

Karlova Univerzita v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra Antropologie a genetiky člověka



Bc. Petra Pírková

Fetální mikrochimérismus u gynekologických malignit

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Ilona Hromadníková, Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení

Já, níže podepsaná Petra Pírková tímto prohlašuji, že jsem tuto práci napsala sama a na základě uvedené literatury pod vedením své školitelky doc. RNDr. Ilony Hromadníkové, Ph.D. Tato práce ani její části nikdy nebyla použita k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

V Praze 22.4. 2012

Podpis:.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Iloně Hromadníkové, Ph.D. a mé kolegyni v laboratoři Mgr. Kateřině Kotlabové za zasvěcení do projektu a participaci na sběru a analýzách vzorků tkání pro moji diplomovou práci.

Výzkum, který jsem prováděla na Univerzitě Karlově v Praze v České republice, byl finančně podpořen grantem 262704/SVV/2011 a MSM 0021620806.

Abstrakt

Existence fetálního mikrochimérismu byla prokázána před mnoha lety. Tento fenomén je spojen s pozorováním, že v jednom jedinci jsou přítomny dvě nebo více geneticky odlišné populace buněk. Fetální mikrochimérismus vzniká přirozeně v průběhu každého těhotenství obousměrným přechodem buněk přes placentu z plodu do matky (fetální mikrochimérismus) a z matky do plodu (maternální mikrochimérismus). U některých žen jsou fetální buňky detekovány i desítky let po ukončení těhotenství. Ve své práci jsem prokázala přítomnost fetálního mikrochimérismu ve tkáních nádorů endometria, prsu a ovaria a také v tkáních kontrolních, bez malignizace. Pracovala jsem s tkáněmi hluboce zmraženými, nativními a buněčnými kulturami vytvořenými z nativních tkání. Původně měly být analyzovány také tkáně zalité v parafínu, které se ovšem ukázaly jako nevhodný typ vzorku pro detekci fetálních buněk. Naopak nativní a hluboce zmražené tkáně nádorů a kontrol jsou pro tento typ výzkumu vhodné a fetální mikrochimérismus byl v části vzorků nalezen. K detekci a amplifikaci extrahované DNA z tkání a buněčných kultur jsem použila kvantitativní PCR v reálném čase a jako marker fetálních buněk gen *SRY* nacházející se na Y chromozomu. Detekovala jsem tak přítomnost fetálních mužských buněk. Fetální genom byl nalezen jak v tkáních nádorů, tak ve tkáních kontrol. Častěji byl gen *SRY* detekován u kontrol ve srovnání s nádory endometria. V nádorech endometria byl naopak kvantitativně vyšší počet kopií genu *SRY* ve srovnání s kontrolními tkáněmi. Pomocí statistických testů jsem prokázala, že nádory endometria s horší prognózou (G3) mají signifikantně vyšší koncentraci fetálního mikrochimérismu ve srovnání s nádory s lepší prognózou (G1). V budoucnu by se mohla míra fetálního mikrochimérismu v nádorech endometria stát jedním z prognostických údajů. Vztah mezi fetálním mikrochimérismem a stadiem nádoru endometria, věkem pacientek a kontrol v době odebrání vzorku, četností gravidity a BMI nebyl nalezen.

Klíčová slova: fetální mikrochimérismus, gynekologické malignity, nádory endometria, kvantitativní PCR v reálném čase

Key words: fetal microchimerism, gynecologic malignancies, endometrial cancer, quantitative real-time PCR

Obsah

Zkratky.....	7
1. Úvod.....	8
2. Mikrochimérismus	10
2.1 Vznik fetálního mikrochimérismu	11
2.1.1 Původ a typy fetálních mikrochimérických buněk	14
2.1.2 Perzistence fetálního mikrochimérismu.....	18
2.2 Fetální mikrochimérismus v krevní plazmě a séru	19
2.3 Fetální mikrochimérismus a autoimunitní onemocnění.....	21
2.4 Fetální mikrochimérismus a nádorová onemocnění	24
2.4.1 Fetální mikrochimérismus a nádory prsu.....	24
2.4.2 Fetální mikrochimérismus a nádory děložního hrdla	27
2.4.3 Fetální mikrochimérismus a nádory štítné žlázy	28
2.4.4 Fetální mikrochimérismus a další typy malignit.....	29
3. Charakterizace a klasifikace gynekologických malignit	32
3.1 Nádory endometria	32
3.2 Nádory prsu.....	34
3.3 Nádory vaječníků.....	35
3.4 Klasifikace gynekologických nádorů.....	36
3.4.1 TNM klasifikace 2009	36
3.4.1.1 Nádory endometria	36
3.4.1.2 Nádory prsu.....	39
3.4.1.3 Nádory vaječníků.....	42
4. Metody detekce fetálních buněk	44
4.1 Kvantitativní PCR v reálném čase	44
4.2 Fetální marker	45

5. Cíle práce	48
6. Materiál a metody	49
6.1 Materiál	49
6.1.1 Hluboce zmražené tkáně	49
6.1.2 Nativní tkáně	50
6.1.3 Kultivované tkáně	54
6.1.4 Tkáně v parafínových blocích	56
6.2 Metody	56
6.2.1 Izolace DNA	56
6.2.2 Kvantitativní PCR v reálném čase	57
6.2.3 Kvantifikace a statistická analýza	61
7. Výsledky	63
7.1 Hluboce zmražené tkáně	63
7.2 Nativní tkáně	64
7.3 Buněčné kultury	66
7.4 Statistické zhodnocení výsledků	67
8. Diskuze	77
9. Závěr	80
Literatura	81
Přílohy	93

Zkratky

CAM	(cell adhesion molecule) buněčná adhezivní molekula
CD31	povrchový marker endoteliálních buněk
CD34	povrchový marker hematopoetických kmenových buněk
CD38	povrchový marker B-lymfocytů a NK buněk
CD45	povrchový marker leukocytů
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>DYS-14</i>	sekvence, která je součástí lidského Y-specifického genu TSPY
EGFP	zelený fluorescenční protein
FACS	(fluorescence-activated cell sorting) průtoková cytometrie
FIGO	(International Federation of Gynaecology and Obstetrics) Mezinárodní federace gynekologie a porodnictví
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FM	fetální mikrochimérismus
FMC	fetální mikrochimérické buňky
<i>GLO</i>	gen pro β -globin
HLA	(human leukocyte antigen) komplex genů lidských leukocytárních antigenů
HSC	hematopoetické kmenové buňky
MSC	mezenchymální kmenové buňky
PBMC	periferní krevní mononukleární buňky
PCR	polymerázová řetězová reakce
<i>SRY</i>	gen určující mužské pohlaví
STR	(short tandem repeats) krátké tandemové repetice

1. Úvod

Mikrochimérismus je fenomén vznikající přirozeně během každého těhotenství, ale také po transfuzi krve, transplantaci orgánů nebo přenosu buněk mezi dvojčaty. Jedná se o stav, kdy v jednom jedinci existují současně dvě nebo více geneticky odlišných populací buněk. Fetální mikrochimérismus je také podmíněn přítomností extracelulárních nukleových kyselin v plné krvi. Tyto extracelulární nukleové kyseliny, které se nacházejí v apoptotických tělískách trofoblastu se využívají k neinvazivní prenatalní diagnostice. Termín fetální mikrochimérismus vystihuje jeden z „typů“ mikrochimérismu, kdy buňky plodu jsou trvale nebo dočasně usídleny a také nacházeny v krevní cirkulaci a tkáních matky. Tyto buňky překonávají bariéru mezi matkou a plodem a dostávají se do jejího těla. Jedná se o kmenové a progenitorové buňky, které se nejprve přihojí v kostní dřeni matky, kde se množí a následně se uvolňují do krevní cirkulace a dostávají se do tkání. V tkáních matky se dokáží podle potřeby diferencovat do konečných fenotypů a mohou tak zastávat rozličné funkce v hostitelském organismu.

Existují protichůdné teorie, které hovoří buď o protektivní roli mikrochimérismu či naopak o „špatném“ mikrochimérismu. Fetální mezenchymální kmenové buňky v těle matky mohou zřejmě napomáhat při reparaci poškozených tkání, ale také je možné, že fetální endotelové progenitorové buňky podporují angiogenezi, tedy vznik nových cév. V prvním případě by mikrochimérismus byl vítaný a žádoucí a těhotenství by se s trochou nadsázky stalo velmi výhodnou formou „reparace“ organismu ženy. Nicméně je pravděpodobné, že některé mikrochimérické buňky podporují angiogenezi, tím napomáhají lepšímu zásobování nádoru kyslíkem a živinami, což v důsledku napomáhá dalšímu růstu nádoru. V tomto případě by se těhotenství naopak stalo rizikovým faktorem při budoucím vzniku nádorových onemocnění.

Přítomnost fetálních buněk v těle matky a to především v krevním oběhu je ovšem velmi výhodná vzhledem k možnostem aplikace neinvazivní prenatalní diagnostiky. Možnost zcela opustit invazivní vyšetření, jakými jsou například amniocentéza, je velmi lákavá jak pro lékaře, tak pro pacientky. Riziko potratu by bylo v podstatě nulové, jelikož veškeré potřebné analýzy pro diagnostiku by se prováděly na krevních vzorcích, které se získají velmi snadno a téměř bezbolestně odběrem periferní krve těhotné ženy. Prozatím se

v laboratořích po celém světě pracuje na optimalizaci metod, které by toto umožnily a zajistily spolehlivé výsledky. Neinvazivní prenatální diagnostika nicméně není jediným důvodem proč je fetální mikrochimérismus velmi intenzivně zkoumán. Fetální mikrochimérismus je už řadu let vyšetřován také ve spojitosti s autoimunitními chorobami a nádorovými onemocněními. Zatímco u některých autoimunitních chorob se spojitost prokázala, u různých typů nádorových onemocnění se výsledky různí.

Ve své práci jsem proto zkoumala přítomnost fetálního mikrochimérismu u maligních nádorů endometria, prsu a ovaria a tyto výsledky jsem porovnávala s kontrolní skupinou žen, které netrpěly námi zkoumaným typem nádorového onemocnění. Také jsem se pokusila zodpovědět jakou roli fetální mikrochimérismus hraje v patogenezi těchto typů malignit.

2. Mikrochimérismus

Přítomnost a dlouhodobé přetrvávání fetálních buněk v tkáních myších samic bylo poprvé objeveno před cca 30 lety. Nicméně teprve po mnoha letech byl výskyt a možné důsledky fetomaternálního buněčného přenosu u lidí plně doceněn. Fetální mikrochimérismus je v dnešní době aktivně zkoumán. Existují protichůdná data a mnoho hypotéz ohledně toho, zda je mikrochimérismus výhodný či naopak může být příčinou patologických stavů, např. autoimunitních chorob nebo nádorových onemocnění (Johnson a Bianchi, 2004).

Termín mikrochimérismus byl navržen pro popis zjevně dlouhodobě přežívajících a proliferujících alogenních fetálních buněk v myši samici aniž by byla vyvolána reakce štěpu proti hostiteli nebo rejekce (Liégeois, *et al.*, 1977). Mikrochimérismus označuje stav, ve kterém jsou přítomny dvě nebo více geneticky odlišných populací buněk v jednom jedinci nebo orgánu (Kallenbach, Johnson, Bianchi, 2011). Tento fenomén může vzniknout při transfuzi krve nebo krevních produktů, po transplantaci orgánů či během těhotenství. Fetální mikrochimérismus může být prokázán i desítky let po těhotenství (Bianchi *et al.*, 1996). Mikrochimérismus vzniká přirozeně v těhotenství, obousměrným přestupem buněk z plodu do matky a naopak z matky do plodu. K tomu dochází během každého těhotenství. Nicméně kvantitativně větší transfer je ve směru z plodu do matky (Lo *et al.*, 2000). Studie Lambert *et al.* (2002) prokázala mužské buňky zřejmě fetálního původu u 30-50% zdravých žen, které očekávaly syna. Je pravděpodobné, že určité minimální množství fetálních buněk v mateřské cirkulaci může být nezbytné pro udržení těhotenství (Artlett, 2005).

Fetální mikrochimérismus byl prokázán u všech těhotenství (Ariga *et al.*, 2001; Krabchi *et al.*, 2001). Ztráta plodu, přirozeným potratem v rané fázi těhotenství nebo po podstoupení interrupce je signifikantně spojena s přítomností mikrochimérismu. Fetomaternální buněčný přenos bezprostředně následující po ztrátě plodu může být důležitý pro přihojení mikrochimérických buněk v mateřské tkáni. Možným viníkem je zvýšený fetomaternální přenos buněk nebo určitých buněčných typů, které se lépe přihojí (Khosrotehrani *et al.*, 2003; Bianchi *et al.*, 2001). Tento fakt byl nedávno potvrzen na myším modelu (Johnson *et al.*, 2010). Umělé přerušování těhotenství je spojeno s vyšší

frekvencí a koncentrací fetálního mikrochimérismu než u spontánního potratu (Yan *et al.*, 2005).

Vznik a role fetálního mikrochimérismu v těle matky je aktivně zkoumána po celém světě. Doposud byla prokázána přítomnost fetálních buněk v různých tělních tekutinách, orgánech a tkáních matek, např. v krevní plazmě, séru, v kostní dřeni, v tkáních srdce, štítné žlázy, plic, prsů atd. Ve své práci jsem prokázala přítomnost fetálních buněk také ve tkáních endometria, prsu a ovaria a částečně jsem prozkoumala roli fetálního mikrochimérismu v patogenezi těchto nádorů.

V laboratořích po celém světě je zkoumán také vztah fetálního mikrochimérismu a různých onemocnění, především autoimunitních onemocnění a nově i nádorových onemocnění. Existují dvě ústřední hypotézy role fetálního mikrochimérismu v těle matky. Hypotéza „špatného“ mikrochimérismu tvrdí, že buňky plodu mohou být příčinou řady autoimunitních chorob, iniciátorem nádorového bujení a rovněž, že mají souvislost s komplikacemi v těhotenství, jako např. pre-eklampsie, předčasný porod a další. První hypotézu vyslovil Nelson (1996). Tato hypotéza naznačuje, že mikrochimérismus získaný během těhotenství vede k reakci štěpu proti hostiteli a že imunitní odpověď fetálních buněk na buňky hostitele může přispět k patogenezi autoimunitních chorob po porodu. Věrohodnost této teorii dodává i všeobecně vyšší frekvence autoimunitních chorob u žen na rozdíl od mužské populace a věkově specifická incidence u některých onemocnění. Hypotéza špatného mikrochimérismu je podporována studii vybraných autoimunitních chorob, v jejichž patogenezi zřejmě mikrochimérismus sehrává svou roli. Jedná se například o systémovou sklerodermii, systémový lupus erythematosus, primární biliární cirhózu, autoimunitní onemocnění štítné žlázy a juvenilní myositidu. Nicméně, mikrochimérické buňky mohou být pro matku i přínosem. Tzv. hypotéza „dobrého“ mikrochimérismu má za to, že fetální buňky se mohou podílet na regeneračních a reparačních procesech tkání matky poškozených zánětem (Cirello *et al.*, 2010).

2.1 Vznik fetálního mikrochimérismu

Existence fetálního mikrochimérismu byla prokázána. Nabízí se otázka, jak k tomuto stavu dochází. Na běžné hodině biologie je placenta prezentována jako téměř nepropustná bariéra mezi matkou a plodem, chránící ještě nenarozené dítě před škodlivinami, které by

mohly být přítomny v krvi matky. V dnešní době se už ví, že přes tuto bariéru mohou přestupovat buňky a to dokonce oběma směry, z matky do plodu a z plodu do matky. Fetální mikrochimérické buňky jsou poté detekovány v krvi a tkáních matek a to i desítky let po narození potomka (Bianchi *et al.*, 1996).

Přesný proces, jak fetální buňky tuto překážku zdolávají, není prozatím zcela vyjasněn. Nicméně, se zdá, že hlavním mechanismem jsou fetomaternální hemoragie (O'Donoghue, 2006). Fetomaternální hemoragie (FMH) představuje stav, při kterém dochází k průniku krve plodu do mateřského krevního oběhu, poté co dojde ke ztrátě integrity normální fyziologické bariéry mezi cirkulací plodu a matky. Pozitivní fetomaternální arterio-venózní tlakový gradient způsobuje, že fetální erytrocyty a další fetální buněčné typy pronikají do mateřské cirkulace, odkud se pak dále mohou šířit do orgánů matky. Nejčastěji k FMH dochází během porodu, nicméně se tak děje i během různých událostí v těhotenství, například amniocentéza, odběr choriových klků (CVS), kordocentéza, redukce embryí, poškození placenty, placenta praevia, dále také potrat, mimoděložní těhotenství či tupé poranění břicha (Studničková *et al.*, 2010). Místo určení fetálních kmenových buněk, které se tímto způsobem dostanou do organismu matky, je různé. Tyto buňky mohou dlouhodobě přetrvávat jak ve tkáních, tak i v krevní cirkulaci matky. Zdá se, že kmenové buňky se nejprve usídlují v kostní dřeni matky, poté se „naroubují“ do tkání a dokáží se diferencovat v různé buněčné typy, podle potřeby (Huu *et al.*, 2006). Multipotence těchto fetálních buněk pak může mít za následek ovlivnění zdraví matky. Tyto buňky mohou zasáhnout do autoimunitního zánětu nebo také do patogeneze různých typů nádorových onemocnění. Na druhou stranu mohou být mikrochimérické buňky zapojeny i v reparačních procesech poškozených tkání žen nebo mohou fungovat jako dlouhodobý rezervoár kmenových buněk (O'Donoghue, 2006).

Přesný původ fetálních buněk musíme hledat v hematopoéze plodu. V rané embryogenezi cirkulují v embryu jaderné erytroidní buňky z extra-embryonického žloutkového vaku. Postupně je tato raná cirkulace nahrazena definitivním multiliniovým krevním systémem, který osídlí játra, kostní dřev a hematopoetické tkáně. Zdá se, že kmenové buňky odvozené ze žloutkového vaku významně nepřispívají do konečného krevního systému. Místo toho je bohatým zdrojem hematopoetických kmenových buněk oblast podél aorty embrya, nazvaná aorta-gonád-mesonephros. Hematopoetické kmenové buňky migrují do jater a také osídlí další hematopoetické tkáně. Fetální stromální nebo

mezenchymální kmenové buňky se vyvinou vzhledem k hematopoetické aktivitě ve fetálních játrech, slezině a kostní dřeni a migrují z jednoho místa na další pomocí rané cirkulace a nakonec se usídlí v kostní dřeni (Marshall a Thrasher, 2001; Campagnoli *et al.*, 2001).

Hematopoetické kmenové buňky pravděpodobně vznikly z hemangioblastů, prekursorových buněk pro krevní a endoteliální buňky. Jsou definovány jejich biologickými vlastnostmi, expresí CD34 antigenu na svém povrchu a absencí markerů HLA II. třídy. V prvním trimestru obsahuje fetální krev vyšší koncentraci CD34⁺ buněk než na konci těhotenství a v druhém trimestru je jejich frekvence v krvi dítěte nejvyšší (Campagnoli *et al.*, 2000). Mezenchymální kmenové buňky neexprimují markery spojené s hematopoetickou nebo endoteliální diferenciací. Tyto kmenové buňky cirkulují v krvi plodu v relativně vysokém počtu spolu s HSC v prvním trimestru. Endoteliální buňky jakož i HSC exprimují CD34 a mohou se účastnit fetální vaskulogeneze (Gussin *et al.*, 2002). CD34⁺ buňky byly izolovány z mateřské krve, je tudíž jasné, že překonávají placentární bariéru během gravidity.

Přenos fetálního mikrochimérismu musí probíhat skrz placentární bariéru. Vývoj placenty začíná ihned po uhníždění blastocysty v endometriu dělohy. Na vzniku placenty se podílejí tkáň mateřské - těhotenské endometrium (decidua) a tkáň embryonální - trofoblast. Lidská placenta je hemochoriální orgán, to znamená, že mateřská krev přichází do přímého kontaktu s fetálními trofoblastovými buňkami, které pokrývají placentární klky. Histologické i ultrasonografické studie demonstrovaly, že mateřská krev proudí přes placentární intervilózní prostor v druhém trimestru těhotenství, ale není zcela jasné, ve kterém týdnu gravidity tento průtok začíná. Nicméně se zdá, že intervilózní mateřská cirkulace je plně ustanovena v 11. - 12. týdnu gestace a, že pouze omezené množství mateřské krve teče intervilózním prostorem před tím. To znamená, že lidská fetoplacentární jednotka se vyvíjí v prvním trimestru v prostředí s nízkou hladinou kyslíku (Burton *et al.*, 1999). Zvýšená cirkulace v intervilózním prostoru byla prokázána u nezjištěných potratů a abnormálních těhotenství (Khosrotehrani *et al.*, 2003).

Obě části placenty mají odlišný genotyp, přesto po celou dobu těhotenství dobře "spolupracují". Přestože zárodek představuje cizorodý transplantát, nevyvolává, za normálních okolností, v mateřském organismu imunitní reakci vedoucí k odhojení. Během těhotenství je potlačena imunitní odpověď matky pro ochranu a udržení alogenního plodu.

Tento stav v některých případech přetrvává i několik měsíců po porodu a také napomáhá k ustanovení mikrochimérismu (Ando a Davies, 2004). Artlett (2005) konkrétně tvrdí, že fetální kmenové buňky se naroubují do kostní dřeně matky pro udržení tolerance k semialogennímu fetoplacentárnímu transplantátu.

