näyttäisi olevan yleisempää syöpää sairastavilla. (Taulukko 3)

**Taulukko 3.**

**Fetaalisen mikrokimerismin ja syövän esiintyminen.**

	DYS 14 -positiivinen		DYS 14 -negatiivinen		Yhteensä
	n	%	n	%	
Syöpä	10	28,6	21	14,1	31
Ei syöpää	25	71,4	128	85,9	153
Yhteensä	35	100	149	100	

## 4 POHDINTA

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää fetaalisen mikrokimerismin mahdollisia vaikutuksia äidin elimistössä. Fetaalisen mikrokimerismin osoittamiseksi selvitimme 90-vuotiailta naisilta qPCR -menetelmää käyttäen, löytyykö heidän verestään Y-kromosomaalista *DYS14* -geenisekvenssiä. Tarkoituksenamme oli selvittää löytyykö fetaalisen mikrokimerismin ja kuolleisuuden, tulehdustekijätasojen tai kroonisten sairauksien väliltä merkitsevää yhteyttä. Omassa aineistossamme fetaalisen mikrokimerismin esiintyvyys oli 19,1 %. Aiemmin julkaistuissa tutkimuksissa vastaavat esiintyvyyksiluvut ovat vaihdelleet 23 ja 64 prosentin välillä (Boyon ym. 2011). Tutkimustulostemme mukaan fetaalinen mikrokimerismi ei näyttäisi selittävän kuolleisuutta neljän vuoden seuranta-aikana 90-vuotiailla naisilla. Emme havainneet myöskään yhteyttä tulehdustekijöiden tasojen ja fetaalisen mikrokimerismin välillä. Tutkimukseen osallistuneiden sairastamista kroonisista sairauksista havaitsimme merkitsevän yhteyden fetaalisen mikrokimerismin sekä syöpäsairauksien välillä.

Aiemmissä tutkimuksissa sekä kirjallisuudessa on esitetty hypoteeseja fetaalisen mikrokimerismin merkityksistä. Erään hypoteesin mukaan allogeeniset immuunijärjestelmän solut voisivat olla vieraassa elimistössä hyödyksi lisäämällä äidin immuunipuolustuksen vahvuutta esimerkiksi taistelussa syöpää vastaan. Muutamissa tutkimuksissa on osoitettukin, että muun muassa kilpirauhas-, kohdunkaulan ja rintasyöpää sairastavien potilaiden verenkierrossa on vähemmän fetaalisia soluja kuin terveillä verrokeilla. (Boyon

ym. 2011, Fugazzola ym. 2011) Voisiko fetaalinen mikrokimerismi näin ollen siis suojata syövältä? Tilastojen perusteella tiedetään myös, että pariteetilla on suojaava yhteys muun muassa rintasyöpään, Hodginin sekä Non-Hodginin lymfoomaan, myeloidiseen leukemiaan, krooniseen lymfaattiseen leukemiaan, virtsarakon-, peräsuolen-, munasarja- ja haimasyöpiin sekä aivokasvaimiin (Gadi 2009).

Omassa tutkimuksessamme havaitsimme kuitenkin, että syöpää sairastavien verenkierrosta oli osoitettavissa enemmän fetaalista mikrokimerismiä kuin terveiden (32 % vs. 16 %). Tämä tutkimustulos on siis vastakkainen aikaisempiin tutkimuksiin verrattuna. Esimerkiksi erään tapaus-verrokkitutkimuksen mukaan rintasyöpää sairastavien verenkierrossa oli vähemmän fetaalisia soluja kuin terveillä verrokeilla (14 % vs. 43 %) (Gadi VK ja Nelson JL 2007). Meidän tutkimuksemme tulosten mukaan siis näyttäisi siltä, että fetaaliset solut äidin verenkierrossa voisivat mahdollisesti lisätä potilaan riskiä sairastua syöpään sen sijaan, että se olisi suojaava tekijä niin kuin aikaisemmin on ajateltu. Jonkin verran samansuuntaisia tutkimustuloksia kuin meidän tutkimuksessamme on myös julkaistu, mutta useimmissa niissä on vertailtu fetaalisten solujen määrää syöpää sairastavien ja terveiden verrokkien kudoksissa verinäytteiden sijaan. Niiden mukaan maligneista kasvaimista otetuista kudoksenäytteistä on osoitettu enemmän fetaalista mikrokimerismiä kuin vastaavista terveistä kudoksista. (Boyon ym. 2011) Mistä tämä havainto voisi kertoa? Johtuuko sikiön alkuperä olevien solujen konsentroituminen kasvainkudokseen ja sen ympäristöön siitä, että ne ovat immuunipuolustuksen soluja paikalla lisävahvistuksena puolustautumassa syöpää vastaan vai ovatko sikiön solut äidille vahingollisia, ollen mahdollistamassa ympäristöä kasvaimen kasvulle suotuisaksi? On voitu osoittaa, että fetaaliset solut kudoksissa kykenevät erilaistumaan ja ilmentämään

samoja pintamarkkereita kuin äidin omatkin solut. (Fugazzola ym. 2011) Tällöin esimerkiksi strooman elementeiksi erilaistuessaan solut voivat edesauttaa karsinogeneesiä tuottamalla erilaisia kasvutekijöitä tai toisaalta sikiön alkuperää olevat hematopoieettiset solut voivat erilaistuessaan regulatorisiksi T-soluiksi mahdollisesti olla edistämässä syövän kasvun kannalta suotuisaa immuunisuppressiota. (Boyon ym. 2011) Toistaiseksi ei vielä ole voitu selvittää sikiön solujen todellista merkitystä ja vaikutusta.