2.1.1 Původ a typy fetálních mikrochimérických buněk

Řada studií poukázala na možné přetrvávání fetálních progenitorových buněk po ukončeném těhotenství, po porodu či potratu. Tyto buňky se usidlují v mateřském organismu, například v poraněných tkáních, a přejímají různé fenotypy. Jedním z možných zdrojů fetálních buněk vyskytujících se v mateřském organismu je placenta, která je během těhotenství v kontaktu jak s fetálním tak i s matčíným krevním oběhem (Huu *et al.*, 2006). Fetální buňky v nejrůznějších tkáních matky mohou exprimovat epiteliální, hepatocytické, hematopoetické, renální, kardiomyocytické, gliální nebo neuronální markery jak u lidí, tak u myších modelů. Tato multipotence byla přisouzena populaci fetálních kmenových/progenitorových buněk, získaných během těhotenství. Tyto buňky nazýváme s těhotenstvím asociované progenitorové buňky (PAPC) (Huu *et al.*, 2006).

Za jeden ze zdrojů fetálních buněk je tedy považována placenta (Huu *et al.*, 2006). Nicméně studie na myším modelu prokázali přítomnost buněk plodu v různých orgánech myší samice již šestý až sedmý den gestace, kdy ještě placentární cirkulace není vyvinuta (Khosrotehrani *et al.*, 2005; Sunami *et al.*, 2010). Khosrotehrani *et al.* (2005) jasně demonstroval, že mononukleární fetální EGFP⁺ buňky jsou detekovány v různých mateřských tkáních pomocí imunofluorescenčního značení anti-GFP protilátkou. Sunami *et al.* (2010) později získal stejné výsledky. V souladu s poznatky, které získali ze studií na těhotných ženách, se u myších samic počet buněk v průběhu těhotenství neustále zvyšoval (Fujiki *et al.*, 2009). Stoupající koncentraci fetálních buněk lze vysvětlit buď pokračující migrací buněk přes placentu či proliferací buněk již přítomných v orgánech matky před šestým dnem. Fetální mikrochimérické buňky detekované v krevním oběhu samic u myší (Khosrotehrani *et al.*, 2005; Sunami *et al.*, 2010) vznikly z buněk trofoblastu, primitivního endodermu nebo epiblastu, které mohly migrovat do mateřské cirkulace brzy po uhníždění zygoty v děloze. Tato domněnka mikrochimérické buňky staví na stejnou úroveň pluripotence jako kmenové buňky embrya odvozené z vnitřní buněčné masy. Další možností je, že by mohly tyto buňky být trofoblastem schopným osvojit si morfologii

různých okolních fenotypů. To naznačuje, že fetální mikrochimérické buňky migrující v rané fázi těhotenství mohou mít vyšší diferenciační potenciál než mezenchymální a hematopoetické kmenové buňky nebo endoteliální progenitorové buňky. Fenotypizace odhalila v mateřské krvi a tkáních rozmanité typy buněk. V krevním oběhu matky byly pozorovány buněčné typy zahrnující trofoblasty, buněčné populace odvozené z CD34⁺ buňky, kmenové hematopoetické buňky, B- a T-lymfocyty, monocyty a NK buňky. V orgánech matky byly nalezeny buňky typické pro konkrétní tkáň, z nichž byly izolovány. Jedná se o hepatocyty, tubulární buňky ledvin, neurony a glie, kardiomyocyty, endoteliální buňky, thyrocyty a intestinální epitel.

Wang *et al.* (2004) ve své studii využil transgenní Sprague–Dawley krysy mužského pohlaví, které nesly zelený fluorescenční protein (EGFP) na svých buňkách. Tento protein byl použit jako marker fetálního mikrochimérismu v orgánech samice, které normálně protein EGFP neobsahovaly. Samici byl podán etanol a injekce gentamycinu, aby došlo k současnému poškození jater a ledvin. EGFP pozitivní buňky samce byly rozpoznány v mateřské cirkulaci, kostní dřeni, jako hepatocyty v játrech a v ledvinách ve formě tubulárních buněk. Z těchto výsledků je zřejmé, že fetální buňky jsou schopné migrovat z mateřské cirkulace do kostní dřeni, jater a ledvin. V orgánech jsou nacházeny jak v případě předchozího poranění ledviny nebo jater, tak i v nepoškozených tkáních, například v kostní dřeni. Přítomnost hepatocytů v orgánech samic/žen byla potvrzena i v dalších studiích (Johnson *et al.*, 2002; Khosrotehrani *et al.*, 2004; Stevens *et al.*, 2004). Johnson *et al.* (2002) analyzoval vzorky z biopsie jater odebrané ženám s hepatitidou C s využitím fluorescenční in situ hybridizace (FISH), sond specifických pro X a Y chromozom a polymerázové řetězové reakce (PCR). V biopsii jater z pacientek nakažených hepatitidou C bylo obsaženo vysoké množství mužských mikrochimérických buněk. Fetální původ těchto buněk byl zkoumán pomocí PCR amplifikace polymorfních STR sekvencí. Výsledky molekulárních analýz naznačují, že mužské buňky mohou pocházet z předchozího těhotenství. Jako první tak prokázali možnou souvislost fetálního mikrochimérismu s infekční chorobou. Khosrotehrani *et al.* (2004) rovněž našel v orgánech žen buňky nesoucí hepatocytární, ale i epiteliální a leukocytární markery. Bioptické vzorky žen, které porodily syna, zkoumal také Stevens *et al.* (2004). Tyto ženy trpěly různými chorobami poškozujícími játra, primární biliární cirhózou, hepatitidou C a jinými. Celkově mužské buňky detekovali v 36 % biopsií jater, z toho u 43 % vzorků žen trpících primární biliární cirhózou, 25 % žen s hepatitidou C a 33 % u pacientek trpících

jinou chorobou jater. Prokázali, že žádná z mužských buněk přítomných v mateřské tkáni neexprimovala CD45 a tudíž nebyla hematopoetického původu. Nicméně v 25 % biopsií byly nalezeny mužské buňky exprimující hepatocytární marker CAM 5.2.

K podobným závěrům ve své studii došli i Guettier *et al.* (2005), kteří potvrdili přítomnost mužských mikrochimérických buněk jak v tkáních žen zdravých, tak i s onemocněním. Tan *et al.* (2005) ve studii na myším modelu poukázali na přítomnost fetálních buněk v mozku samice 4 týdny po porodu. To znamená, že fetální buňky nejenže jsou schopny přenosu z plodu do matky a následné migrace do tkání, ale jsou možná schopné překonat i hematoencefalickou bariéru. Tyto buňky se usídlily v mozku, přejaly morfologii a expresi markerů svědčících o buněčných typech podobných makrofágům, neuronům, astrocytům a oligodendrocytům. Mikrochimérické buňky, pravděpodobně fetálního původu, byly detekovány i v srdci (Bayes-Genis *et al.*, 2005).

Walknowska *et al.* (1969) byla první, kdo prokázal přítomnost fetálních lymfocytů v mateřské krvi. Detekovala Y chromozom v mitogenně stimulovaných lymfocytech získaných z krve těhotných žen nosících mužský plod. Následně další vědecké skupiny demonstrovaly přítomnost zřejmě mužských lymfocytů v krvi těhotných žen jeden (Schröder *et al.*, 1974) a pět let (Ciaranfi *et al.*, 1977) po narození syna.

Fetální buňky jsou úspěšně nacházeny také ve zvířecích modelech. Mikrochimérické buňky byly objeveny v mateřské cirkulaci i ve tkáních březích myších samic již během rané embryogeneze (Khosrotehrani *et al.*, 2005; Sunami *et al.*, 2010). Buňky plodu nesly pestrou škálu markerů, hematopoetické, mezenchymální a endoteliální markery a oplývaly značnou morfologickou plasticitou. Buňky plodu byly taktéž schopny integrace do různých typů tkání. Tyto vlastnosti poskytují důkaz jejich multipotence (Lee *et al.*, 2010).

Kmenové mikrochimérické buňky mohou mít velký význam. Jejich přítomnost v těle matky v době těhotenství i poté může být jakousi přírodní terapií kmenovými buňkami. Vlastnosti kmenových buněk jsou v podstatě neomezené samoobnovování, exprese specifických markerů a schopnost dát vzniknout všem vyzrálým buňkám konkrétní linie s různým stupněm plasticity, multipotence nebo pluripotence (Domen a Weissman, 1999).

Diferenciované fetální mikrochimérické buňky v mateřských tkáních zřejmě vznikly z různých progenitorových a kmenových buněk. Různé studie poukázaly na přítomnost rozmanitých buněčných typů, které mohou pocházet z rozličných kmenových

a progenitorových buněk. Fetální mikrochimérické buňky CD34⁺ a CD34⁺CD38⁺ nalezené v krevním oběhu matek zřejmě vznikly z lymfoidních progenitorových buněk, Bianchi *et al.* (1996). Khosrotehrani *et al.* (2008) se ve studii na myších pokusil poprvé prokázat, že fetální lymfoidní progenitorové buňky, získané během těhotenství, jsou schopny se dále vyvíjet v thymu a kostní dřeni matky do funkčních T a B buněk. Přítomnost fetálních thymocytů v různém stadiu diferenciaci T buněk silně naznačuje, že fetální T buněčné progenitory vstupují a diferencují se v mateřském thymu. O'Donoghue *et al.* (2003) dále předpokládá vznik diferencovaných fetálních buněk z mezenchymálních kmenových buněk (MSC) a Parant *et al.* (2009) tvrdí, že by mohly pocházet i z endoteliálních progenitorových buněk (EPC).

Řada studií se snažila potvrdit schopnost diferenciaci kmenových buněk plodu do finálních buněčných stádií. Například výzkum Traggiai *et al.* (2004) na imunodeficientních myších, kterým chybí B, T a NK buňky. Těmto myším byly injikovány CD34⁺ buňky, které jsou považovány za hematopoetické kmenové buňky. Po injekci lidských CD34⁺ buněk z pupečnickové krve do jater imunodeficientní novorozené myši došlo k de novo vývoji dendritických, B a T buněk, k tvorbě strukturovaných primárních i sekundárních lymfoidních orgánů a k produkci funkčních imunitních odpovědí v hostiteli. Maturované T buňky byly detekovány v brzlíku, slezině, mezenterických lymfatických uzlinách a kostní dřeni a tento fakt podporuje teorii kmenových buněk. Tyto studie naznačují vznik CD34⁺ buněk z mikrochimérických hematopoetických kmenových buněk. Přímý důkaz toho, pak poskytl Khosrotehrani *et al.* (2008) ve své studii na myším modelu.

V krvi těhotných žen byly detekovány také mezenchymální kmenové buňky (MSC), které do krevní cirkulace matky vstupují nedlouho po početí. Krevní vzorky, pozitivní na mužskou DNA, byly odebrány mezi sedmým až čtrnáctým týdnem těhotenství, do 15 minut po chirurgickém ukončení těhotenství (O'Donoghue *et al.*, 2003). Nicméně tyto buňky nebyly dále detekovány v pokročilém stadiu těhotenství a před porodem. O'Donoghue *et al.* (2004) ovšem zjistil přítomnost fetálních MSC v mateřské kostní dřeni. Na základě této skutečnosti se domnívá, že po překonání placentární bariéry, mezenchymální kmenové buňky, které exprimují adhezní molekuly, vstoupí do mateřské cirkulace a následně se adherují a poté včlení do mateřských tkání, jako je například kostní dřev. Typickým znakem mezenchymálních kmenových buněk je jejich schopnost diferencovat se do tří různých buněčných linií, adipocyty, chondrocyty a osteocyty.

Následně mohou dát vznik tukové nebo kostní tkáni či chrupavce (Pittenger *et al.*, 1999). O'Donoghue *et al.* (2004) tento fakt ve své studii potvrdil. Fetální MSC jsou možným zdrojem při opravě tkání kmenovými buňkami u takových chorob jako je osteogenesis imperfecta (Guillot *et al.*, 2008).

Mužské, zřejmě fetální, buňky hematopoetického a mezenchymálního původu v apendixu všech těhotných žen, které měly syna, identifikoval Santos *et al.* (2008). Vzhledem k výskytu těchto buněk v zaníceném apendixu došel k závěru, že tyto mikrochimérické buňky participují na opravě tkání. Fetální kmenové buňky se mohou ovšem podílet i na patologických procesech například fetální endoteliální progenitorové buňky se podílí na maternální angiogenezi během těhotenství (Huu *et al.*, 2007). Tato vlastnost může napomáhat nádorovému bujení během a následně po těhotenství. Huu *et al.* (2007) proto hledali spojitost mezi těhotenstvím, mikrochimérickými buňkami, a melanomem. Zjistili, že signifikantně více se fetální buňky vyskytovaly u žen s maligním melanomem, oproti skupině kontrol, žen s benigními névami. Tento výsledek potvrzuje angiogenní aktivitu endoteliálních progenitorových buněk. Většina CD34⁺ buněk v intervilózním prostoru a v mateřské placentární krvi je endoteliálního a fetálního původu a exprimují endoteliální markery CD34, CD31 nebo von Willebrandův faktor (Parant *et al.*, 2009).

2.1.2 Perzistence fetálního mikrochimérismu

Odpověď na otázku proč se u některých žen ustanoví dlouhodobý mikrochimérický stav a u jiných ne, zatím nebyla zcela zodpovězena. Nicméně je tu teorie, která operuje s HLA-kompatibilitou nenarozeného dítěte a matky. Mikrochimérické buňky jsou semialogenní vůči mateřskému imunitnímu systému a je možné, že ženy, které nosí HLA-kompatibilní fetus, mají více přetrvávajících fetálních mikrochimérických buněk než ty jejichž plod je HLA-nekompatibilní (Khosrotehrani *et al.*, 2003). Tuto hypotézu podporují výsledky studie prováděné na zvířecím modelu. V této studii prováděné na myších byl skutečně prokázán rychlejší úbytek mikrochimérických buněk u alogenních, spíše než u syngenních plodů (Bonney a Matzinger, 1997). Evans *et al.* (1999) však ve své studii korelaci mezi HLA-kompatibilitou matky a plodu nepotvrdil. Nicméně potvrdil, že fetální mikrochimérismus je běžný u zdravých žen v populacích T-lymfocytů, B-lymfocytů, NK buněk a monocytů. Signifikantně, více žen se sklerodermií mělo mikrochimérismus

v PBMC než u kontrol (Evans *et al.*, 1999). V další studii se ovšem potvrdilo, že některé HLA-haplotypy např. HLA-DQA1*0501 jsou silněji asociovány s fetálním buněčným mikrochimérismem než jiné. Ženy, které byly HLA-DQA1*0501 pozitivní, nebo byly na tento haplotyp pozitivní jejich synové měly prokazatelně větší šanci na ustanovení a přetrvání fetálního mikrochimérismu v populaci jejich T-lymfocytů (Lambert *et al.*, 2000).

2.2 Fetální mikrochimérismus v krevní plazmě a séru

Přítomnost fetálních buněk především kmenových byla prokázána v krevní plazmě a séru řadou výzkumných skupin a kromě detekce těchto buněk byla také měřena jejich koncentrace (Bianchi *et al.*, 19996; Adams *et al.*, 2003; Mikhail *et al.*, 2008). Koncentrace fetální DNA je prokazatelně vyšší v plazmě (Ariga *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 1998) a séru těhotných žen než v buněčném kompartmentu krve (Lo *et al.*, 1998). Nicméně absolutní koncentrace fetální DNA v plazmě a séru je podobná. Rozdíl ve frakční koncentraci fetální DNA mezi plazmou a sérem spočívá v přítomnosti vyšší kvantity mateřské DNA v séru. Lo *et al.* (1998) byl schopen detekovat fetální *SRY* gen v plazmě či séru u všech 263 analyzovaných vzorků těhotných žen. Fetální *SRY* sekvenci pak prokázal už v 7. týdnu těhotenství a poukázal na zvyšující se koncentraci fetální DNA v průběhu těhotenství. Ariga *et al.* (2001) detekoval fetální DNA v mateřské cirkulaci již ve 4. týdnu těhotenství a Thomas *et al.* (1994) nejdříve ve 4. týdnech a 5 dnech postkoncepčně. Z toho je zřejmé, že feto-maternální přenos buněk začíná záhy po početí a uhnízdění vajíčka a je možné, že hraje roli v navození tolerance imunitního systému matky vůči plodu. Usídlení fetálních CD34⁺ nebo CD34⁺ CD38⁺ buněk v mateřských lymfoidních orgánech nebo kostní dřeni může pomoci udržet toleranci vůči plodu podobným způsobem jako je tomu u alogenních transplantací orgánů (Bianchi *et al.*, 1996). Bianchi *et al.* (1997) ve své studii uvádí, že průměrný počet fetálních buněk v mateřské krvi v druhém trimestru normálního těhotenství činí 1,2 buněk v 1 mililitru mateřské krve. Průměrná koncentrace fetální DNA ve stejném gestačním věku v mateřské plazmě je 21krát vyšší než v buněčné frakci mateřské krve. V krevním séru matky je pak 23,9 x vyšší. V raném těhotenství představuje fetální DNA průměrně 3,4 % celkové plazmatické DNA matky, v pozdním těhotenství pak dokonce 6,2 % (Lo *et al.*, 1998). Počet zachycených fetálních buněk se liší v závislosti na použití konkrétních metod separace buněk. Sohda *et al.* (1997) použil metodu průtokové cytometrie (FACS). Jeho výsledky byli podobné předchozím studiím. Průměrně 4,6 %

separovaných buněk bylo fetálního původu. Stejně tak Bianchi *et al.* (1994) v podobné studii, kde využila techniku FACS, uvedla, že fetální buňky představují 0,001-5% tříděné buněčné populace. Podle studie Hamady *et al.* (1993) je frekvence fetálních buněk v druhém trimestru 0,0035% a ve třetím trimestru 0,008%. Fetomaternální poměr je tedy v druhém trimestru 970krát vyšší v maternální plazmě než v buněčné frakci a ve třetím trimestru 775krát vyšší. Jak bylo výše uvedeno, koncentrace fetální DNA v buněčné frakci krve je významně nižší než v nebuněčné části, krevní plazmě a séru. Intaktní fetální buňky jsou sice přítomny v mateřské plazmě, nicméně v mnohem menší frekvenci než extracelulární DNA. Bianchi *et al.* (2000) prokázala přítomnost fetálních buněk v krvi těhotných žen. U normálních těhotenství byla koncentrace fetálních buněk velmi nízká, nicméně v případech spojených s těhotenskými komplikacemi, například preeklampsie nebo cytogenetické abnormality plodu, se fetomaternální přenos buněk zvýšil. Dále prokázala přítomnost fetálních progenitorových buněk s proliferativním potenciálem pocházejících z předchozích těhotenství. Tyto buňky byly schopné se dále diferencovat a migrovat do orgánů matky. Ve studii z roku 1997 Bianchi *et al.* prezentovala výsledky výzkumu těhotných žen, které očekávali dítě s trizomií 21, tedy Downovým syndromem, nebo jinými aneuploidními chorobami. Jednalo se o vzorky periferní krve a k detekci mužské DNA plodu použili kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci. Našli korelaci mezi abnormálním fetálním karyotypem, obzvláště trizomií 21, a zvýšenou incidencí fetálních buněk v mateřské cirkulaci. Průměrný počet fetálních buněk přítomných v krvi matky, pokud plod trpěl Downovým syndromem, byl 6krát zvýšený oproti ženám, které nosily zdravé dítě. Podobné výsledky byly publikovány i jiným i autory (Lo *et al.*, 1999b; Elias *et al.*, 1992). Zvýšený fetomaternální přenos a následně vyšší koncentrace fetálního mikrochimérismu v krvi matky byla nalezena i u dalších komplikací v těhotenství jako například preeklampsie (Holzgreve *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1999a; Smid *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2006). Detekce intaktních buněk byla úspěšná nejen v některých případech preeklampsie, ale také u RhD inkompatibility plodu a matky. Naopak u žen s bezproblémovým těhotenstvím nebyly intaktní buňky nalezeny ani v jednom vzorku a to i přes to, že extracelulární fetální DNA byla detekována ve všech případech (Zhong *et al.*, 2006).

Z těchto faktů je jasné, že fetální mikrochimérismus v době těhotenství je u žen běžný a v průběhu těhotenství se koncentrace fetální DNA v krvi matky zvyšuje.

Extracelulární DNA je podle výsledků studií přítomna v krvi ženy ve vyšším množství než intaktní fetální buňky. Krátce po narození dítěte a vypuzení placenty z těla koncentrace fetální DNA v krvi matky velmi rychle klesá. Lo *et al.* (1999c) ve své studii zkoumali krevní vzorky žen získané před, během a několik hodin až dnů po porodu chlapce. Poukázali na to, že u většiny žen pokleslo množství fetální DNA na nedetekovatelnou úroveň do dvou hodin po porodu. Průměrný poločas rozpadu pro cirkulující fetální DNA byl 16,3 minuty. To naznačuje, že k udržení stabilního stavu musí být kontinuálně uvolňováno velké množství fetální DNA do matčina krevního oběhu. Nicméně u řady žen se vyskytuje detekovatelná nízká hladina fetálních CD34⁺CD38⁺ buněk i desítky let po porodu (Bianchi *et al.* 1996).

2.3 Fetální mikrochimérismus a autoimunitní onemocnění

Ženy jsou častěji postihovány autoimunitními chorobami než muži (Rose a Bona, 1993). Onemocnění se u nich často rozvine v reprodukčním věku (Cooper a Stroehla, 2003) a po porodu. Dlouhou dobu se hledají odpovědi na otázku, proč tomu tak je. Jistě zde sehrává svou roli řada faktorů. V dnešní době je již známo, že jedním z těchto faktorů by mohl být fetální mikrochimérismus, který zřejmě participuje v patogenezi autoimunitních chorob. Mezi tato onemocnění patří například systémová skleróza, Sjögren syndrom, systémový lupus erythematosus, autoimunitní onemocnění štítné žlázy (Hashimotova tyreoiditida), primární biliární cirhóza a další. Řada výzkumů se této problematice věnuje již několik let. Doba těhotenství je pro ženský organismus jakousi zkouškou imunity. Genetická informace plodu, který v sobě nosí, je z poloviny zděděná po otci. Buňky dítěte exprimují na svém povrchu jiné HLA antigeny než matka a mohou být rozpoznány jejím imunitním systémem, což by zapříčinilo vypuzení dítěte z těla matky. Toto se ovšem ve většině těhotenství neděje. Matčina imunita fetální HLA rozpozná, ale plod tím není nijak ohrožen. Nabízí se tedy otázka, jak je to možné?

Dříve se myslelo, že placenta funguje jako nepropustná bariéra mezi fetálním a maternálním krevním oběhem a tudíž nedojde ke kontaktu buněk plodu a imunitních buněk matky a plod je ochráněn. V dnešní době je jisté, že během těhotenství dochází k obousměrnému přenosu buněk z plodu do matky i z matky do plodu. Mnozí se dokonce domnívají, že v důsledku přenosu fetálních buněk do matky dochází k její imunizaci a následně plod není napaden imunitním systémem (Artlett, 2005). Přetrvávání fetálních

buněk v matčině organismu může mít nicméně i zdravotní následky ve formě autoimunitních onemocnění.

Imunologické spojení matky a plodu během těhotenství je dáno na straně jedné prezentací fetálních antigenů, na straně druhé jejich rozpoznáním a reakcí matčina imunitního systému na tyto cizorodé antigeny. Vztah HLA antigenů je důležitý pro dlouhodobý efektivní přenos fetálních kmenových buněk (Nelson, 2001). V dnešní době se zdá, že HLA kompatibilita matky a dítěte znamená vyšší riziko vzniku autoimunitní choroby po těhotenství. Například studie Nelson *et al.* (1998) ve které zkoumali vzorky žen trpících sklerodermií. Nemocné ženy nosily HLA II kompatibilní dítě častěji než ženy zdravé. Vyslovili hypotézu, že kompatibilita HLA II. třídy je rizikovým faktorem pro vznik sklerodermie a fetální mikrochimérické imunitní buňky mohou atakovat mateřské tkáně, což může vést k rozvoji autoimunitní choroby (Nelson *et al.*, 1996). Naopak u revmatoidní artritidy může během těhotenství dojít k remisi. Toto zlepšení je spojeno s fetomaternální rozdílností antigenů HLA II. třídy. Zdá se, že roli hraje mateřská imunitní odpověď namířená proti otcovským HLA antigenům (Nelson *et al.*, 1993). Vztah fetálních buněk mezenchymálního původu a revmatoidní artritidy zkoumali také Hromadnikova *et al.* (2008). Pracovali s buněčnými kulturami ze synoviálních tkání a kůže pacientů trpících touto autoimunitní chorobou. Mužská DNA byla nalezena v obou typech vzorků a zjistili, že mužské fetální buňky jsou schopny růstu z nezasazených tkání stejně dobře jako z tkání postižených revmatoidní artritidou.

Mikrochimérické buňky byly nalezeny v různých tkáních ve vyšším počtu i frekvenci u žen se systémovou sklerózou na rozdíl od žen zdravých. Sawaya *et al.* (2004) zkoumal bioptické vzorky kůže z postižených a nepostižených míst pěti žen se systémovou sklerózou a deseti zdravých žen. V klinicky nepostižených oblastech kůže pacientek se sklerodermií bylo prokázáno vyšší množství mikrochimérických buněk ještě před klinickými projevy sklerotických změn. To naznačuje, že příliv mikrochimérických buněk zřejmě předchází rozvoji tkáňové fibrózy a že fetální mikrochimérické buňky mohou být iniciátory zánětu. Roli mikrochimérických buněk v patogenezi systémové sklerózy již před tím naznačil Johnson *et al.* (2001b).

Zapojení mikrochimérických buněk v dalších autoimunitních chorobách je nejasné. Výsledky jednotlivých studií jsou protichůdné. Možnou roli hrají podle některých studií u Sjögrenova syndromu. Častěji byly fetální buňky ve slinných žlázách detekovány u žen se Sjögrenovým syndromem než u kontrol (Endo *et al.*, 2002), což by naznačovalo, že se

podílí na vzniku této choroby. Podobné výsledky získal i Kuroki *et al.* (2002). Prokázali přítomnost fetálních buněk ve slinných žlázách a plicích postižených žen a tak i možnou roli fetálního mikrochimérismu v patogenezi Sjögrenova syndromu. Ačkoli fetální buňky byly detekovány v tkáních, jejich výskyt v periferní krvi žen je podstatně nižší, pokud se vůbec vyskytnou. Rozdíl mezi zdravými ženami a pacientkami nebyl nalezen (Toda *et al.*, 2001).

Fetální mikrochimérismus je dále spojován s autoimunitním onemocněním zvaným systémový lupus erythematosus. Tato choroba se přednostně vyskytuje u žen a postihuje různé orgánové systémy s těžkými život ohrožujícími komplikacemi. Výsledky jednotlivých studií se opět liší. Fetální buňky byly nalezeny u žen se systémovým lupus erythematosus (SLE) jak v krvi, tak i v orgánech, což naznačuje možnou roli v patogenezi této choroby (Stevens, 2006). Kremer Hovinga *et al.* (2007) také prokázal výskyt mikrochimérických buněk v zasažených tkáních, ale spojuje ho s reparačními procesy fetálních buněk. Abbud Filho *et al.* (2002) uvedli, že jejich získaná data ukazují silnou korelaci mezi přítomností Y-chromozomové sekvence v mononukleárních buňkách periferní krve a SLE. Také prokázali tendenci ke zvyšování koncentrace fetálních buněk u žen, které porodily syna před delší dobou. Což podporuje teorii, že jsou zapojeny v patogenezi SLE. Podobně potvrdil přítomnost mikrochimérických buněk v tkáních žen s SLE i Johnson *et al.* (2001a). Mužské buňky byly přítomny především v tkáních zasažených patologickými procesy, zejména vaskulitidou. Naopak nebyly nalezeny v nepostižených tkáních nemocných žen, které sloužily jako vnitřní kontroly, ani u kontrol.

Fetální mikrochimérismus bývá také spojován s autoimunitním onemocněním štítné žlázy (AIT), které je mnohem častější u žen nežli u mužů. Jedním z vysvětlení je vliv estrogenů na ženský imunitní systém a nově také vliv fetálního mikrochimérismu. Pedersen *et al.* (2006) ve své studii nenalezla žádnou souvislost mezi předchozím těhotenstvím, počtem porodů a tyroidálními protilátkami. Tento výsledek naznačuje, že fetální mikrochimérismus zde zřejmě nehraje roli spouštěcího mechanismu autoimunitního postižení štítné žlázy. V jiné studii nicméně byla nalezena souvislost mezi počtem porodů a autoimunitním onemocněním štítné žlázy. Došli k závěru, že parita se jeví jako potenciálně rizikový faktor pro toto onemocnění. Ženy, které nikdy nebyly těhotné, měly menší pravděpodobnost vzniku AIT (Friedrich *et al.*, 2008). V další studii, která se zabývala vlivem parity na množství tyroidálních protilátek u žen, bylo nicméně prokázáno,

že parita není rizikovým faktorem autoimunitního postižení nebo dysfunkce štítné žlázy (Walsh *et al.*, 2005).

Z těchto výsledků je patrné, že fetální mikrochimérismus u některých autoimunitních chorob může hrát svou roli. Nicméně doposud nebyl podán žádný přímý důkaz a výsledky se různí. Mechanismus vzniku autoimunitních chorob je složitý a zasahuje do něj celá řada faktorů, od genetické predispozice až po prostředí, v němž žijeme. Navíc byly mikrochimérické buňky nalezeny i u zdravých žen (Klonish a Drouin, 2009; Nelson, 2009). Bude třeba nadále pokračovat ve výzkumu, abychom mohli s určitostí rozhodnout, zda a jakou roli fetálnímu mikrochimérismu přidělit.

2.4 Fetální mikrochimérismus a nádorová onemocnění

Navrhovaná hypotéza o funkci fetálních buněk v patogenezi nádorů matky zahrnuje podporu tumorogeneze, ochranu poskytující imunologický dohled (immunosurveillance) a také účast v reparačních procesech tkání. Stejně jako u autoimunitních chorob je jejich role zatím nejasná a zdá se, že se liší podle typů nádorů. Do dnešní doby byl výzkum zaměřen tímto směrem především popisný a kvantitativní. Z těchto výsledků lze soudit především to, zda se fetální mikrochimérické buňky v nádorech objevují a v jakém počtu. Nicméně tyto studie nepodávají přímý důkaz konkrétní biologické role buněk plodu v nádoru. Některé vědecké skupiny proto zkoumají fetální mikrochimérismus na myším modelu, se kterým se pracuje lépe.

2.4.1 Fetální mikrochimérismus a nádory prsu

Nádor prsu je nejčastější nádorové onemocnění u žen. Incidence u žen je nesrovnatelně vyšší než u mužů (Siegel *et al.*, 2012). Rizikové faktory pro rozvoj nádoru prsu jsou genetické a environmentální. Za rizikové jsou považovány tumor-supresorové geny *BRCA1* a *BRCA2*. Produktem genu *BRCA1* je protein, zodpovídající za reparaci DNA. Gen *BRCA2* kóduje reparační protein DNA, který opravuje především dvouřetězcové zlomy v DNA. Mutace těchto genů je spojena s dědičným karcinomem prsu a vaječníků. Nicméně pouze 5-10% všech případů rakoviny prsu lze přičíst přítomnosti zděděné patologické mutace v genu předurčujícím rozvoj tohoto typu maligního onemocnění (Ganz, 2005). Mezi environmentální rizikové faktory patří reprodukční

faktory, endogenní a exogenní hormony, antropometrické charakteristiky a některé faktory životního stylu.

Protektivní faktor nádoru prsu je zdá se mateřství. V minulosti byla tato ochranná funkce těhotenství spojena s hormonálními změnami, které se v této době v těle ženy odehrávají. Nyní se uvažuje o tom, zda není tím protektivním faktorem fetální mikrochimérismus nastolený během těhotenství. Na toto téma bylo vypracováno několik studií.

V roce 2007 publikovali Gadi a Nelson studii, v níž zkoumali vzorky periferní krve 82 žen, z toho 35 žen s karcinomem prsu a 47 žen zdravých. Detekovali a kvantifikovali mužskou DNA extrahovanou z mononukleárních buněk periferní krve (PBMC). Zjistili sníženou prevalenci fetálního mikrochimérismu u pacientek ve srovnání s kontrolami. Jejich nález se shoduje s hypotézou, že alogenní fetální mikrochimérické buňky poskytují ochranný účinek proti karcinomu prsu. V následující studii tyto nálezy potvrdili. Pracovali se vzorky od 99 žen, 54 pacientek a 45 kontrol. Fetální mikrochimérismus byl prokázán u 39 žen, u 56 % kontrol a pouze 26 % pacientek. Z toho je patrné, že se tento fenomén vyskytuje s vyšší frekvencí u žen zdravých. Ženy s fetálním mikrochimérismem měly signifikantně menší pravděpodobnost onemocnění rakovinou prsu ($p=0,001$). U zdravých žen byla také naměřena signifikantně vyšší koncentrace mikrochimérických buněk v periferní krvi na rozdíl od pacientek. Z tohoto faktu lze vyvodit možný protektivní efekt. V této studii se pokusili také zodpovědět, zda přítomnost FM je spojena se specifickými znaky nádoru. Výsledky naznačují, že ženy bez fetálních mikrochimérických buněk mohly mít větší pravděpodobnost rychlejší progresu choroby než ženy, u nichž fetální buňky byly nalezeny. Nicméně tento vztah nebyl statisticky signifikantní (Gadi *et al.*, 2008). Tito autoři naznačují, že alogenní fetální mikrochimérické buňky mohou poskytovat imunologický dohled nad maligními a premaligními buňkami. Tento názor je podpořen nalezeným fenoménem zvaným efekt štěpu proti nádoru (graft-versus-tumor, GVT) (Gadi, 2009). Výzkumy na experimentálních i lidských modelech v transplantační biologii nám poskytly náhled na možné role, které fetální mikrochimérismus může hrát u zdravých žen. Transplantace alogenních hematopoetických buněk prokázala dvě věci. Za prvé, že je dosažitelná stabilní tolerance u cizího imunitního systému. Za druhé, imunologický dohled nad nádorovými buňkami po myeloablativní terapii je zprostředkován aloreaktivními buňkami dárce. Mikrochimérické fetální T buňky rozpoznají alogenní nádorové antigeny a atakují přímo nádorové buňky. Fetální buňky mohou navíc prezentovat nádorový antigen

a aktivovat tak mateřskou imunitní odpověď proti buňkám nádoru. Navíc fetální NK buňky nezávislé na HLA prezentaci antigenu mají cytolytickou aktivitu (Gadi, 2009). Dárčové T buňky transplantované společně s hematopoetickými kmenovými buňkami se podílí na procesech známých jako GVT efekt (Horowitz *et al.*, 1990). Nedávno byly také provedeny studie, ve kterých zkoumali vliv fetálního mikochimérismu u pacientů s pokročilým stadiem solidních nádorů, rezistentních na chemoterapii. Tito pacienti byli následně léčeni transfuzí aktivovaných haploidentických kmenových buněk periferní krve (PBSC) darovaných od rodičů nebo dětí. Pacienti, kteří získali transfuzi a byli následně pozitivní na mikochimérismus, měli průměrnou dobu přežití signifikantně delší než pacienti, kteří byli na FM negativní. Také terapeutická odpověď byla u pozitivních pacientů signifikantně vyšší, navíc u nich byla objevena i zvýšená produkce pomocných T-lymfocytů (Th1) a interferonu γ (IFN- γ) a snížená směsná lymfocytární reakce (aloreaktivita) mezi lymfocyty dárce a příjemce. Tato studie naznačuje, že fetální mikochimérismus je statisticky signifikantně spojen se zlepšením anti-tumor efektu při léčbě aktivovanými haplo-PBSC (Yu *et al.*, 2008).

Tyto studie ve spojení se studii provedenými Gadi a Nelson (2007) a Gadi *et al.* (2008) nám dávají naději do budoucna. Pokud by se potvrdila protektivní role mikochimérismu u nádorů prsu, a byl pochopen mechanismus, jakým je tato ochrana realizována, znamenalo by to velký posun v léčbě této choroby. Nicméně studie, které prokázaly pozitivní roli FM u rakoviny prsu, byly prováděny na vzorcích periferní krve žen. Bohužel výzkum provedený na nádorových tkáních prsu poukázal na možnou karcinogenní roli fetálního mikochimérismu. Dubernard *et al.* (2008) analyzovali pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH) vzorky žen s nádorem prsu, které čekaly syna. Ačkoli byl počet pacientek i kontrol malý, 10 pacientek a 4 kontroly, závěry byly signifikantní. Fetální buňky byly přítomny u devíti z deseti nádorů a u žádného ze čtyř kontrol s benigním nádorem ($p < 0,05$). Průměrný počet fetálních buněk na milion mateřských byl 36 u maligních nádorů a 0 u benigních ($p < 0,01$). Navíc s pomocí FISH a imunofenotypizace zjistili, že v nádoru se vyskytují především mezenchymální a v menší míře také epiteliální a endoteliální buňky. Leukocyty nebyly přítomny v žádném vzorku. Z toho je patrné, že fetální buňky se ve stromatu maligních nádorů prsu hojně vyskytují a mohou mít zřejmě vliv na chování nádoru. Nicméně je možné, že nepřítomnost leukocytů v nádorech mohla být způsobena tím, že 6 z 10 pacientek podstoupilo neoadjuvantní chemoterapii před odebráním vzorku (Gadi, 2009). Gadi (2010) se proto rozhodl zjistit, jak

se věc má a analyzoval celkem 38 tkání prsu, 19 pacientek a 19 kontrol. Celková genomová DNA byla extrahována z mražených tkání prsu, u pacientek z oblasti sousedící s nádorem, ale nádorem nezasažené, a u kontrol se jednalo o tkáně získané z redukční mammoplastiky. Ženy vedené jako kontroly předtím neprodělaly rakovinu prsu. K identifikaci mužských buněk využili kvantitativní PCR pro gen *DYS14* ležící na Y chromozomu. Fetální mikrochimérismus se častěji vyskytoval u zdravých žen (63%), na rozdíl od žen s rakovinou (26%).

Nález dávat najevo, že protektivní vztah fetálního mikrochimérismu vůči rakovině prsu, který byl dříve objeven při výzkumu periferní krve, se odráží také v tkáních prsu.

2.4.2 Fetální mikrochimérismus a nádory děložního hrdla

Nádory děložního hrdla jsou třetím nejběžnějším nádorovým onemocněním u žen, hned po nádorech prsu a kolorektálním karcinomu. Incidence se velmi liší v různých zemích světa od jednoho až po více než padesát nových případů na sto tisíc obyvatel za rok. Nádory děložního čípku jsou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu u žen ve východní, západní i střední Africe, střední Americe, Jižní a střední Asii a Melanésii. Tento typ rakoviny je o to nebezpečnější, že často postihuje i ženy pod 45 let (Arbyn *et al.*, 2011).

Jako jedna z hlavních příčin tohoto onemocnění je uváděna přetrvávající infekce lidským papilomavirem (HPV). Téměř všechny případy způsobuje jeden z patnácti genotypů tohoto viru. Infekce se běžně vyskytuje u mladých žen a prekancerózní stav může trvat řadu let. V dnešní době naštěstí existuje preventivní screening a také vakcína proti HPV, čímž se snažíme předejít vzniku a rozvoji této zákeřné choroby (Schiffman *et al.*, 2007).

Role fetálního mikrochimérismu v patogenezi a progresi nádoru děložního hrdla je zatím nevyjasněna. Cha *et al.* (2003) se pokusil zodpovědět, zda má protektivní efekt či naopak karcinogenní, nicméně výsledky nebyly průkazné ani v jednom směru. Analyzoval vzorky celkem 15 žen, z toho 8 pacientek, které porodily nejméně jednoho syna a podstoupily radikální hysterektomii. Mezi kontroly zařadil 4 zdravé ženy s mužským potomkem a 3 ženy s rakovinou děložního hrdla, které ovšem syna neměly. Tkáně cervixu byly analyzovány fluorescenční in situ hybridizací na přítomnost fetálních buněk a také použili imunofenotypizaci. Vzorky osmi pacientek se dělily do dvou skupin podle

velikosti. Mužské buňky byly nalezeny ve všech 4 větších vzorcích, ale pouze ve 2 ze 4 menších, kde bylo i množství mikrochimérických buněk nižší. Žádné mužské buňky nebyly prokázány v tkáních kontrol, ať byla jejich velikost jakákoli. Imunofenotypizace odhalila CD45 pozitivní buňky, hematopoetické, a buňky pozitivní na cytokeratin. Žádná z buněk nebyla pozitivní na oba markery zároveň. Tyto výsledky naznačují, že fetální mikrochimérismus může mít souvislost s nádory děložního hrdla. Nicméně u těchto pacientek nebyla zjištěna přítomnost lidské papiloma virové infekce, která je zcela jistě jednou z příčin vzniku karcinomu děložního hrdla (Kallenbach *et al.*, 2011).

2.4.3 Fetální mikrochimérismus a nádory štítné žlázy

Papilární karcinom štítné žlázy (PTC) je dalším typem rakoviny, která se vyskytuje častěji u žen nežli u mužů. Z tohoto důvodu byl tento typ nádoru testován na přítomnost fetálních mužských buněk. Jako první publikoval studii na toto téma Srivatsa *et al.* (2001). Vzorky tkáně byly získány od 29 žen s různými onemocněními štítné žlázy, které zahrnovaly jak nádory tak i například multinodulární strumu. Jako kontrolu použili vzorky z nekropsií osmi žen, které takovými chorobami netrpěly. Čtrnácti pacientkám z celkových 29 byl diagnostikován adenom či karcinom štítné žlázy. Z toho sedm z nich bylo pozitivních na fetální mikrochimérismus. V kontrolní skupině vzorků nebyly mužské buňky detekovány. Tyto nálezy naznačují vztah mezi fetálním mikrochimérismem a nádory štítné žlázy. Fetální buňky se zřejmě podílí na patogenezi nádorů štítné žlázy. V této studii nebyl určován fenotyp mikrochimérických buněk, nicméně v těch následujících byl a buňky nacházené v adenomu štítné žlázy byly hematopoetického původu (Renne *et al.*, 2004).