Tiedetään, että fetaalinen mikrokimerismi on yleinen ja pitkäkestoinen ilmiö. Aiemman tutkimustiedon valossa on puhuttu sen säilymisestä vuosikymmeniä raskauden jälkeen. Tutkimuksemme osoittaa, että vielä 90-vuotiaitakin voidaan osoittaa fetaalista DNA:ta verenkierrosta. Meidän aineistossamme fetaalisen mikrokimerismin esiintyvyys osoittautui kuitenkin matalammaksi kuin aikaisemmissa tutkimuksissa. Omassa tutkimuksessamme emme tienneet tutkimukseen osallistuneiden naisten pariteettia emmekä heidän synnyttämien poikalasten lukumääriä. Koska kyseisiä tietoja ei ollut saatavissa, emme voi olla varmoja vastaako fetaalisen mikrokimerismin esiintyvyys aineistossamme mahdollista todellista odotettua lukemaa. Vaikutuksensa voi olla myös sillä, että määritettäessä niin pieniä DNA-määriä kuin fetaalista mikrokimerismiä tutkittaessa liikutaan PCR:n erotuskyvyn äärirajoilla. Tällöin osa signaaleista voi hukkuu taustakohinaan ja virheellisten tulosten mahdollisuus on olemassa. Matalahkoon fetaalisen mikrokimerismin esiintyvyyteen tutkimuksessamme saattaa olla vaikutusta myös sillä, että tutkittavat henkilömme ovat vanhempia kuin aiemmin julkaistuissa tutkimuksissa. Tutkimuksemme koehenkilöt olivat 90-vuotiaita. Voisiko olla niin, että jostain syystä sellaiset henkilöt, joilla on sikiön alkuperää olevia soluja elimistössään saavuttavat epätodennäköisemmin 90 vuoden iän kuin ne, joilla sitä ei ole? Omassa tutkimuksessamme emme

kuitenkaan saaneet merkitsevää yhteyttä fetaalisen mikrokimerismin ja kuolleisuuden välille eikä sitä ole tiettävästi tutkittu aikaisemmin, mutta voimme pohtia, oliko tutkimuksessamme käytetty neljän vuoden seuranta-aika riittävä ja toisaalta näkyisikö yhteyttä jos sitä tutkittaisiin hieman nuoremmissa ikäluokissa.

Tarvitaan lisää tutkimuksia, jotta saataisiin selvitettyä mitä vaikutuksia fetaalisella mikrokimerismillä on äidin terveydelle. Useissa tutkimuksissa on siis havaittu, että jonkinlainen yhteys lienee fetaalisen mikrokimerismin ja maligniteettien välillä, mutta tällä hetkellä tulokset ovat vielä ristiriitaisia jopa siitä, onko vaikutus äidin terveyden kannalta myönteinen vai kielteinen. Suuremmilla aineistoilla ja pidemmällä seuranta-ajoilla kuin meidän tutkimuksessamme voitaisiin saada lisää selvyyttä asiaan.

# LÄHTEET

Boyon C, Collinet P, Boulanger L, Rubod C, Lucot JP ja Vinatier D. Fetal microchimerism: benevolence or malevolence for the mother?. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, & Reproductive Biology* 2011;158:148-52.

Cesarini D, Lindqvist E ja Wallace B. Is there an adverse effect of sons on maternal longevity?. *Proceedings of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences* 2009;276:2081-4.

Fugazzola L, Cirello V ja Beck-Peccoz P. Fetal microchimerism as an explanation of disease. *Nature Reviews Endocrinology* 2011;7:89-97.

Gadi VK ja Nelson JL. Fetal microchimerism in women with breast cancer. *Cancer Res* 2007;67:9035-8.

Gadi VK. Fetal microchimerism and cancer. *Cancer Lett* 2009;276:8-13.

Gammill HS ja Nelson JL. Naturally acquired microchimerism. *Int J Dev Biol* 2010;54:531-43.

Goebeler S, Jylha M ja Hervonen A. Medical history, cognitive status and mobility at the age of 90. A population-based study in Tampere, Finland. *Aging-Clinical & Experimental Research* 2003;15:154-61.

Helle S, Lummaa V ja Jokela J. Sons Reduced Maternal Longevity in Preindustrial Humans. *Science.Environmental Microbiology* 2002;296:1085.

Hurme M. Vanhusten immunitetti. *Duodecim* 2013;129:1878-85.

Khosrotehrani K ja Bianchi DW. Multi-lineage potential of fetal cells in maternal tissue: a legacy in reverse. *J Cell Sci* 2005;118:1559-63.

Liegeois A, Escourrou J, Ouvre E ja Charreire J. Microchimerism: a stable state of low-ratio proliferation of allogeneic bone marrow. *Transplant Proc* 1977;9:273-6.



Lo YM, Tein MS, Lau TK, ym. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768-75.

Nelson JL. The otherness of self: microchimerism in health and disease. *Trends Immunol* 2012;33:421-7.

O'Donoghue K, Chan J, de la Fuente J, ym. Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy. *Lancet* 2004;364:179-82.

qPCR Education. (Real-Time PCR (qPCR) Life Technologies.  
[www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com))

Zhong XY, Holzgreve W ja Hahn S. Direct quantification of fetal cells in maternal blood by real-time PCR. *Prenat Diagn* 2006;26:850-4.

Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaides K, Holzgreve W ja Hahn S. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2005;51:1598-604.