Cirello *et al.* (2008) také zkoumal vzorky tkání z nádoru získané od 63 žen s PTC. Tyto pacientky byly rozděleny do dvou skupin podle toho, zda před diagnózou čekaly syna (40 žen), nebo ne (23 žen) a tyto ženy byly vedeny jako negativní kontroly. DNA získaná z nádorové tyroidální tkáně nebo krevních vzorků deseti mužů byla použita jako pozitivní kontroly. Mužské buňky byly identifikovány amplifikací genu *SRY*, nacházejícího se na Y chromozomu pomocí polymerázové řetězcové reakce. Mužská DNA byla detekována v devatenácti ze čtyřiceti nádorových tkání žen z první skupiny, které dříve porodily syna, a byl jim diagnostikován PTC. Ve druhé skupině žen, které neprodily syna, nebyl prokázán fetální mikrochimérismus. U dvaceti žen z první skupiny byla analyzována

i nepostižená tkáň z druhé strany štítné žlázy. U těchto vzorků byl mikrochimérismus nalezen pouze u 5 pacientek, které byly pozitivní i ve vzorku části tumoru. Detekované mužské buňky byly také podrobeny zkoumání fenotypu pomocí značení protilátkami proti hematopoetickému markeru CD45 a tyroidálnímu markeru Tg. Mikrochimérické buňky exprimovaly Tg jak ve vzorcích z tumoru tak i ve vzorcích ze sousední nezasažené tyroidální tkáně. Buňky exprimující CD45 byly nalezeny v nízké koncentraci a pouze v neoplastických tkáních. Žádné buňky nebyly pozitivní pro oba markery. Z těchto výsledků vyplývá, že se fetální mikrochimérismus vyskytuje častěji a ve vyšší koncentraci v karcinomu než v normální tkáni u žen s papilárním karcinomem štítné žlázy. Mikrochimérismus tedy zřejmě nějakým způsobem zasahuje do dějů spojených se vznikem neoplazie. Cirello *et al.* (2010) navázali na tento výzkum s tím, že zkoumali krevní vzorky. Skupinu pacientek tvořilo 57 žen, které měly jednoho nebo více synů a po ukončení těhotenství u nich byl diagnostikován papilární tyroidální karcinom. Kontrolní vzorky byly získány od 49 zdravých žen s jedním nebo více mužskými potomky bez nádorového onemocnění nebo autoimunitních chorob. Přítomnost mužské DNA v periferní krvi žen byla hodnocena na základě amplifikace genu *SRY* specifického pro Y chromozom. Navíc bylo vyšetřeno dalších 19 vzorků nádorových tkání pro porovnání úrovně fetálního mikrochimérismu v tkáních a v krvi. Signifikantně nižší frekvence fetálního mikrochimérismu v krvi byla nalezena u žen s PTC (49,1%) na rozdíl od kontrolní skupiny (77,6%). V tkáních byla identifikována mužská DNA v šesti vzorcích z devatenácti. U některých pacientek nebyly v krvi detekovány fetální buňky, zatímco v neoplastické tkáni nalezeny byly. Prevalence fetálního mikrochimérismu v periferní krvi žen s papilárním karcinomem štítné žlázy je tedy signifikantně nižší než u zdravých žen. Přítomnost mikrochimérických buněk v tumoru, ale ne v krevním oběhu, podporuje hypotézu, že se fetální buňky mohou usídlit v mateřských nikách a mohou být rekrutovány do oblastí zasažených chorobou, kde se dále diferencují k regeneraci poškozených tkání (Cirello *et al.* (2010).

2.4.4 Fetální mikrochimérismus a další typy malignit

Role fetálního mikrochimérismu se zkoumala i u jiných typů nádorů. Gilmore *et al.* (2008) zkoumali prevalenci mužského fetálního mikrochimérismu u těhotných i netěhotných zdravých žen a u těhotných žen s různým typem nádorového onemocnění.

DNA extrahovali z periferních krevních leukocytů a mužskou DNA amplifikovali pomocí metody polymerázové řetězové reakce. Kontrolní vzorky připravili smícháním lidských mužských a ženských buněčných linií. Výsledky této studie ukázaly, že procento žen pozitivních na mikrochimérismus je značně závislé na množství analyzované DNA. Vzorky, ve kterých bylo k analýze použito minimálně 25 mikrogramů DNA, byly na fetální mikrochimérismus pozitivní v 57 % u zdravých těhotných žen. Z dvou set vyšetřovaných vzorků žen s nádorovým onemocněním, které porodily, bylo na mikrochimérismus pozitivních pouze 34 %. U žen, které nebyly těhotné a neměly nádor, se vyskytl mikrochimérismus v 7,4 %. Tyto výsledky podporují hypotézu protektivní role fetálního mikrochimérismu.

Ženy se solidními nádory mají signifikantně nižší úroveň fetálního mikrochimérismu než ženy s hematologickými malignitami. Tyto výsledky jsou v souladu s hypotézou, že fetální buňky se soustředí do primárního místa choroby. Z tohoto důvodu jsou mikrochimérické buňky v krvi přítomny ve vyšším počtu u hematologických malignit ve srovnání se solidními nádory. Tato studie bohužel nerozlišovala mezi lokalizovanou a metastazující chorobou. Je možné, že fetální buňky jsou v mateřské cirkulaci přítomny pouze přechodně nebo jsou odstraňovány z oběhu migrací a usidlováním v metastatických místech. Navíc vyhodnocování přítomnosti fetálního mikrochimérismu v krvi nám dává pouze nepřímý náhled na to, jaká je role fetálních buněk v orgánově specifických chorobách (Kallenbach *et al.*, 2011).

Fetální mikrochimérismus byl zkoumán také ve vztahu k melanomu, rakovině kůže. Huu *et al.* (2009) vyšetřovali tuto souvislost na myším i lidském modelu. K analýze využili vzorky tkání. Na lidském modelu byly fetální buňky detekovány u 63 % pacientek s primárním melanomem, které byly těhotné nebo porodily maximálně před 6 měsíci, oproti 12 % žen s benigními pigmentovými névami, které byly těhotné nebo porodily před méně než 6 měsíci. Z toho vyplývá, že těhotné ženy s melanomem měly signifikantně častější výskyt mikrochimérických buněk než ty s benigními névami. Více než 50 % mikrochimérických buněk exprimovalo markery CD34, CD31 nebo von Willebrandův faktor, což znamená, že tyto buňky přejali endoteliální fenotyp. Prokázali tedy, že během těhotenství je melanom nebo jeho bezprostřední okolí často místem, kde se fetální buňky usidlují a že tyto buňky mají endoteliální fenotyp. Je zajímavé, že tyto endoteliální progenitorové buňky pocházející z plodu projevily schopnost dát vznik novým krevním a lymfatickým cévám. Tento děj probíhal pravděpodobně jako reakce na remodelaci tkáně

odehrávající se v nádoru a jeho okolí. Tvorbou nových krevních cév by fetální buňky mohly usnadňovat tumoru přístup ke kyslíku a živinám a tím i jeho růst a expanzi do okolní tkáně.

Fetální mikrochimérismus byl studován také u nádorů plic (O'Donoghue *et al.*, 2008). Tato studie se snažila zodpovědět na otázku, zda se fetální buňky podílejí na opravě tkání po ukončení těhotenství. Vzorky zalité v parafínu byly získány od žen, které podstoupily chirurgický zákrok kvůli podezření na rakovinu plic. Mužské buňky byly prokázány ve všech vzorcích plic žen, které porodily syna nebo nosily mužský plod. U žen, které neprodily syna, detekovány nebyly. Shluky mužských buněk se vyskytovaly spíše přímo v tkáních nádoru nežli v jeho nezasazeném okolí. Mužské pravděpodobně fetální buňky se tedy vyskytovaly v zasažených tkáních sedmkrát častěji než ve zdravých tkáních. To naznačuje, že fetální buňky jsou přítomny v místech poranění tkáně a mohou být kmenové. Tyto kmenové buňky mohou být buď rekrutovány z kostní dřeně, nebo se pomnožily přímo v místě poškození.

Ve své diplomové práci se budu zabývat především možnou rolí fetálního mikrochimérismu u nádorů vaječníků a endometria. O vlivu fetálních buněk na vznik a vývoj nádorů endometria a ovaria prozatím není mnoho známo. Nicméně na základě studie Whiteman *et al.* (2003) se můžeme domnívat, že u nádoru ovaria hraje protektivní roli stejně jako u nádoru prsu.

3. Charakterizace a klasifikace gynekologických malignit

Termín gynekologické malignity označuje nádory postihující ženské orgány. Ve své práci jsem zkoumala konkrétně nádory endometria, prsu a ovaria.

3.1 Nádory endometria

Nádory endometria jsou sedmé nejčastější maligní onemocnění na světě. Incidence se samozřejmě liší mezi jednotlivými regiony (Parkin *et al.*, 1999). V méně rozvinutých zemích je incidence 10krát nižší než v Severní Americe a Evropě a zvyšuje se s rostoucí průměrnou délkou života. Nádor endometria je většinou diagnostikován po menopauze s nejvyšší incidencí okolo 70 let.

Existuje podstatný rozdíl v prognóze mezi histologickými typy nádoru endometria. Karcinom endometria typ 1 se vyskytuje nejčastěji, je charakteristický citlivostí na hormony a nízkým stagem. Tento typ nádoru endometria má výbornou prognózu. Tumory typu 2 jsou klasifikovány jako „high grade“ s tendencí k návratu choroby a prognóza je horší a to dokonce i v případě, že je nádor nalezen v raném stadiu. Základem léčby nádoru endometria je chirurgické odstranění tumoru, což je důležité nejen pro určení stadia nádoru, ale také umožňuje zvolit vhodnou adjuvantní terapii, která přispívá ke zlepšení léčby u vysoce rizikových pacientů (Amant *et al.*, 2005). Studie prokázaly, že vysoké endogenní hladiny estrogenů jsou spojeny se zvýšeným rizikem nádoru endometria (Potischman *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 2008).

Rizikové faktory pro vznik nádoru endometria jsou vyšší věk, dlouhodobé vystavení estrogenům, trvalý pobyt v Severní Americe nebo Evropě, vysoká koncentrace estrogenů u žen po menopauze, metabolické syndromy (obezita, diabetes), doba menstruace, nadměrná konzumace tuků a nadváha, nuliparita, předchozí maligní onemocnění prsu a dlouhodobé užívání tamoxifenu, ale také pokud má žena příbuznou prvního stupně se stejným onemocněním, nebo je rodina zatížena chorobou HNPCC (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom). Dalším faktorem zvyšujícím riziko vzniku nádoru endometria je hormonální substituční terapie nezahrnující užívání progestagenů. Progestageny působí proti nežádoucím účinkům estrogenů na endometrium. Mezi faktory snižující riziko patří

velká četnost těhotenství, antikoncepce, fyzická aktivita a zdravá strava bohatá na fytoestrogeny (Amant *et al.*, 2005). Ve srovnání se zdravými ženami, pacientky s nádory endometria spíše užívaly estrogeny v menopauze, uváděly historii diabetu, vysoké BMI a vysoký obvod pasu v poměru ke stehnům (distribuce tuku spíše v horní části těla). Pacientky také měly vysoký příjem nasycených tuků (Potischman *et al.*, 1996). Vysoké BMI ve spojení s vyšším rizikem bylo potvrzeno i v dalších studiích (Calle *et al.*, 2003; Reeves *et al.*, 2007). Důkazy naznačují, že výživa a faktory životního stylu podporující rozvoj obezity mohou zvýšit riziko vzniku nádorů endometria tím, že účinkují na hladiny endogenních hormonů a růstových faktorů. Centrální účinek na riziko vzniku nádorů endometria má u premenopauzálních i postmenopauzálních žen hyperinzulinémie a také nadměrná ovariální produkce androgenů (Kaaks *et al.*, 2002). Relativní riziko u žen užívajících estrogeny ve srovnání s ženami, které tuto léčbu nepodstoupily, bylo 2,3 a s prodlouženou dobou užívání se riziko ještě více zvýšilo. Relativní riziko při podávání estrogenů nad 10 let bylo 9,5 (Zhou *et al.*, 2002). Podle teorie jde o to, že endogenní nebo exogenní estrogeny, které nejsou podávány společně s progesteronem nebo syntetickými progestiny, zvyšují mitotickou aktivitu endometriálních buněk. Zvýšená mitotická aktivita vede ke zvýšenému počtu chyb při replikaci DNA a ke vzniku somatických mutací. V konečném důsledku zvýšené hladiny estrogenů u žen vedou k hyperplazii endometria a vzniku rakoviny (Akhmedkhanov *et al.*, 2001). Jak bylo uvedeno výše, estrogeny uměle dodávané ženám v menopauze jsou rizikovým faktorem vzniku rakoviny. Nicméně pokud je tato terapie doplněna podáváním progestagenů může toto riziko naopak snižovat (Van Gorp a Neven, 2002).

Přibližně 80 % nádorů endometria je endometroidního typu. Endometroidní adenokarcinom byl ve většinovém zastoupení také v mé práci, přičemž dalšími typy, které jsem vyšetřovala byly serózní papilární karcinom, karcinosarkom a světlobuněčný karcinom endometria. Serózní papilární karcinom je nejagresivnější typ nádoru endometria poprvé popsán v roce 1982 (Hendrickson *et al.*, 1982) a zahrnuje 3 až 4 % ze všech typů nádorů endometria (Grice *et al.*, 1998). Serózní papilární karcinom je stejně jako světlobuněčný karcinom řazen do skupiny tzv. high grade nádorů, které mají velmi agresivní chování (Oliva a Soslow, 2011). Endometriální světlobuněčný karcinom je neobvyklý karcinom endometria, který je biologicky, klinicky a patologicky odlišný od běžnějších endometroidních a serózních karcinomů (Abushahin *et al.*, 2011).

Karcinosarkom dělohy je rovněž nepříliš častým typem rakoviny, tvoří přibližně 2-5 % všech nádorů endometria a je rovněž agresivní povahy (Jonson *et al.*, 2006). Karcinosarkomy mají také tendenci k šíření lymfatickými cestami i transperitoneálně s 50% recidivou (Amant *et al.*, 2005).

3.2 Nádory prsu

Nádory prsu jsou celosvětově nejběžnější příčinou smrti žen zaviněnou maligním onemocněním. Incidence rakoviny prsu ve vyspělých zemích je téměř 3krát vyšší než v rozvojových státech (Jemal *et al.*, 2011).

První důkaz, že silné ženy mají zvýšené riziko rakoviny prsu, byl získán už v sedmdesátých letech (de Waard a Baanders-van Halewijn, 1974) a následující studie zjistily rozdíl mezi premenopauzálními a postmenopauzálními ženami. Většina rizikových faktorů je spojena s hormony, estrogy. Zvýšené riziko mají ženy s časnou menarché, pozdní menopauzou, ženy trpící obezitou po menopauze, nuliparita, užívání hormonální terapie u postmenopauzálních žen nebo orální antikoncepce u žen ve fertilním věku a také pozdní první porod. Riziko vzniku rakoviny prsu je nesrovnatelně vyšší u žen nežli u mužů. Muži jsou tímto onemocněním postiženi výjimečně. Riziko se také zvyšuje u starších žen, především po menopauze. Ženy, mající v rodině případy s tímto onemocněním jsou ve větším riziku, stejně tak ty, u kterých se vyskytují mutace v genech BRCA1 a BRCA2 (Hulka a Moorman, 2001). Některé práce také upozorňují na zvýšené riziko vzniku rakoviny prsu ve spojení s požíváním alkoholu (Baan *et al.*, 2007; Key *et al.*, 2006). Mezi faktory snižující riziko vzniku nádoru někteří řadí kojení (Enger *et al.*, 1997), nicméně některé studie vztah mezi kojením a rakovinou prsu nenašly nebo byl nevýznamný (Stuebe *et al.*, 2009; Michels *et al.*, 1996; Kvåle a Heuch, 1987). Vliv kojení proto zatím není zcela vyjasněn.

Existují různé možnosti prevence. Změna životního stylu, předcházení obezitě, omezení alkoholu a udržování fyzické aktivity (Key *et al.*, 2001). Ženy, které už rakovinou prsu onemocněly, jsou léčeny podáváním tamoxifenu, který snižuje riziko návratu nemoci. Prospěšný účinek byl viděn především u léčby tumorů pozitivních na estrogenové receptory (Osborne, 1998). Mortalita je ve vyspělých zemích snížena preventivními prohlídkami a mamografickým vyšetřením. Onemocnění tak může být zachyceno již

v raném stadiu, což zvyšuje naději na úspěšnou léčbu. Nicméně ani vyšetření na mamografu nemusí zachytit nádorové změny včas, obzvláště u rizikových pacientek, které mají toto onemocnění v rodině (Kuhl *et al.*, 2005).

3.3 Nádory vaječnicků

Nádory vaječnicků zahrnují 4 % všech zhoubných nádorů u žen a je nejčastější příčinou smrti v důsledku gynekologických nádorových onemocnění. Vzhledem k tomu, že počáteční stadium nádoru vaječnicků probíhá asymptomaticky, přibližně 75 % nových případů bývá diagnostikováno v pokročilém stadiu onemocnění, což zhoršuje prognózu a dobu přežití v horizontu 5 let. Pokud je onemocnění podchyceno v raném stadiu, je prognóza příznivá a 80-90 % pacientů se dožije následujících pěti let. V případě, že je rakovina vaječnicků odhalena v pokročilé fázi, klesne doba přežití na pouhých 25 % (Colombo *et al.*, 2006).

Rizikové faktory pro vznik rakoviny vaječnicků jsou vyšší věk, genetická predispozice, hormonální a environmentální příčiny (Colombo *et al.*, 2006). Vznik nádoru vaječnicků nastává u žen s hereditárním onemocněním v nižším věku. Hereditární rakovina vaječnicků je heterogenní onemocnění s nejméně třemi odlišnými syndromy. Prvním je dědičný místně specifický nádor vaječnicků, druhým hereditární syndrom karcinomu prsu a vaječnicků a hereditární nepolypózní kolorektální karcinom dříve označovaný jako Lynchův syndrom. V běžné populaci je průměrný věk vzniku nádorů ovarií nejméně o 10 let později než u žen s těmito syndromy (Lynch *et al.*, 1993). Jako hormonální příčina vzniku tohoto typu maligního onemocnění je opět považována vyšší hladina estrogenu, způsobená obezitou nebo užíváním estrogenů bez progesteronu (Lukanova a Kaaks, 2005). Silný rizikový faktor je historie rakoviny vaječnicků v rodině a také předchozí onemocnění rakovinou prsu. Zvýšené riziko bylo prokázáno také u žen s nižší paritou, obzvláště u žen, které dítě chtěly, ale nemohly otěhotnět (Hartge *et al.*, 1989). Booth *et al.* (1989) ve své práci uvedl, že infertilita a pozdní menopauza jsou asociovány se zvýšeným rizikem. Faktory, které snižují riziko vzniku rakoviny, jsou vyšší počet těhotenství, užívání orální antikoncepce, hysterektomie nebo podvaz vejcovodů (Kvåle *et al.*, 1988; Risch *et al.*, 1994; Rosenberg *et al.*, 1994; Booth *et al.*, 1989).

3.4 Klasifikace gynekologických nádorů

TNM systém pro klasifikaci zhoubných nádorů vyvinul francouzský chirurg Pierre Denoix mezi lety 1943 a 1952. V současnosti se lékaři řídí podle sedmého vydání TNM klasifikace vydaného v roce 2009 v zahraničí a v České republice v roce 2011. V každém vydání jsou uváděny vybrané změny klasifikace pro všechny typy maligních nádorů. Tato klasifikace musí být vždy přijata všemi národními komisemi pro TNM. Praxe rozdělování zhoubných nádorů do skupin a kategorií vznikla na základě dlouhodobého sledování případů. Lékaři si všimli, že míra přežití byla u případů lokalizovaného onemocnění vyšší nežli u pacientů, kde se onemocnění rozšířilo (metastazovalo) mimo orgán do okolních tkání. Stadium onemocnění v době diagnózy může být odrazem míry růstu a rozsahu nádoru, ale také typu nádoru a vztahu mezi ním a hostitelem. Rozdělení zhoubných nádorů do anatomických stadií (staging) se stalo tradicí a je nezbytné k tvorbě dalších analýz skupin pacientů. TNM klasifikace hodnotí anatomický rozsah nemoci, jež je určen klinicky a histopatologicky.

TNM systém je založen na hodnocení tří složek. První složka T podává informaci o rozsahu primárního nádoru, N o přítomnosti či nepřítomnosti metastáz v regionálních mízních uzlinách a o případném rozsahu těchto metastáz. Třetí složka M podává informaci o přítomnosti vzdálených metastáz v těle pacienta.

3.4.1 TNM klasifikace 2009

Vzorke, které jsem ve své práci zpracovávala, byly posuzovány pomocí TNM klasifikace z roku 2009. Pro pochopení statistického vyhodnocování jsem ji níže detailněji popsala pro každý typ nádoru zvlášť.

3.4.1.1 Nádory endometria

TNM klasifikace se používá pro endometriální karcinomy a karcinosarkomy (maligní smíšené mezodermální nádory). Nádor by měl být histologicky ověřen a měl by být určen histologický typ a stupeň diferenciacie (grade). Diagnóza by měla být založena na vyšetření vzorků získaných z biopsií endometria. U nádorů endometria jsou uváděny nejen stadia TNM, ale také stadia FIGO klasifikace. Stadia FIGO klasifikace jsou založena na

chirurgickém stagingu. Stadia TNM jsou založena na klinické a/nebo patologické klasifikaci.

TNM klinická klasifikace lékařům umožňuje vytvořit si představu o nádoru. Tato klasifikace je založena na nálezech získaných před léčbou a pomocí ní je volen vhodný způsob léčby. T popisuje primární nádor, N zasažení regionálních mízních uzlin a M přítomnost vzdálených metastáz. Regionální uzliny jsou v případě nádoru endometria uzliny pánevní a paraaortální. Hodnocení primárního nádoru (T) má několik kategorií, které se mohou dále dělit, podle stupně zasažení tkání. Tx znamená, že nádor nelze hodnotit, T0, že nádor není přítomen a Tis se užívá, pokud se jedná o karcinom in situ. T1 znamená, že nádor je omezen na tělo dělohy a odpovídá klasifikačnímu stadiu FIGO I. Stadium klinické klasifikace T1 rozlišujeme na dvě podstadia podle toho zda je postižena méně než ½ myometria (T1a) nebo na více než ½ (T1b). T1a, odpovídá stadiu IA podle FIGO klasifikace, T1b pak stadiu FIGO IB. Stadium T2, odpovídající FIGO stadiu II, je přiřazeno v případě, že nádor zasahuje do cervikálního stroma, ale nešíří se mimo dělohu. Stadium T3 a/nebo N1 se udává při lokálním a/nebo regionálním šíření a ve FIGO klasifikaci odpovídá stadiu III. Podle toho do jakých míst se dále nádor šíří se rozlišují stadia T3a (IIIA) a T3b (IIIB). Ve stadiu T3a nádor postihuje serózu těla děložního nebo adnexa. Ve stadiu T3b je postižena pochva nebo parametria (podpůrný aparát dělohy). Nádor se do okolních tkání šíří buď přímým šířením, nebo metastázami. Pokud je nádoru přiřazeno stadium FIGO IIIC, IIIC1 nebo IIIC2 odpovídá toto stadiu N1 podle TNM klasifikace 2009. Toto stadium je charakteristické proniknutím metastáz do pánevních nebo paraaortálních mízních uzlin. Stadium IIIC1 je uvedeno v případě zasažení pánevních mízních uzlin, IIIC2 v případě, že došlo k metastazování do paraaortálních mízních uzlin s metastázami nebo bez metastáz do pánevních mízních uzlin. Následující stadium T4 (IVA podle FIGO klasifikace) se uvádí, pokud nádor postihl sliznici močového měchýře nebo sliznici střeva. Poslední stadium M1 (IVB) je typické přítomností vzdálených metastáz. Hodnocení regionálních mízních uzlin (N) má tři stupně. Nx znamená, že regionální mízní uzliny nelze hodnotit, N0 nejsou přítomny metastázy v regionálních mízních uzlinách a N1 metastázy přítomny jsou. Klasifikace vzdálených metastáz (M) je hodnocena stejným způsobem. Mx, nelze hodnotit, M0 bez metastáz, M1 vzdálené metastázy jsou nalezeny. Vzdálené metastázy jsou všechny metastázy, které se nachází mimo regionální mízní uzliny (inguinální, nitrobřišní apod.), ale také v různých dalších

orgánech. Kategorie M1 může být dále specifikována dalším označením, které nám podává informaci o místě vzdálených metastáz, plicní metastázy, kostní, jaterní, uzlinové a další.

Patologická klasifikace pTNM je pooperační histopatologická klasifikace. Tato klasifikace je založena na nálezech získaných před léčbou doplněných nebo pozměněných dalšími nálezy, které byly získány při operaci a z patologického vyšetření nádoru. Je používána jako vodítko pro adjuvantní terapii a poskytuje doplňující data k odhadu prognózy. Kategorie pTa a pN pTNM patologické klasifikace odpovídají kategoriím klinické klasifikace T a N. Kategorie pM je klasifikována mikroskopicky a rozdělena opět na stadia pMx, pM0, pM1 s možnou další specifikací zasažených orgánů. Dále je však ještě hodnocena přítomnost izolovaných nádorových buněk nalezených v kostní dřeni pomocí morfologických technik (Sobin *et al.*, 2009).

Histopatologický grading se používá pouze u endometroidních adenokarcinomů. Serózní/papilární a světlobuněčný karcinom je klasifikován jako G3. U nádorů endometria se používají 3 stupně diference G1- dobře diferencovaný, G2 -středně diferencovaný a G3 označuje nízký stupeň diference nebo nediferencovaný karcinom. Nižší stupeň diference sebou obvykle nese těžší průběh nemoci a horší prognózu (Sobin *et al.*, 2009). Většina endometroidních karcinomů je dobře nebo středně diferencovaná (tzv. low grade) a má dobrou prognózu. Ženy s nádory označovanými jako high grade mají vyšší riziko návratu nemoci a vzniku metastáz (Amant *et al.*, 2005).

Tabulka č. 1 Klasifikace nádorů endometria

FIGO a TNM klasifikace nádorů endometria			
Stadium FIGO	T	N	M
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
II	T2	N0	M0
IIIA	T3a	N0	M0
IIIB	T3b	N0	M0
IIIC	T1, T2, T3	N1	M0
IVA	T4	Jakékoli N	M0
IVB	Jakékoli T	Jakékoli N	M1

3.4.1.2 Nádory prsu

TNM klasifikace se používá pro karcinomy prsu. Pomocí této klasifikace hodnotíme nádor z hlediska jeho velikosti a jeho rozšíření do okolních tkání, případně do zbytku těla. Písmeno T nám podává informaci o primárním nádoru, N vypovídá o zasažení regionálních mízních uzlin a M přítomnosti vzdálených metastáz. Regionální mízní uzliny jsou axilární, vnitřní mammární, supraklavikulární a intramammární. Metastázy kdekoli jinde se označují za metastázy vzdálené (M1). Stejně jsou hodnoceny i metastázy v mízních uzlinách krčních nebo druhostranných vnitřních mammárních. V hodnocení primárního nádoru prsu rozlišujeme klasifikaci Tx , primární nádor nelze hodnotit, T0, bez známek primárního nádoru a Tis, karcinom in situ. Karcinom in situ je dále rozlišován na duktální karcinom in situ, Tis (DCIS), lobulární karcinom in situ, Tis (LCIS). Třetí variantou je Tis (Paget) čímž se označuje Pagetova choroba bradavky bez spojení s invazivním karcinomem a/nebo s karcinomem in situ (DCIS a/nebo LCIS) nacházející se v prsním parenchymu. Další stadia jsou podobná jako u karcinomu endometria. Stadium T1 je uvedeno u nádorů, které nepřesáhly 2 centimetry ve svém největším rozměru. T1mi

je hodnocen nádor, u kterého byly nalezeny mikroinvaze do velikosti 0,1 cm v největším rozměru. Mikroinvaze představuje šíření nádorových buněk přes bazální membránu do okolních tkání. Stadium T1 se dále dělí do stadií T1a, T1b a T1c podle rozměru nádoru. T1a představuje nádor větší než 0,1 cm, ale menší než 0,5 cm v největším rozměru. T1b označuje nádor větší než 0,5 cm po 1 centimetr. Velikost nádoru ve stadiu T1c je 1 až 2 cm. Nádor hodnocený stadiem T2 je větší než 2 cm, ale nepřesahuje 5 cm v největším rozměru. Nádor větší než 5 centimetrů v největším rozměru je klasifikován jako stadium T3 a za T4 stadium je považován nádor jakékoli velikosti, který se dále přímo šíří do stěny hrudní a/nebo do kůže. Stadium T4 se rozlišuje do 4 dalších podskupin. Nádor označený stadiem T4a je rozšířen do hrudní stěny, T4b označuje stav, kdy jsou nalezeny stejnostranné ulcerace (tvorba vředů), kožní uzly nebo edém kůže. T4c je klasifikováno v případě, že se nádor šíří do hrudní stěny a navíc jsou přítomny příznaky ze stadia T4b. Stadium T4d se nazývá inflamatorní karcinom prsu a nemusí být přítomna nádorová masa pod kůží (Sobin *et al.*, 2009).

Histopatologický grade invazivních karcinomů prsu je určován podle publikace Elston a Ellis z roku 1991. Nádor je komplexně hodnocen z hlediska tubulární formace (1-3 body), jaderných pleomorfismů (1-3 body) a počtu mitóz (1-3 body). Čím větší počet bodů je dosažen, tím je grade vyšší. Dobře diferencovaný nádor získá 3-5 bodů (G1), středně diferencovaný nádor 6-7 bodů (G2), 8-9 bodů málo diferencovaný tumor (G3). Všeobecně platí, že vyšší stupeň diferenciace (G3) je spojen s horší prognózou.

Dalším kritériem hodnocení je rozšiřování primárního nádoru do regionálních mízních uzlin (N), za které, jak jsem uvedla výše, jsou považovány mízní uzliny axilární, vnitřní mammární, supraklavikulární a intramammární. Přičemž se vždy jedná o mízní uzliny, které se nachází na stejné straně těla jako nádor. Nalezneme-li tedy nádor v pravém prsu, hodnotíme pak jako regionální mízní uzliny ty na straně pravé. Pokud je primární nádor rozšířen i do levých uzlin je to již považováno za vzdálené metastázy. Označení Nx opět znamená, že regionální mízní uzliny nelze hodnotit, N0 značí nepřítomnost metastáz. Následují stadia N1 až N3, kdy se zvyšujícím se číslem N je rozšíření metastáz větší. Ve stadiu N1 je v podstatě postižena pouze pohyblivá stejnostranná axilární mízní uzlina. Ve stadiu N2, které je dále děleno na N2a a N2b mohou být zasaženy i mammární stejnostranné mízní uzliny. Stadium N3 je nejtěžší stadium, ve kterém mohou být zasaženy všechny výše jmenované regionální mízní uzliny. Podle toho, které uzliny jsou zasaženy,

se dělí na stádium N3a, N3b a N3c. Vzdálené metastázy jsou opět hodnoceny stadii Mx, nelze hodnotit, M0, vzdálené metastázy nejsou přítomny a M1 metastázy byly nalezeny. Nádory ve stadiu M1 mohou být v patologické pTNM klasifikaci blíže specifikovány, podle toho, do kterého orgánu metastazovaly. Kategorie pT a pM patologické pTNM klasifikace odpovídají kategoriím T a M klinické TNM klasifikace. K posouzení přítomnosti metastáz v regionálních mízních uzlinách je odebráno při operaci 6 a více mízních uzlin. Stadia pN se stejně jako v klinické klasifikaci hodnotí, pNx, pN0 a dále pN1, pN2 a pN3. Opět se zvyšujícím se číslem pN, je výskyt metastáz vyšší a je zasaženo více mízních uzlin (Sobin *et al.*, 2009)

Tabulka č. 2 Klasifikace nádorů prsu

Stadia a TNM klasifikace nádorů prsu			
Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0, T1	N1mi	M0
IIA	T0, T1	N1	
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	
	T3	N0	M0
IIIA	T0, T1, T2	N2	
	T3	N1, N2	M0
IIB	T4	N0, N1, N2	M0
IIIC	Jakékoli T	N3	M0
IV	Jakékoli T	Jakékoli N	M1

3.4.1.3 Nádory vaječníků

Klasifikace je používána pro zhoubné nádory epiteliálního i stromálního původu, nádorů hraniční malignity (borderline malignancy) a pro nádory s nízkým maligním potenciálem. Definice kategorií TNM odpovídají stádiím FIGO klasifikace. Patologická klasifikace pT a pN odpovídá klinické klasifikaci TNM. T opět hodnotí primární nádor. Tx nelze hodnotit, T0 znamená, že primární nádor nebyl nalezen. Existují tři kategorie T1, T2 a T3, které se dále dělí do skupin jako u předešlých diagnóz. Pokud se primární nádor omezuje pouze na vaječník, na jeden či oba, je hodnocen kategorií T1, která odpovídá stadiu I podle FIGO klasifikace. Toto stadium se dále dělí na T1a, T1b a T1c. Kategorie T1a (FIGO IA) je uvedena v případě, že je zasažen pouze jeden vaječník, jeho pouzdro je neporušené, na povrchu ovaria není nádor a nádorové buňky nejsou ani v peritoneálním výplachu. Kategorie T1b (IB) má stejné charakteristiky s tím rozdílem, že jsou zasaženy oba vaječníky. V případech, kdy je pouzdro vaječníku porušené, na povrchu je viditelný nádor, který je však omezen pouze na jeden nebo oba vaječníky či jsou detekovány maligní buňky v dutině břišní, patologové klasifikují nádor jako T1c (IC). Kategorie T2 (II) je rovněž rozdělena do tří podkategorií T2a, T2b a T2c. V této kategorii již dochází k šíření primárního nádoru do pánevní oblasti. Nádor je klasifikován T2a v případě, že je zasažena děloha a/nebo vejcovody, ale výplach břišní dutiny je negativní na přítomnost rakovinných buněk. Kategorie T2b je určena v případě šíření nádoru na jiné pánevní tkáně a T2c pokud je zasažena kterákoli z pánevních tkání a navíc jsou nalezeny maligní buňky v peritoneu. Kategorie T3 a/nebo N1 odpovídá stadiu III podle FIGO klasifikace a je tak hodnocen nádor, který postihuje nejen vaječníky, ale také jsou přítomny peritoneální metastázy mimo pánev a/nebo metastázy v regionálních mízních uzlinách. Skupina T3a je charakteristická přítomností mikroskopických peritoneálních metastáz mimo pánevní oblast, u T3b pak i makroskopických metastáz, jejichž velikost v největším rozměru nepřesahuje 2 cm. Kategorie T3c a/nebo N1 je klasifikována pokud jsou peritoneální metastázy mimo pánev větší než 2 cm v největším rozměru a/nebo jsou zasaženy regionální mízní uzliny (hypogastrické, společné ilické, zevní ilické, sakrální laterální, paraaortální a inguinální). Poslední kategorií je M1, podle FIGO klasifikace stadium IV, kdy jsou přítomny vzdálené metastázy. U tohoto typu nádoru je také určován histopatologický grade, neboli stupeň diferenciacie nádoru. Gx se udává, pokud stupeň diferenciacie nelze hodnotit, G1 označuje dobře diferencovaný karcinom, G2 středně diferencovaný a G3 málo diferencovaný nebo

nediferencovaný karcinom. Důležité je, že čím nižší stupeň diferenciacie, tím horší prognóza. Dobře diferencované karcinomy rostou pomaleji, méně diferencované karcinomy bývají agresivnější a častěji metastazují (Sobin *et al.*, 2009).

Tabulka č. 3 Klasifikace nádorů ovaria

FIGO a TNM klasifikace nádorů vaječníků			
FIGO	T	N	M
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
IC	T1c	N0	M0
IIA	T2a	N0	M0
IIB	T2b	N0	M0
IIC	T2c	N0	M0
IIIA	T3a	N0	M0
IIIB	T3b	N0	M0
IIC	T3c Jakékoli T	N1	M0
IV	Jakékoli T	Jakékoli N	M1

4. Metody detekce fetálních buněk

4.1 Kvantitativní PCR v reálném čase

Popis metody polymerázové řetězové reakce byl publikován již v roce 1987 (Mullis a Faloona, 1987). V roce 1992 publikoval Higuchi *et al.* poprvé metodu využívající detekci vznikajícího PCR produktu přímo během reakce použitím interkalačního barviva (etidium bromid). Fluorescence etidium bromidu se zvyšuje v přítomnosti dvouvláknové DNA a tak se s přibývajícím reakčními produkty zvyšuje. V roce 1991 Holland *et al.* jako první publikovali studii, ve které upozornili na možné využití 5' → 3' exonukleázové aktivity termostabilní Taq DNA polymerázy k detekci produktu vznikajícího během PCR. Během amplifikace 5' → 3' exonukleázová aktivita termostabilní Taq DNA polymerázy štěpí specifické sondy, které hybridizují k cílové sekvenci. Použité sondy značené na 5' konci jsou degradovány na menší fragmenty, které můžeme odlišit od nedegradovaných sond. V následujících letech probíhal vývoj nových vhodných fluorescenčních sond umožňujících další zlepšení analýz PCR v reálném čase (Livak *et al.*, 1995).

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (PCR) v reálném čase je metoda umožňující detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA nebo RNA. Akumulace PCR produktu je měřena pomocí fluorogenní sondy, tzv. TaqMan sondy. Tato metoda poskytuje velmi přesnou a reprodukovatelnou kvantifikaci sledovaného genu. Na rozdíl od jiných kvantitativních metod PCR, PCR v reálném čase nevyžaduje žádné další manipulace se vzorkem poté co je dokončena genová amplifikace. Předem se tak nežádoucí kontaminaci vzorku a výsledkem je mnohem rychlejší a vysoce výkonná analýza. Metoda kvantitativní PCR v reálném čase má velký dynamický rozsah výchozího stanovení cílové molekuly, nejméně pět řádů (Heid *et al.*, 1996). Na rozdíl od klasické PCR metody, po níž je třeba následně určit množství amplifikovaného produktu na agarózovém gelu pomocí elektroforézy, PCR v reálném čase nám požadované údaje pro kvantifikaci cílové nukleové kyseliny bezprostředně poskytne. Výsledky mohou být vyjádřeny v absolutních hodnotách po odečtu ze standardních křivek nebo v relativním vyjádření v porovnání s amplifikací cílové sekvence přítomné v referenčním vzorku.

Kvantifikace vyžaduje stejnou účinnost amplifikační reakce ve všech vzorcích. V důsledku toho je velmi důležité, aby se účinnost velmi nelišila, vzhledem k malým

rozdílům mezi vyšetřovanými vzorky. Je proto nutná pečlivá optimalizace podmínek PCR. Použitím sond je zvýšen výkon a rozsah vhodných systémů, které jsou dostupné. Všeobecně je analýza kvantitativní PCR v reálném čase velmi přesnou a citlivou metodou s širokým detekčním rozsahem (Saunders, 2004).

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase je založena na měření fluorescenčního signálu generovaného v průběhu PCR jako důsledek syntézy amplikonu. Fluorescenční signál je měřen a zaznamenáván průběžně v každém cyklu reakce speciálními detektory. Tato metoda je vhodná k identifikaci specifického genu, v případě mé práce genu *SRY* na Y chromozomu. Existují 2 techniky pro měření fluorescenčního signálu. První technika používá barvivo SYBR Green, které váže dvouřetězcovou DNA. V této technice jakýkoli amplikon, který je syntetizován naváže barvivo a generuje fluorescenční signál, který je následně detekován. Druhá technika je více využívána a používá sekvenčně specifické fluorescenční sondy, které hybridizují k cílové sekvenci (FRET) během anelační a extenzivní fáze reakce. Nejčastěji se využívají v PCR v reálném čase tzv. TaqMan sondy. Emisní spektrum fluorescenční reportérové barvy na 5' konci sondy je efektivně zhaseno druhou fluorescenční barvou na 3' konci sondy dokud je sonda neporušená. Během PCR může sonda hybridizovat k cílové sekvenci po denaturačním kroku. Fluorescenční signál je produkován během extenze primeru. V průběhu polymerázové řetězové reakce se hybridizují ke svým cílovým sekvencím jak primery (forward i reverse), tak i sondy, které hybridizují mezi oba primery. Jak jsou primery prodlužovány během extenzní fáze každého amplifikačního cyklu, *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polymeráza postupující ve směru 5' → 3' dojde k 5' konci značené sondy a 5' nukleázovou aktivitou odstraní reportérovou barvu sondy, která jí stojí v cestě. To způsobí odštěpení reportérové barvy a oddálení od zhasěče, který bránil emisi fluorescence. Výsledkem je detekce fluorescenčního signálu. Tento proces pokračuje, dokud není celá sonda odstraněna z templátu a amplikon není kompletní (Snider *et al.*, 2001).

4.2 Fetální marker

Ve své práci jsem zjišťovala přítomnost buněk plodu mužského pohlaví ve tkáních nádorů endometria, prsu a ovaria. Jako fetální marker jsem použila gen *SRY* nacházející se

na Y chromozomu. Použití tohoto markeru k detekci fetálního mikrochimérismu bylo prokázáno jako vhodnější než sekvence *DYS-14* (Hromadnikova *et al.*, 2009).

DYS-14 sekvence je součástí lidského Y-specifického genu *TSPY*. Gen *TSPY* se nachází na krátkém raménku Y chromozomu přibližně v 20-40 kopiích podle Vogt *et al.* (1997). Interindividuální variace v počtu kopií *DYS-14* je pak mnohem větší, pohybuje se v rozmezí 50-200 kopií na 1 Y chromozom (Vogel and Schmidtke, 1998). Původně byl gen *TSPY* definován genomovou sondou pJA36B2 (*DYS-14*, která detekovala poly (A)⁺ RNA transkripty v lidské testikulární tkáni). Nicméně se zdá, že je tato sonda pseudogenem k pJA923 (*TSPY*) (Arnemann *et al.*, 1991). Exprese *TSPY* u člověka je specifická pro testes. *TSPY* je exprimován ve spermatogoniích a v menší míře také v nezralých spermatocytech.

Hromadnikova *et al.* (2009) ve své práci poukázali na fakt, že počet kopií genu *DYS-14* je u jednotlivých mužů variabilní. Interindividuální variace počtu kopií *DYS-14* se podle absolutní kvantifikace pohybuje v rozmezí 27,4-102,5 (mean 52,6; median 51,7), čemuž odpovídá i relativní kvantifikace. Variace v počtu kopií *DYS-14* znamená značně problematické vyhodnocování výsledků analýz využitých ke zkoumání fetálního mikrochimérismu. K prokázání vlivu této variability na hodnocení a kvantifikaci extracelulární fetální DNA v mateřském krevním oběhu u normálních a komplikovaných těhotenství vyšetřovala variace v počtu kopií sekvence *DYS-14* u zdravých mužů. Ve studii bylo zahrnuto 55 zdravých mužů, 43 zdravých těhotných žen, které nosily syna a 15 těhotných žen s placentární insuficiencí. Vzorky byly analyzovány pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase a jako markery byly použity sekvence *DYS-14*, pohlaví určující region Y chromozomu (gen *SRY*) a gen pro beta-globin (*GLO*). Zvýšené úrovně extracelulární DNA byly detekovány u těhotenství s placentární insuficiencí oproti kontrolám ve stejném gestačním věku. Byla nalezena výrazná variace v počtu kopií *DYS-14* u zdravých mužů (mean 52,6) a extracelulární DNA. Nižší počet kopií *DYS-14* byl pozorován u komplikací spojených s placentární insuficiencí (mean 83,5) ve srovnání s nekomplikovaným těhotenstvím (16. týden: mean 114,2; p= 0,02 a 36. týden: mean 142,8; p= 0,04). Počet kopií *DYS-14* byl vyšší v extracelulární DNA v průběhu gestace podobně jako u zdravých mužů. Na základě toho, že se potvrdila interindividuální variace v počtu kopií *DYS-14*, byl vyhodnocen tento marker jako nevhodný pro kvantifikaci

extracelulární DNA u normálního a komplikovaného těhotenství (Hromadnikova *et al.*, 2009).

Sekvence *DYS-14* se tedy nachází v genotypu ve více kopiích, jejichž počet je navíc u jednotlivých jedinců rozdílný. Kvantifikace proto může být značně zavádějící a může být nadhodnocena nebo naopak podhodnocena. Výsledky analýz genu *SRY* a *GLO* prokázaly uspokojivou přesnost v rozlišení mezi normálním a komplikovaným těhotenstvím (91,7% *SRY*, 94,4% *GLO*), analýzy *DYS-14* ovšem tak přesné nebyly (68,8%). Gen *SRY* nacházející se na Y chromozomu v jediné kopii se tedy jeví jako vhodnější marker ke kvantifikaci extracelulární fetální DNA v mateřské cirkulaci.

Většina studií posuzujících pohlaví plodu či kvantifikujících mužskou fetální DNA v mateřské cirkulaci používá k určení pohlaví gen *SRY*, který se nachází na chromozomu Y pouze v jedné kopii (Lo *et al.*, 1999a; Smid *et al.*, 2001). Nicméně některé vědecké skupiny použily pro zvýšení detekčního limitu fetální DNA v periferní krvi těhotných žen jako fetální marker právě sekvenci *DYS-14*, která se nachází na Y chromozomu ve více kopiích (Sekizawa *et al.*, 2003, Zimmermann *et al.*, 2005, 2006). Zhong *et al.* (2007) ve své práci porovnal výsledky analýz s použitím fetálního markeru *SRY* i *DYS-14*, aby zjistil, zda je možné používat oba markery ke zkoumání zvýšené hladiny cirkulující mužské fetální DNA v krvi matky. Podle jeho závěrů to možné je. Nicméně, jak je uvedeno výše, kvantifikace není tak přesná, jak by mohla být s použitím genu *SRY* jako fetálního markeru.

5. Cíle práce

Ve své práci jsem se snažila zodpovědět některé otázky týkající se role fetálního mikrochimérismu v patogenezi nádorů endometria, prsu a ovaria. Zjišťovala jsem, zda se fetální buňky nalézají ve všech tkáních postižených nádorem endometria, prsu či ovaria nebo pouze v některých případech. Získané výsledky jsem porovnávala mezi sebou, abych zjistila, zda je frekvence a koncentrace fetálních buněk ve vyšetřovaných tkáních vyšší u karcinomů či u kontrol (tkáně bez malignizace). Zpracovala jsem tkáně nativní, hluboce zmražené a také buněčné kultury kultivované z nativních tkání. Pro navýšení počtu vzorků jsem měla také zkoumat přítomnost fetálního mikrochimérismu v tkáních prsu zalitých v parafínových blocích. Bohužel jsem tyto vzorky nemohla zařadit do své diplomové práce z důvodu nízké výtěžnosti DNA. V těchto tkáních jsem stanovovala přítomnost fetální DNA plodu mužského pohlaví s využitím *SRY* genu jako markeru, který se nachází na Y chromozomu. Zároveň jsem stanovovala množství fetálního genomu v mateřských tkáních. Na základě těchto zjištění jsem vyhodnocovala vztah mezi kvantitou fetálního mikrochimérismu a závažností a prognózou daného onemocnění.

K izolaci DNA z tkání jsem u nativních a hluboce zmražených tkání využívala QIAamp DNA Mini Kit, DNA z kultivovaných buněčných kultur jsem izolovala pomocí DSP DNA Blood Mini Kitu a v případě tkání zalitých v parafínu jsem použila QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Fetální DNA jsem detekovala a kvantifikovala pomocí kvantitativní PCR v reálném čase.

6. Materiál a metody

6.1 Materiál

Ve své práci jsem pracovala se vzorky tkání získaných z nádorů endometria, vaječníků, prsu a s tkáněmi nenádorovými, které byly použity jako kontrolní vzorky. Vyšetřované vzorky tkání pacientek byly získány od žen, které podstoupily chirurgický zákrok, a kterým byl odstraněn nádor. Jako kontrolní vzorky jsem využila tkáně žen s jinými diagnózami, které vedly k chirurgickému zákroku. Na sběru tkáňových vzorků jsem spolupracovala s Fakultní nemocnicí Královské Vinohrady, svou práci jsem pak prováděla na 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy. Část použitých vzorků sestávala ze zamražených tkání, které byly skladovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, část z nativních tkání, skladovaných v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a část z kultivovaných buněk.

6.1.1 Hluboce zmražené tkáně

Hluboce zmražené vzorky jsem získala z Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Tyto vzorky endometrií byly skladovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jednalo se o vzorky tkání s diagnózou nádoru ovaria, 11 pacientek, a 49 vzorků tkání endometria. Skupina tkání endometria byla rozdělena na 47 pacientek s nádorem endometria a vzorky tkání od dvou žen, bez nádorového onemocnění, které byly vedeny jako kontroly. Tyto ženy měly různé diagnózy, 41 ženám byl diagnostikován endometroidní adenokarcinom, třem pacientkám karcinosarkom, dvěma světlobuněčný karcinom a jedné pacientce serózní papilární adenokarcinom. Průměrný věk pacientek byl 66,4 let. Nejmladší ženě, u které byl nádor endometria diagnostikován, bylo 44 let, nejstarší pak 90 let. Jedna žena uvedla, že nebyla nikdy těhotná, osm žen bylo gravidních pouze jednou, dvacet pacientek bylo gravidních dvakrát, jedenáct třikrát, jedna čtyřikrát, tři ženy pětkrát, šestkrát a sedmkrát vždy jedna pacientka. U jedné ženy jsem informace o četnosti gravidit, počtu porodů a o abortech nezískala. Jeden porod byl uveden u dvanácti pacientek, 26 žen rodilo dvakrát, šest žen třikrát a jedna pětkrát. Jedna pacientka těhotná nikdy nebyla. Osm pacientek podstoupilo jednu umělé přerušování těhotenství, jedna dvakrát, jedna třikrát, jedna čtyřikrát a jedna pětkrát. Pouze u dvou žen byl uveden spontánní abort. Přítomnost mikrochimérismu může

být dále vysvětlena možnou transfuzí krve. Osm pacientek mělo v anamnéze krevní transfuzi. Podle hodnocení diferenciacie nádoru, mělo deset pacientek nádor ve stadiu G1, 20 pacientek ve stadiu G2 a šestnáct ve stadiu G3. U jedné pacientky grade nebyl uveden. Podle TNM klasifikace mělo šest pacientek nádor ve stadiu pT1a, dvacet pacientek ve stadiu pT1b, sedm ve stadiu pT1c, čtyři ženy měly nádor ve stadiu pT2a, jedna ve stadiu pT2b, šest pacientek ve stadiu pT3a, dvě pT3b a jedna ve stadiu pT3c. Dále byla hodnocena přítomnost rozšíření nádoru do regionálních mízních uzlin u 23 pacientek a u 24 žen toto nebylo určeno. Z celkového počtu 23 pacientek nebyly u 19 žen přilehlé mízní uzliny zasaženy a pouze u čtyř žen bylo rozšíření prokázáno. Přítomnost vzdálených metastáz byla vyšetřována u 46 pacientek a pouze u jediné tato informace nebyla uvedena. U dvou pacientek pak byly vzdálené metastázy v těle nalezeny. Podle FIGO klasifikace bylo 26 pacientek hodnoceno ve stadiu IA, osm ve stadiu IB, jedna IIB, u tří žen byl nalezen nádor ve stadiu IIIA, u jedné ve stadiu IIIB, u tří pacientek ve stadiu IIIC1, u jedné IIIC2 a u dvou stadium IVB. U dvou pacientek nebylo hodnoceno. U větší části pacientek, 36 žen, jsem dále získala informace o jejich BMI. Body mass index pacientek se pohyboval v rozmezí 19 až 50, průměrná hodnota byla 32,1. Tkáňové vzorky měly průměrnou hmotnost 80,2 mg, v rozmezí od 33,4 do 274,35 miligramů.

K této skupině vzorků jsem získala pouze dva kontrolní vzorky, od žen které neměly nádorové onemocnění. Jedna z žen v kontrolní skupině byla operována kvůli polypu endometria, u druhé ženy důvod operace nebyl uveden. Tyto ženy byly ve věku 53 a 55 let. Jedna z nich nikdy těhotná nebyla a druhá byla třikrát gravidní, porodila dvě děti a podstoupila jedenkrát umělé přerušování těhotenství. BMI u nich nebyl uveden. Hmotnost vzorků činila 43,79 a 67,15 miligramů.

Získala jsem také hluboce zmražené tkáně od 11 pacientek s karcinomem ovaria. Průměrná hmotnost vzorku činila 69,5 mg (v rozmezí od 30,44 do 128,78 mg). Klinická data pacientek jsem zatím nezískala.

6.1.2 Nativní tkáně

Nativní tkáně jsem získala z oddělení patologie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Vzorky nádoru nebo kontrolní tkáně byly bezprostředně po operaci vloženy do pětimililitrových zkumavek s roztokem PBS a uloženy do lednice při 7°C. Tentýž nebo

nejpozději druhý den po operaci byly vzorky zpracovány. Prvotní zpracování vzorku zahrnovalo jeho rozdělení na několik částí. Počet vytvořených řezů závisel na velikosti dodaného vzorku. Tkáně byly uloženy do dvoumililitrových plastových zkumavek buď do 300 µl 1% roztoku penicillin-streptomycinu v PBS, nebo do dvoumililitrových plastových zkumavek s 300 mikrolitry RNA lateru. Takto zpracované vzorky byly následně uloženy do mrazicího boxu při -20 °C. U některých vzorků byla část tkáně použita ke kultivaci. Hmotnost nativních tkání zamražených ve zkumavkách a dále použitých k izolaci DNA činila průměrně 58 miligramů, v rozmezí 12,74- 168,22 miligramů. Takto byly zpracovány všechny získané nativní tkáně. Tyto nativní tkáně zahrnovaly jak kontroly, tak vzorky z nádorů endometria, prsu a vaječníků. U některých pacientek byly odebrány dva oddělené vzorky. Jeden vzorek z místa nádoru a druhý z nezasazené tkáně. Výsledky positivity fetálního mikrochimérismu z jednotlivých vzorků pak byly porovnány mezi sebou.

Nativní vzorky s diagnózou nádoru prsu

Zpracovala jsem celkem šest vzorků prsní tkáně získaných od pěti pacientek operovaných kvůli diagnostikovanému nádoru prsu. Od jedné pacientky jsem získala dva vzorky z různých částí prsu a od jedné pacientky jsem pracovala pouze s kultivovanými buňkami. Pacientky měly různé diagnózy, dvěma byl diagnostikován invazivní lobulární karcinom prsu, jedné pacientce invazivní duktální karcinom prsu, jedné medulární karcinom prsu a jedné špatně diferencovaný invazivní duktální karcinom prsu. Věk pacientek se pohyboval v rozmezí 29 až 72 let. Hmotnost vzorků byla průměrně 67,04 v rozmezí od 44,8 do 79,4 miligramů. Vzorky byly po dodání ihned prvotně zpracovány a uloženy do -20°C v dvoumililitrových plastových zkumavkách v 1% roztoku PBS a streptomycinu a v RNA lateru. U čtyř pacientek byla část tkáně použita ke kultivaci, z nichž u některých byla kultivována jak primokultura, tak i následná buněčná pasáž. U všech pěti pacientek jsem získala informace o TNM klasifikaci, grade a zda byl nádor rozšířen do mízních uzlin. Informace o vzdálených metastázách jsem obdržela pouze od čtyř pacientek, nicméně u pacientek, u kterých toto známo je, nebyly vzdálené metastázy přítomny. Metastázy v přilehlých mízních uzlinách byly přítomny pouze u jedné pacientky, u tří nebyly hodnoceny a u jedné pacientky nebyly prokázány. Metastázy v přilehlých axilárních mízních uzlinách byly prokázány u pacientky se stupněm diferenciacie nádoru G2 až G3. Nádory označené G3 bývají agresivnější, rychle rostoucí a častěji metastazují, proto mají horší prognózu než ty s nižším gradem. V tomto případě se tento fakt odrazil

v přítomnosti metastáz v přilehlých mízních uzlinách. Nicméně to není pravidlem. U dalších dvou pacientek s nádorem v G3 stadiu metastázy nebyly přítomny. 2 pacientky měly nádor ve stadiu G1, 1 ve stadiu G2 až G3 a dvě ve stadiu G3. Dvěma pacientkám byl diagnostikován nádor prsu ve stadiu pT1c a třem ve stadiu pT2. U karcinomu prsu se FIGO klasifikace neprovádí. Klinická data o četnosti gravidit, porodů, spontánním abortu a umělém přerušení těhotenství a BMI jsem zatím nezískala.

Nativní vzorky s diagnózou nádoru vaječnicků

Získala jsem vzorky od 14 pacientek, které podstoupily operaci vaječnicků, z toho 12 z nich kvůli diagnóze nádoru vaječnicků. 2 ženy, které neměly maligní tumor, jsem zařadila do skupiny kontrol. Ženy, tvořící skupinu kontrol, byly operovány na základě různých diagnóz, první žena kvůli benigní ovariální cystě a druhá žena z důvodu benigního acinózního cystadenomu. Ve skupině pacientek byl 4 ženám diagnostikován serózní papilární cystadenokarcinom ovaria, jedné serózní karcinom vejcovodu a tkáň k analýze byla odebrána z benigního Brennerova tumoru, jedné pacientce diagnostikovali acinózní border-line tumor ovaria, 1 pacientce border-line mucinózní tumor ovaria endocervikálního typu, 1 pacientce karcinosarkom ovaria, jedné solidně uspořádaný adenokarcinom tuby, jedné benigní Brennerův tumor, u jedné pacientky se jednalo o metastázy karcinomu gastrointestinálního traktu do ovaria a u jedné byl v ovariu zachycen málo diferencovaný endometroidní karcinom. Průměrná hmotnost vzorků pacientek byla 73,2 mg (v rozmezí od 30,72 do 156,45 mg). Hmotnost vzorků kontrol byla 53,09 a 112,41 mg. Vzorek od jedné pacientky byl vyřazen, kvůli falešné negativitě analýzy, jak se později ukázalo. U jedné pacientky nebyl uveden věk. Průměrný věk zbylých deseti pacientek činil 66,7 let (medián 68 let), rozmezí věku 48 až 81 let. Věk žen vedených jako kontroly byl 79 a 80 let. Klinická data o četnosti gravidit, porodů, umělých přerušení těhotenství, spontánních abortů a BMI jsem zatím nezískala. U části pacientek jsem získala informace o nádoru. Dvěma pacientkám byl diagnostikován nádor ve stadiu pT1a, jedné pT1c, třem pT3a, jedné pT3b a dvěma pT3c. U sedmi pacientek jsem získala informaci o stupni diferenciaci nádoru a u všech byl ve stadiu G3. U 3 pacientek byla hodnocena přítomnost metastáz v regionálních mízních uzlinách a u jedné byly metastázy nalezeny. Dvěma pacientkám byla také hodnocena přítomnost vzdálených metastáz a u jedné byly přítomny. FIGO klasifikace byla uvedena pouze u tří pacientek, u jedné stadium IIIA, u jedné IIIC2

a u jedné IV. U některých diagnóz se FIGO klasifikace neuvádí a u části pacientek nebyla uvedena.

Nativní vzorky s diagnózou nádoru endometria

Zpracovala jsem nativní vzorky tkání od 18 pacientek s diagnózou nádoru endometria, z toho u 16 žen se jednalo o endometroidní adenokarcinom, jedné ženě byl diagnostikován karcinosarkom a jedné serózní papilární karcinom. Průměrný věk v době diagnózy u těchto pacientek byl 61,9 let, v rozmezí od 48 do 81 let. Kromě věku jsem získala i další informace o graviditě, počtu porodů, umělém i spontánním potratu, transfuzi a klasifikaci nádoru. Na základě těchto informací jsem zjistila, že šestnáct žen z osmnácti bylo v minulosti gravidních, z toho tři ženy jednou, šest žen dvakrát, pět žen třikrát a dvě ženy čtyřikrát. Jedna pacientka uvedla, že nikdy těhotná nebyla a tudíž ani nerodila a u jedné jsem informace nezískala. Celkem patnáct žen porodilo nejméně jedno dítě, s tím, že pohlaví dítěte v datech nebylo uvedeno. Dvě ženy nikdy nerodily, u jedné pacientky data chyběla. Umělé přerušování bylo provedeno u čtyř žen a spontánní abort byl uveden u dvou pacientek. U jedné pacientky je známo, že jí byla podána transfuze krve, která mohla být zdrojem mužských buněk v tkáni. V informacích byl dále blíže specifikován a klasifikován nádor, pro který byla pacientka operována. U všech osmnácti pacientek byl u nádoru hodnocen stupeň diferenciací nádoru (grade) a TNM klasifikace. FIGO bylo určeno pouze u 8 žen. Čtyři pacientky měly nádor ve stadiu G1, sedm ve stadiu G2 a sedm ve stadiu G3. Nádor je dále posuzován pomocí TNM klasifikace. T nám podává informaci o rozsahu nádoru, N popisuje rozšíření nádoru do regionálních uzlin a rozsah tohoto postižení. M nám podává informaci o tom, zda jsou přítomny vzdálené metastázy v odlehlých tkáních a orgánech těla. Z celkem osmnácti pacientek byl nádor ve stadiu pT1a určen u osmi žen, pT1b u pěti, po jedné pacientce pT1c, pT2, pT2a a u dvou pacientek byl nádor ve stadiu pT3a. Rozšíření nádoru do přilehlých mízních uzlin nebylo hodnoceno u dvanácti z osmnácti pacientek. Tři pacientky měly nádor ve stadiu N1, regionální uzliny byly zasaženy, a tři ženy ve stadiu N0, uzliny nebyly postiženy. Přítomnost vzdálených metastáz nebyla hodnocena (Mx) u devíti žen, u osmi pacientek vzdálené metastázy nebyly nalezeny (M0) a pouze u jediné pacientky byly metastázy nalezeny (M1). Hodnocení dle FIGO klasifikace bylo poskytnuto u osmi pacientek, z nichž sedmi byl přiřazen stupeň IA, nádor je omezen na místo primárního výskytu. U jedné pacientky bylo určeno stadium IIIC2, to znamená, že onemocnění se lokálně šíří, ale nemetastazuje dále do těla. BMI

v datech uvedeno nebylo. Průměrná hmotnost analyzovaných vzorků činila 53,33 miligramů, v rozmezí od 21,61 do 113,21 miligramů.

Kontrolní skupinu tvořilo 28 žen, které neměly maligní nádor endometria. U 12 žen jsem získala informace o důvodu operace. 5 žen podstoupilo operaci na základě diagnózy uterus myomatosus, dvě ženy kvůli sekretorickému endometriu, jedné ženě diagnostikovali endometroidní ovariální cystu a proliferativní endometrium. Jedna žena podstoupila operaci z důvodu proliferativního endometria a funkčního polypu, jedna kvůli adenomyóze a proliferativnímu endometriu, jedné bylo diagnostikováno sekretorické endometrium a leiomyóza a jedné inaktivní prosté místy cystické endometrium. U 15 žen jsem získala informaci o věku a pouze u 14 žen klinická data, která podávají informaci o četnosti gravidit, porodů, spontánních abortů a umělých přerušení těhotenství. Průměrný věk žen v kontrolní skupině byl 45,6 let (v rozmezí od 36 let do 64 let). 2 ženy nebyly nikdy gravidní, 4 ženy byly gravidní jednou, 3 ženy dvakrát, 1 žena třikrát, 3 ženy čtyřikrát a 1 žena šestkrát. 3 ženy nikdy neporodily, 3 ženy porodily jednou, 6 žen dvakrát a 2 třikrát. 11 žen nikdy nepodstoupilo umělé přerušování těhotenství, jedna žena ho podstoupila jednou a 2 ženy dvakrát. 11 žen neprodělalo nikdy spontánní abort a 2 ženy spontánně potratily jednou a 1 žena třikrát. Průměrná hmotnost analyzovaných vzorků činila 36,92 miligramů, v rozmezí od 5,56 do 89,59 miligramů.

6.1.3 Kultivované tkáně

Tkáně použité ke kultivaci byly rozřezány na přibližně pět až šest řezů o velikosti 2x2 milimetry. Tyto řezy byly vloženy do kultivačních nádob o obsahu 25 cm² a nebo 75 cm². Na dno kultivační nádoby byly tyto řezy rovnoměrně rozmístěny tak, aby měly dostatek prostoru pro další růst. Pěstované buňky ke svému přežití a proliferaci in vitro vyžadují vhodné podmínky, povrch kultivační nádoby, složení media vhodné pro kultivovanou buněčnou linii, správnou teplotu a složení atmosféry. Ke vzorkům v menších kultivačních nádobách bylo přidáno 1 až 2 mililitry media, do větších nádob 4 až 5 mililitrů media. Buněčné kultury byly pěstovány v mediu složenému z AmnioMax C-100 Basal (Gibco, Invitrogen Corporation, NY, USA) a AmnioMax Supplement (Gibco, Invitrogen Corporation, NY, USA) v poměru 6 dílů AmnioMax basal a 1 díl AmnioMax Supplement. Po překročení tří týdnů kultivace jsem přidala k mediu navíc 1% Fungizone (Antymicotic, Gibco, Invitrogen Corporation, NY, USA). Kultivační nádoby se vzorky

byly umístěny do CO₂ inkubátoru (New Brunswick) a uchovávány při teplotě 37°C s 5% CO₂ po dobu přibližně jeden měsíc. V inkubátoru by také měla být vhodná vlhkost vzduchu, aby nedocházelo k odpařování media a následně tak ke změnám v koncentraci jeho složek. Relativní vlhkost atmosféry se udržuje kolem 90 %. Doba kultivace se lišila na základě míry růstu kultivovaných buněk. Medium bylo vyměňováno dvakrát týdně. Kultivované buňky by během kultivace měly adherovat ke dnu kultivační lahve a postupně celé dno porůst. Pokud se tak nedělo, buňky jsem odsála a stočila na centrifuze 5 minut při 300 g, poté jsem buňky vrátila do kultivační lahve a přidala nové medium. Nicméně tato situace byla výjimečná. Založila jsem 20 primokultur, vytvořených přímo z dodaných tkání a také 7 pasáží z primokultury, které vznikly tak, že byla do nové kultivační lahve vstříknuta buněčná suspenze získaná z primokultury a přidáno medium. Použité tkáně byly jak nádorové (od 6 pacientek s nádorem endometria, 3 pacientek s nádorem ovaria, 4 pacientek s nádorem prsu), tak i kontrolní (4). Od 3 pacientek jsem získala vzorek přímo z nádoru a také z nezasazené tkáně. Přibližně po 20 až 30 dnech, v závislosti na růstu buněk, byla provedena trypsinizace. Nejprve jsem odstranila kousky tkání, které jsem na počátku kultivace do lahve vložila a z nichž vyrostla vrstva buněk.

Trypsinizace je metoda, s jejíž pomocí jsem dokázala buňky adherované na dně lahve uvolnit abych s nimi mohla dále pracovat. Po trypsinizaci jsem je využila k izolaci DNA či k tvorbě pasáží. Tato metoda je nazvána podle toho, že k uvolnění buněk se využívá enzymu zvaného trypsin. Trypsin enzymaticky štěpí vazby mezi podkladem a buňkou a také mezi jednotlivými buňkami navzájem. Po získání uvolněných buněk následovalo jejich spočítání, abych zjistila výtěžek z kultivace. Před určováním počtu bylo třeba nejprve kultivované buňky resuspendovat v 1 ml PBS a odebrat 10 µl buněčné suspenze, ke které jsem přidala 90 µl trypanové modři. Trypanová modř difunduje přes plazmatickou membránu do intracelulárního prostoru, nicméně ze živých buněk je transportována zpět do extracelulárního prostoru. Mrtvé buňky se proto obarví plně na modro, ale živé ne. Mohla bych tak určit poměr živých a mrtvých buněk. Počet buněk ve vzorku jsem stanovovala počítáním buněk v Bürkerově komůrce pod světelným mikroskopem. Průměrná výtěžnost kultivace primokultury byla $2,55 \times 10^6$ buněk na 1 mililitr, v rozmezí od $0,37$ do $4,7 \times 10^6$ buněk na 1 mililitr. U jednoho vzorku nedošlo k růstu (karcinom endometria) a u tří vzorků naopak došlo k tak masivnímu porostu dna lahve, že buňky nebylo možné resuspendovat a spočítat. Jednalo se o dva vzorky karcinomu ovaria a jeden

vzorek karcinomu endometria. K vytvoření pasáže se použilo vždy 200 tisíc buněk, které byly přemístěny do nové kultivační lahve a zality médiem. Zbytek vypěstovaných buněk byl resuspendován v 200 µl PBS a byla provedena izolace DNA pomocí QIAamp DSP DNA Blood Mini Kitu (Qiagen, Hilden, Germany) podle instrukcí v protokolu od výrobce. Vzorek DNA byl na konci izolace eluován 60 µl elučního pufru AE a uskladněn v mrazicím boxu při teplotě -20°C po dobu maximálně 5 dnů. Následně byl analyzován pomocí kvantitativní PCR v reálném čase.

6.1.4 Tkáně v parafinových blocích

Abych navýšila počet vzorků, chtěla jsem zařadit do své práce i tkáně prsu zalité do parafínu. Tento postup konzervování tkání je nejběžnější. Nicméně se nám nepodařilo vyextrahovat dostatečné množství DNA z tohoto typu vzorků a proto jsem je nemohla dále analyzovat a zařadit do své práce. DNA vyizolovaná z tohoto typu vzorků je rozštěpená na fragmenty o velikosti menší než 500bp. Detekce fetálních buněk v DNA extrahované z těchto tkání je tak mnohem obtížnější a dochází k podhodnocení frekvence a koncentrace DNA ve vzorku. Tato fragmentace je následně příčinou snížené amplifikace v polymerázové řetězové reakci (Ando *et al.*, 2002). Vzhledem k tomu, jak nízkou koncentraci jsme z tkání získali, jsem byla nucena tyto vzorky nezařadit do mé práce, protože by výsledky nebyly validní.

6.2 Metody

6.2.1 Izolace DNA

Amplifikace *SRY* genu byla provedena na DNA extrahované z nádorových a kontrolních tkání a buněčných kultur. DNA z tkáňových vzorků byla izolována prostřednictvím QIAamp DNA Mini Kitu (Qiagen, Hilden, Germany) podle modifikovaného protokolu výrobce. K rozštěpení proteinů ve vzorku bylo použito 20 µl QIAGEN Proteázy. Odstranění reziduálních solí a proteinů bylo provedeno centrifugačně (2x 1 minutu při 6000 g, poté 3 minuty při 20000 g a 1 minutu při 20000 g). K odstranění nečistot byly použity promývací pufrы AW1 a AW2 (použito vždy 500 µl). DNA byla eluována AE pufrem. Použité množství AE pufru se lišilo u jednotlivých typů vzorků.

Mražené tkáně byly eluovány 60 μ l AE pufru, nativní tkáně nejprve 60 μ l a poté 200 μ l AE pufru. V případě 60 μ l eluce bylo pro amplifikaci paternálních alel použito 15 μ l nebo 47 μ l DNA na jamku a při eluci 200 μ l jsem použila 47 μ l izolované DNA na jamku. DNA z buněčných kultur byla izolována pomocí QIAamp DSP DNA Blood Mini Kitu (Qiagen, Hilden, Germany) rovněž podle protokolu výrobce. Buněčné kultury byly eluovány 60 μ l AE pufru a pro amplifikaci paternálních alel bylo použito 47 μ l extrahované DNA. Koncentrace DNA extrahované z vyšetřovaných tkání byla změřena pomocí spektrofotometru (NanoDrop-1000; Witec AG, Littau, Switzerland).

6.2.2 Kvantitativní PCR v reálném čase

K detekci fetální DNA v izolované celkové DNA, kterou jsem získala ze vzorků tkání a buněčných kultur, jsem použila kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase. Analýza vzorků byla provedena na 7500 real-time PCR systému (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA). Jako fetální marker byl využit gen *SRY*, který se nalézá na Y chromozomu. Detekce β -globinu v DNA vzorcích byla použita ke stanovení celkového množství DNA ve vzorku. Reakční objem se lišil u mražených a nativních vzorků. PCR reakční objem u mražených vzorků eluovaných 60 μ l AE pufru činil 50 μ l na jamku, 15 μ l templátu na jamku pro detekci genu *SRY* (3 jamky) a 5 μ l na jamku pro detekci β -globinu (1 jamka). U vzorků kultivovaných a u části vzorků nativních byl eluční objem rovněž 60 μ l. Gen *SRY* byl v tomto případě detekován v jedné jamce a použito bylo 47 μ l extrahované DNA. Gen *GLO* pak byl detekován v 1 jamce a bylo použito 5 μ l templátu. U většiny nativních vzorků a 11 hluboce zmražených vzorků nádoru ovaria jsem pracovala s 200 μ l DNA a PCR reakční objem byl zvýšen na 100 μ l na jamku, 47 μ l templátu na jamku pro detekci genu *SRY* a 5 μ l na jamku pro detekci β -globinu. Reakční směs použitá v amplifikační reakci obsahovala TaqMan Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA), optimalizované primery (300 nm pro *SRY* a 300 nm pro β -globin), TaqMan sondu (200 nm pro *SRY*, 200 nm pro β -globin) a vodu. Podmínky PCR reakce byly nastaveny podle manuálu výrobce. Prvním krokem je preinkubace trvající 2 minuty při 50°C, potřebná pro aktivaci AmpErase Uracil N-glykosylázy. Následuje desetiminutová preinkubace při 95°C nutná pro aktivaci AmpliTaq Gold DNA polymerázy. Dále 60 cyklů při 95°C 15 sekund, denaturace DNA, anelace a syntéza DNA trvající 1 minutu při 60°C. Každý vzorek DNA byl analyzován

v osmijamkových stripech. Analýza *SRY* byla prováděna v triplikátech u hluboce zmražených a části nativních tkání a v jedné jamce u buněčných kultur a části nativních tkání. Gen pro β -globin byl detekován v jedné jamce na každý vzorek. U vzorků mražených se analýza opakovala v případě pozitivního výsledku na *SRY*. Pozitivní vzorek byl hodnocen jako detekce fluorescenčního signálu v jamce před 45. cyklem ($C_t < 45$) u mražených vzorků a při detekci v jakémkoli cyklu u nativních vzorků. Sekvence primerů použitých v analýze pro gen *SRY* byly následující. Sekvence *SRY* forward primeru, 5'-TGGCGATTAAGTCAAATTCGC- 3', sekvence *SRY* reverse primeru, 5'-CCCCCTAGTACCCTGACAATGTATT- 3'. Sekvence forward primeru β -globinu byla 5'-GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA- 3' a sekvence reverse primeru β -globinu byla 5'-CCTTGATACCAACCTGCCCAG- 3'. Sekvence TaqMan sondy pro gen *SRY* byla 5'-6FAM-AGCAGTAGAGCAGTCAGGGAGGCAGA--TMR- 3' a sekvence TaqMan sondy pro β -globin byla 5'-6FAM-AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG -- TMR- 3'. *SRY* primery jsou po dodání naředěny na 100 μ M roztok, který je následně uskladněn při -20°C. Příprava reakční směsi (o objemu 50 μ l) pro stanovení genu *SRY* a genu *GLO* u mražených vzorků je uvedena v následujících tabulkách č. 4 a č. 5. K reakční směsi pro stanovení genu *SRY* přidáváme 15 μ l DNA a pro stanovení genu *GLO* 5 μ l. Získáme tak celkový objem do reakce 50 μ l.

Tabulka č. 4 Příprava reakční směsi pro stanovení genu *SRY* na 1 jamku u hluboce zmražených vzorků tkání endometria

Příprava reakční směsi pro stanovení <i>SRY</i> genu na 1 jamku	
Sonda (200 nM)	0,5 μ l
Forward primer (300 nM)	0,5 μ l
Reverse primer (300 nM)	0,5 μ l
Voda	8,5 μ l
PCR Master Mix (2x)	25 μ l
Templát	15 μ l
Celkem	50 μ l

Tabulka č. 5 Příprava reakční směsi pro stanovení genu *GLO* na 1 jamku u hluboce zmražených vzorků tkání endometria

Příprava reakční směsi pro stanovení <i>GLO</i> genu na 1 jamku	
Sonda (200 nM)	0,5 µl
Forward primer (300 nM)	0,5 µl
Reverse primer (300 nM)	0,5 µl
Voda	18,5 µl
PCR Master Mix (2x)	25 µl
Templát	5 µl
Celkem	50 µl

PCR reakční směs používaná do analýzy pro nativní vzorky, buněčné kultury a vzorky hluboce zmražené s diagnózou nádoru ovaria měla jiné složení a je proto uvedena zvlášť. Reakční objem na jednu jamku činil 100 µl a příprava reakční směsi pro gen *SRY* a *GLO* je uvedena v tabulkách č. 6 a č. 7.

Tabulka č. 6 Příprava reakční směsi pro stanovení genu *SRY* na 1 jamku u nativních a kultivovaných vzorků tkání endometria, prsu a ovaria a u hluboce zmražených vzorků s diagnózou nádoru ovaria

Příprava reakční směsi pro stanovení <i>SRY</i> genu na 1 jamku	
Sonda (200 nM)	1 µl
Forward primer (300 nM)	1 µl
Reverse primer (300 nM)	1 µl
Voda	0 µl
PCR Master Mix (2x)	50 µl
Templát	47 µl
Celkem	100 µl

Tabulka č. 7 Příprava reakční směsi pro stanovení genu *GLO* na 1 jamku u nativních a kultivovaných vzorků tkání endometria, prsu a ovaria a u hluboce zmražených vzorků s diagnózou nádoru ovaria

Příprava reakční směsi pro stanovení <i>GLO</i> genu na 1 jamku	
Sonda (200 nM)	1 µl
Forward primer (300 nM)	1 µl
Reverse primer (300 nM)	1 µl
Voda	42 µl
PCR Master Mix (2x)	50 µl
Templát	5 µl
Celkem	100 µl

Do jamky pro stanovení genu *SRY* pipetujeme 53 µl připravené reakční směsi a 47 µl analyzované DNA. Do jamky pro stanovení genu *GLO* pipetujeme 95 µl připravené reakční směsi a 5 µl analyzované DNA abychom získali celkový objem 100 µl na jamku. Přítomnost genu *SRY* ve vzorku analyzujeme v triplicátech a gen pro β -globin byl detekován v jedné jamce.

Analýza byla provedena v triplicátech pro gen *SRY* u vzorků hluboce zmražených a u těch nativních tkání, které byly eluovány 200 µl AE pufru. U kultivovaných tkání a nativních tkání eluovaných 60 µl byl gen *SRY* analyzován pouze v jedné jamce. Detekce genu pro β -globin byla u všech vzorků provedena shodně v jedné jamce. U každé analýzy byla přidána negativní a pozitivní kontrola. Negativní kontrola byla provedena pro gen *SRY* i *GLO*, abych se ujistila, že nedošlo ke kontaminaci Master Mixu nebo sterilní vody, kterou používám k ředění primerů při míchání Master Mixu a také je použita místo DNA do jamky negativní kontroly, tzv. NTC. Jako pozitivní kontrola byla použita mužská DNA extrahovaná z plné krve pomocí DSP DNA Blood Mini Kitu (Qiagen) a naředěná vždy čerstvě před analýzou na 10 řádů. Tato kontrola se provádí, abychom se ujistili, že je Master Mix správně namíchan, celý systém funguje jak má a výsledky nejsou falešně negativní. Pokud analýza proběhne správně, každý analyzovaný vzorek by měl být

pozitivní na gen *GLO*, pozitivní či negativní na gen *SRY*, obě negativní kontroly pro gen *SRY* a *GLO* by měly být negativní a pozitivní kontrola pozitivní v očekávaném cyklu.

6.2.3 Kvantifikace a statistická analýza

Při kvantifikaci jsem pracovala s hodnotou zvanou C_T (threshold cycle). C_T se rovná cyklu, ve kterém amplifikační křivka překročí daný fluorescenční práh, nacházející se v exponenciální fázi reakce.

Absolutní kvantifikace přímo determinuje výchozí počet kopií cílových molekul. Tato matematická metoda je založena na zjištění, že existuje lineární vztah mezi logaritmem startovního počtu templátových kopií a C_T příslušné amplifikační křivky. Budeme-li amplifikovat vzorek o neznámé koncentraci společně s diluční sérií standardů o známé koncentraci, získáme kalibrační přímkou. Z této přímkou lze odečíst výchozí koncentrace neznámého vzorku (<http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/>). Absolutní kvantifikace genu *SRY* v extrahované DNA z tkáňových vzorků pacientek i zdravých kontrol byla provedena pomocí analýzy sekvencí genů *SRY* a beta-globinu. Počet kopií genu *SRY* (N) na jamku a na eluci byl vypočítán ze standardní diluční křivky pro gen *SRY*. Stejně tak počet kopií na jamku a na eluci genu pro beta-globin byl vypočítán ze standardní diluční křivky vytvořené pro beta-globinový gen. Počet kopií genu *SRY* a genu *GLO* na jamku byl zjištěn na základě následujících vzorců:

$$N_{SRY} = 10^{((\text{intercept} - C_T \text{ SRY}) / \text{slope})}$$

$$N_{GLO} = 10^{((\text{intercept} - C_T \text{ GLO}) / \text{slope})}$$

Pro zjištění počtu kopií genu *SRY* a genu *GLO* na eluci jsem dále výsledný počet kopií na jamku násobila hodnotou vypočítanou z podílu elučního objemu a množství DNA použité do analýzy na jednu jamku. Tato hodnota byla různá u vzorků hluboce zmražených, nativních tkání a kultur. Hluboce zmražené vzorky byly eluovány 60 μ l AE pufru a použito do analýzy bylo 15 μ l DNA na jamku pro gen *SRY* (celkem 3 jamky) a 5 μ l/jamku pro *GLO*. Počet kopií na izolaci tak byl násoben hodnotou 4 pro gen *SRY* (60/15) a 12 pro gen *GLO* (60/5). Nativní tkáně byly eluovány dvěma různými objemy. Nejprve bylo na kolonku aplikováno 60 μ l AE pufru a poté 200 μ l. Ty vzorky, které byly eluovány objemem 60 μ l se ukázaly jako falešně negativní a proto byl změněn protokol a eluční

objem byl zvýšen na 200 μ l. Počet kopií *SRY* genu na izolaci u vzorků s elučním objemem 60 μ l byl násoben hodnotou 1,276596 (60/47), protože do analýzy bylo použito 47 μ l izolované DNA a detekce probíhala pouze v 1 jamce. Počet kopií genu *GLO* na izolaci pak byl násoben 12 (60/5), bylo použito 5 μ l DNA v jedné jamce. Abych získala počet kopií na eluci u tkání eluovaných objemem 200 μ l, pro gen *SRY* jsem násobila počet kopií *SRY* na jamku hodnotou 4,255319 (200/47). Do jedné jamky pro detekci genu *SRY* jsem použila 47 μ l DNA, celkem byl tento gen amplifikován ve 3 jamkách. Amplifikace genu *GLO* probíhala v jedné jamce a bylo v ní použito 5 μ l DNA, proto jsem počet kopií na izolaci násobila hodnotou 40 (200/5). DNA extrahované z kultivovaných buněk bylo eluováno stejně jako falešně negativní tkáň, 60 μ l a rovněž byl gen *SRY* detekován v jedné jamce. Výpočet byl tedy shodný.

K posouzení vztahu fetálního mikrochimérismu a diagnózy, prognózy, stupně diferenciaci a stadia nádoru byla provedena statistická analýza v programu KyPlot v2.0 beta 15 použitím F-testu, nepárového t-testu a Mann-Whitney U-testu. Pomocí Spearmanova korelačního koeficientu jsem posoudila vztah fetálního mikrochimérismu a věku v době diagnózy, četnosti gravidit a BMI. K tvorbě grafů jsem využila statistický program Statistica 9.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

7. Výsledky

DNA byla izolována z tkání nádorů endometria, prsu a ovaria a také z tkání kontrolních, bez malignizace. Nejprve jsem extrahovala ze všech hluboce zmražených a nativních vzorků DNA pomocí QIAamp DNA Mini Kitu, u kultivovaných vzorků pomocí QIAamp DSP DNA Blood Mini Kitu. Postupovala jsem dle doporučeného protokolu od výrobce. Získanou DNA jsem kvantifikovala PCR v reálném čase. V každé analýze jsem použila primery zacílené na sekvence genu pro beta-globin a *SRY* a fluorescenční sondy pro oba geny. U každého typu vzorku byl v jedné jamce analyzován gen *GLO*, počet jamek pro gen *SRY* se lišil podle typu vzorku a objemu eluce. Do každé analýzy byla zařazena kontrola. Jedna jamka jako pozitivní kontrola pro *SRY*, abych měla jistotu, že reakce proběhla v pořádku a Master Mix byl správně namíchan. Dále jsem provedla také negativní kontrolu pro obě sekvence, abych se ujistila o tom, že nebyly kontaminované Master Mixy. Statisticky zhodnocena a zanesena v grafech je pouze část zpracovaných vzorků, u kterých jsem získala klinická data od patologa.

7.1 Hluboce zmražené tkáně

Nejprve jsem zpracovala 49 hluboce zmražených tkání endometria. 47 pacientek s diagnózou nádoru endometria, a 2 ženy z kontrolní skupiny, bez nádoru endometria. Dvěma pacientkám byl diagnostikován světlobuněčný karcinom, třem karcinosarkom a jedné serózní papilární karcinom, tím byly automaticky zařazeny do skupiny pacientek s horší prognózou. Z těchto vzorků bylo extrahováno 60 μl DNA. Do polymerázové řetězové reakce jsem použila 50 μl DNA, triplikát pro gen *SRY*, každá jamka po 15 μl DNA a 5 μl DNA do jedné jamky pro gen *GLO*. Reakční objem činil 50 μl . Fetální mikrochimérismus byl detekován u 14 pacientek z celkového počtu 47 (29,8%) a u jedné z kontrol. Výtěžek DNA ze vzorků změřený na NanoDropu byl průměrně 996,1 $\text{ng}/\mu\text{l}$, v rozmezí od 33,3 $\text{ng}/\mu\text{l}$ do 2373,9 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Průměrný počet kopií genu *SRY* na deset milionů kopií celkem byl 2,65 (v rozmezí od $1,38 \times 10^{-5}$ do 15,8).

Dále jsem zpracovala hluboce zmražené tkáně od 11 pacientek s karcinomem ovaria. Eluovala jsem 200 μl AE pufru a do analýzy jsem vždy použila celkem 146 μl DNA, 3 jamky pro detekci genu *SRY* a jedna jamka pro detekci genu *GLO*. V každé jamce pro gen

SRY bylo použito 53 μl Master Mixu a 47 μl DNA, v jamce pro gen *GLO* 95 μl Master Mixu a 5 μl DNA. Reakční objem činil 100 μl . Průměrná výtěžnost DNA ze vzorků byla 324,9 ng/ μl (v rozmezí od 103,6 do 562,4 ng/ μl). 7 vzorků z 11 (63,6%) bylo pozitivních na fetální mikrochimérismus. Průměrný počet kopií genu *SRY* na 10 milionů kopií celkem činil 0,03 (v rozmezí $8,79 \times 10^{-5}$ – 0,13).

7.2 Nativní tkáň

Zpracovala jsem nativní tkáň celkem od 65 žen, 35 pacientek a 30 kontrol. Do skupiny pacientek s nádory endometria bylo zařazeno 18 žen, 5 žen do skupiny s nádory prsu, 12 s nádory ovaria, 28 do kontrol pro endometrium a 2 do kontrolní skupiny pro ovarium.

Z 18 pacientek zařazených do skupiny s nádory endometria bylo pozitivních 13, tj. 72,2%. Tyto vzorky byly eluovány 200 μl AE pufru a analyzovány v triplikátech pro gen *SRY* (47 μl DNA na jamku) a jedna jamka pro gen *GLO* (5 μl DNA na jamku). Reakční objem byl 100 μl . Průměrný výtěžek DNA z těchto vzorků byl 373,8 ng/ μl (v rozmezí 134-560,6 ng/ μl). Čistota DNA vyjádřená poměrem absorbancí se pohybovala u poměru 260/280 v rozpětí 1,91- 2,07 a u poměru 260/230 od 2,25 do 2,39. Průměrný počet kopií genu *SRY* na deset milionů kopií celkem byl 1,05 (v rozmezí od $8,24 \times 10^{-5}$ do 12,49). Skupina kontrol zahrnovala vzorky tkání od 28 žen bez maligního nálezu. 18 žen bylo pozitivních na fetální mikrochimérismus, tj. 64,3%. Průměrný výtěžek DNA z těchto tkání byl 333,4 ng/ μl (v rozmezí 165,5-723,2 ng/ μl). Čistota DNA vyjádřená poměrem absorbancí se pohybovala u poměru 260/280 v rozpětí 1,93- 2,01 a u poměru 260/230 od 2,37 do 2,6. Průměrný počet kopií genu *SRY* na deset milionů kopií celkem byl 0,47 (v rozmezí $1,92 \times 10^{-5}$ – 7,4).

Z celkem 5 pacientek s nádorem prsu byly 4 pozitivní na fetální mikrochimérismus (80%). Průměrný výtěžek DNA z tkání prsu byl 213,78 ng/ μl (v rozmezí od 66,2 do 458,7 ng/ μl). Čistota DNA vyjádřená poměrem absorbancí se pohybovala u poměru 260/280 v rozpětí 1,84- 2,01 a u poměru 260/230 od 2,32 do 2,59. Průměrný počet kopií genu *SRY* na 10 milionů kopií celkem u těchto vzorků byl 0,117 (v rozmezí od 0,02 do 0,29).

Zpracovala jsem také nativní vzorky od 12 pacientek s nádorem vaječníků a 2 kontrol, bez maligního nádoru. Jedna pacientka musela být vyřazena z výsledků, vzhledem k tomu, že byla ve skupině falešně negativních vzorků. Falešně negativní vzorky byly eluovány 60 μ l AE pufru a k analýze PCR bylo použito celkem 52 μ l DNA. Gen *SRY* byl detekován pouze v jedné jamce (47 μ l DNA) a gen *GLO* také v jedné (5 μ l DNA). Vzhledem k vysoké negativitě všech vzorků, které byly takto analyzovány, jsme došli k závěru, že tento postup je nevhodný a vzorky jsou falešně negativní. Dále jsem pokračovala v izolaci pomocí stejného kitu, zvýšila jsem eluční objem na 200 μ l a v PCR analýze detekovala gen *SRY* ve třech jamkách. Výsledky těchto analýz byly uspokojivé. Pozitivní na fetální mikrochimérismus bylo 7 pacientek z celkových 11 (63,6%) a jedna kontrola ze 2. Průměrný výtěžek DNA u vzorků eluovaných 200 μ l AE pufru byl u žen s nádory 407,7 ng/ μ l (v rozmezí 143,6- 853,2 ng/ μ l). Čistota DNA vyjádřená poměrem absorbancí se pohybovala u poměru 260/280 v rozpětí 1,94- 1,98 a u poměru 260/230 od 2,19 do 2,47. Průměrný počet kopií genu *SRY* na 10 milionů kopií celkem byl u těchto vzorků 4,1 (v rozmezí od $6,5 \times 10^{-5}$ do 28,67). Výtěžky z kontrolních vzorků byly 178,6 a 219,7 ng/ μ l a poměry absorbancí byly u jednoho vzorku 260/280: 1,92; 260/230: 2,36 a u druhého vzorku 260/280: 1,99; 260/230: 2,55. Pozitivní vzorek obsahoval v průměru 0,01 kopie genu *SRY* na 10 milionů kopií celkem.

Jak bylo výše uvedeno, některé analyzované vzorky tkání byly vyhodnoceny jako falešně negativní. Jednalo se o vzorky tkání endometria, prsu i ovaria. Většina těchto vzorků byla následně znovu analyzována a mohla být zařazena do výsledků. Vzorky, kterých se to týkalo, byly eluovány 60 μ l AE pufru. Výtěžnost DNA byla obvykle velmi vysoká, průměrně 1122,6 ng/ μ l a čistota DNA vyjádřená poměrem absorbancí se pohybovala u poměru 260/280 v rozpětí 1,89- 2,04 a u poměru 260/230 od 2,16 do 2,37. Gen *SRY* byl detekován pouze v jedné jamce, 47 μ l DNA a 53 μ l Master Mixu. Gen *GLO* byl nadále detekován v jedné jamce, 5 μ l DNA a 95 μ l Master Mixu. Celkový reakční objem tak činil 100 μ l na jamku. Celkem bylo takto zpracováno 19 tkání od 15 žen, pouze 2 vzorky byly pozitivní a to ve velmi pozdních cyklech (57,04 a 52,58 z celkových 60 cyklů). Na základě těchto výsledků byly tyto vzorky zhodnoceny jako falešně negativní a dále nebyly zařazeny do statistického vyhodnocení. Negativitu mohla způsobit inhibice PCR zapříčiněná příliš vysokou koncentrací DNA použité k analýze, která činila průměrně 1122,6 ng/ μ l (v rozmezí 428,1- 2203,7). Ke snížení koncentrace izolované DNA jsem

následující vzorky nativních tkání eluovala objemem 200 μ l AE pufru. V analýzách jsem poté detekovala gen *SRY* v triplikátech (47 μ l DNA a 53 μ l Master Mixu) a gen *GLO* v jedné jamce (5 μ l DNA a 95 μ l Master Mixu). Tímto postupem již vzorky byly pozitivní v očekávané frekvenci.

7.3 Buněčné kultury

Buněčné kultury vytvořené z nativních vzorků endometria, prsu a ovaria byly všechny negativní na fetální mikrochimérismus. Celkem jsem zanalyzovala 27 vzorků buněčných kultur kultivovaných z 20 nativních tkání získaných od 17 žen. Tyto vzorky zahrnovaly tkáň odebrané z nádorů endometria (6 pacientek), nádorů ovaria (3 pacientky), nádorů prsu (4 pacientky) a z kontrolních tkání (4 ženy). U tří pacientek byla získána tkáň nejen z nádoru, ale i z přilehlé nezasazené tkáně a proto tato tkáň byla kultivována zvlášť a výsledný počet primokultur byl 20. U 7 vzorků byla založena také pasáž z primokultury. Průměrný výtěžek DNA z kultivovaných buněk činil 203,33 ng/ μ l (v rozmezí od 2 do 887 ng/ μ l). Čistota DNA vyjádřená poměrem absorbancí se pohybovala u poměru 260/280 v rozpětí 1,91- 2,12 a u poměru 260/230 od 0,57 do 2,47.

Rozdíly ve výtěžcích DNA z jednotlivých vzorků jak hluboce zmražených a nativních tkání, tak i kultivovaných buněčných populací byly značné. Mohlo by se zdát, že byly způsobeny především rozdílnou hmotností zpracovávaných vzorků. Nicméně nemyslím si, že by hmotnost byla nejdůležitějším faktorem. Pozorovala jsem, že i tkáně, které se v hmotnosti výrazně lišily, měly téměř stejný výtěžek DNA. Jedná se tedy o to, že každá tkáň obsahuje jiné množství DNA. Jako příklad jsem vytvořila tabulku č. 8 s několika vybranými kontrolními vzorky, eluovanými stejným objemem AE pufru, u kterých je uvedena hmotnost, výtěžek DNA a poměr absorbancí vyjadřující čistotu extrahované DNA. Odlišná výtěžnost u kultivovaných buněk byla způsobena rozdílnou schopností proliferace buněk v kultivovaných tkáních. Vyšší růst kolonie byl pozorován u nádorů v porovnání s kontrolními tkáněmi. Tento výsledek byl očekávaný, vzhledem k tomu, že nádorové buňky jsou schopné neomezeného bujení.

Tabulka č. 8 Závislost hmotnosti vzorku na výtěžnosti DNA u nativních tkání nádorů endometria

Závislost hmotnosti vzorku na výtěžnosti DNA			
Č. vzorku	Hmotnost vzorku (mg)	Výtěžek DNA (ng/μl)	Poměr absorbancí 260/280; 260/230
1.	29,47	246,4	1,96; 2,48
2.	82,26	266,3	1,97; 2,35
3.	10	177,2	1,93; 2,6
4.	14	324,3	1,97; 2,41
5.	11,34	374,2	2,01; 2,46
6.	38,46	355,8	1,94; 2,36

7.4 Statistické zhodnocení výsledků

Statistickou analýzu jsem provedla s pomocí statistického programu KyPlot v2.0 beta 15 a k tvorbě grafů jsem využila program Statistica 9.0. (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Statisticky zhodnocena a zanesena do grafů byla pouze část zpracovaných vzorků, u kterých jsem získala klinická data, a kohorta byla dostatečně velká. Statistickou analýzu jsem tak mohla aplikovat pouze u skupiny pacientek s nádorem endometria a jejich kontrolní skupině. Kohorta pacientek s nádorem endometria po sloučení vzorků hluboce zmražených a nativních zahrnovala 65 pacientek s nádorem endometria a 30 kontrol. Klinická data byla získána od všech pacientek a pouze od 17 kontrol, proto jsem nemohla zařadit všech 30 kontrol do všech statistických testů. Klinická data ke skupině kontrol zahrnovala informace o věku žen v době operace, počet těhotenství, přirozených potratů, počet interrupcí, počet porodů, zda byla podána krevní transfuze a hodnota BMI. U pacientek jsem získala kromě výše vypsáných dat také informaci o typu nádoru, jeho stadiu, diferenciaci, přítomnosti metastáz v uzlinách či jiných místech v těle ženy a zhodnocení nádoru podle FIGO klasifikace.

K posouzení vztahu mezi fetálním mikrochimérismem a diagnózou, prognózou, stupněm diferenciací (grade) a stadiem nádoru (stage) jsem použila nepárový t-test a Mann-Whitney U-test. Pomocí Spearmanova korelačního koeficientu jsem hledala vztah mezi fetálním mikrochimérismem a věkem v době diagnózy, četností gravidit a hodnotou body mass indexu (BMI).

Jako první jsem posuzovala vztah fetálního mikrochimérismu a diagnózy. Statistickou analýzu jsem použila na všech 65 pacientek (47 vzorků hluboce zmražených a 18 nativních) a 30 kontrol (2 vzorky hluboce zmražené a 28 nativních). Posuzovala jsem, zda je fetální mikrochimérismus ve vyšší koncentraci u kontrol než u nádorů celkově, dále zda se liší jeho koncentrace v závislosti na různém typu nádoru endometria. Skupina pacientek byla rozdělena podle diagnózy do 4 podskupin, endometroidní adenokarcinom (57 pacientek), karcinosarkom (4), světlobuněčný karcinom (2) a serózní papilární adenokarcinom (2). Skupina kontrol zahrnovala 30 žen, na fetální mikrochimérismus bylo pozitivních 19, tj. 63,3%. Do kohorty pacientek bylo zařazeno celkem 65 žen, pozitivních bylo 27, tj. 41,54%. Detailněji jsem počet pacientek a kontrol a procento pozitivních žen popsala v tabulce č.9. Průměrný počet kopií genu *SRY* na 10 milionů kopií celkem byl u kontrol 0,44, medián 0,03 (v rozmezí od $4,84 \times 10^{-6}$ do 7,43). Ve skupině pacientek byl průměrný počet kopií genu *SRY* na 10 milionů kopií celkem 1,95 a medián 0,01 (rozmezí od $1,38 \times 10^{-5}$ do 15,8). Podrobnější údaje o průměrném počtu kopií genu *SRY* na 10 milionů buněk celkem jsou uvedeny v tabulce č.10. Z těchto výsledků lze vyvodit, že frekvence výskytu fetálního mikrochimérismu je častější u kontrol ve srovnání s nádory endometria. Tento výsledek nicméně není statisticky signifikantní, můžeme zde vidět pouze jakýsi trend. Koncentrace fetálního mikrochimérismu se významně neliší mezi nádorovými a kontrolními tkáněmi. K posouzení rozdílu v množství fetálního mikrochimérismu u kontrol ve srovnání s pacientkami jsem použila nepárový t-test ($p=0,09$) a Mann-Whitney U-test ($p=0,66$). Rozhodující pro určení statistické pravděpodobnosti pak byl Mann-Whitney U-test který v tomto případě neprokázal významný rozdíl v koncentracích fetálního mikrochimérismu mezi těmito skupinami. Statistická analýza frekvence fetálního mikrochimérismu mezi kontrolní skupinou a skupinou s diagnózou endometroidní adenokarcinom neprokázala statisticky významný rozdíl v koncentraci fetálního mikrochimérismu mezi těmito dvěma skupinami

(Mann-Whitney U-test; $p= 0,96$). Výsledky jsou zobrazeny v tabulce č.11 a v přílohách jsou zobrazeny v grafu č.1 a 2.

Tabulka č. 9 Počet pacientek s nádory endometria a kontrol a jejich pozitivita na fetální mikrochimérismus

Počet pacientek/kontrol a pozitivita FM			
	Počet	FM ⁺	FM ⁺ (%)
Kontroly	30	19	63,3
Endometroidní adenokarcinom	57	21	36,84
Karcinosarkom	4	4	100
Světlobuněčný karcinom	2	1	50
Serózní papilární adenokarcinom	2	1	50
Nádory celkově	65	27	41,54

Tabulka č. 10 Průměrný počet kopií genu *SRY* na 10 milionů buněk celkem ve vzorcích nativních tkání endometria

Průměrný počet kopií genu <i>SRY</i> na 10⁷ buněk celkem			
	Mean FM na 10 ⁷ buněk celkem	Medián FM na 10 ⁷ buněk celkem	Rozpětí FM na 10 ⁷ buněk celkem
Kontroly	0,44	0,03	$4,84 \times 10^{-6}$ - 7,43
Endometroidní adenokarcinom	1,83	0,01	$1,38 \times 10^{-5}$ – 15,8
Karcinosarkom	1,68	0,14	0,02 – 6,44
Nádory celkově	1,95	0,01	$1,38 \times 10^{-5}$ – 15,8

Tabulka č. 11 Vztah fetálního mikrochimérismu mezi pacientkami s nádorem endometria a kontrolami

Vztah FM a diagnózy		
Statistický test	t-test	Mann-Whitney
Celkem nádory x kontroly	0,09	0,66
Endometroidní adenokarcinom x kontroly	0,18	0,96

Posuzovala jsem také vztah mezi fetálním mikrochimérismem a prognózou. Jak jsem uvedla výše, každý nádor je detailně posuzován patologem, je určeno jeho stadium (stage), stupeň diferenciaci (grade), jeho šíření do těla, do přilehlých uzlin (N) a do vzdálenějších orgánů těla (M). Dále je nádor hodnocen i podle FIGO klasifikace. Pacientky byly rozděleny do skupin podle stupně diferenciaci (grade), který je jedním z ukazatelů prognózy. Nádory zařazené do skupiny G1, dobře diferenciované nádory, mají lepší prognózu a patří sem pouze část pacientek s diagnózou endometroidní adenokarcinom. Tumory středně diferencované mají již horší prognózu a patří sem rovněž část pacientek s diagnózou endometroidní adenokarcinom. Do skupiny G3 se řadí všechny karcinosarkomy, světlobuněčné karcinomy, serózní papilární adenokarcinomy a také část pacientek s diagnózou endometroidní adenokarcinom. Nádory hodnocené stupněm diferenciaci 3 jsou málo diferencované, jsou agresivnější a mají špatnou prognózu. Jsou také charakteristické vysokou mortalitou 60-80%. V tabulce č. 12 je uvedeno rozdělení pacientek do skupin podle stupně diferenciaci nádoru a jejich pozitivita na fetální mikrochimérismus. Statistickou analýzu jsem aplikovala pouze na 64 pacientek, u jedné pacientky nebyl stupeň diferenciaci uveden. Nejprve jsem porovnávala frekvenci fetálního mikrochimérismu u kontrol ve srovnání se skupinou G1, G2 a G3 pomocí nepárového t-testu, poté Mann-Whitney U-testu. Výsledky Mann-Whitney U-testu mezi kontrolami a skupinou G1 ($p=0,16$), a G2 ($p=0,75$), a G3 ($p=0,12$) neprokázaly vztah ani v jednom případě. Analyzovala jsem tedy skupiny G1, G2 a G3 mezi sebou abych zjistila, zda není statistický rozdíl v koncentraci fetálního mikrochimérismu mezi nádory s lepší a horší prognózou. Statisticky signifikantní rozdíl byl skutečně nalezen mezi skupinou G1, s dobrou prognózou, a G3, se špatnou prognózou (Mann-Whitney U-test; $p=0,03$).

Statistická analýza mezi skupinami G1 a G2, a G2 a G3 signifikantní rozdíl neprokázala (Mann-Whitney U-test; $p= 0,16$ a $p= 0,25$). Na základě těchto výsledků lze říci, že byl nalezen vztah mezi fetálním mikrochimérismem a stupněm diferenciací nádoru. Vyšší koncentrace fetálního mikrochimérismu se nachází v nádorových tkáních s horší prognózou, zařazených ve skupině G3, v porovnání s prognosticky příznivějšími dobře diferencovanými nádory ve skupině G1. V tabulce č. 13 můžete vidět výsledky statistických analýz a v grafické podobě také v příloze, graf č. 3.

Tabulka č. 12 Stupeň diferenciací (grade) nádoru endometria a pozitivita fetálního mikrochimérismu

Grade nádoru a pozitivita FM						
Grade	Počet	FM ⁺	FM ⁺ %	Mean FM na 10 ⁷ buněk celkem	Medián FM na 10 ⁷ buněk celkem	Rozpětí FM na 10 ⁷ buněk celkem
G1	14	7	50	2,26	0,0008	$1,38 \times 10^{-5} - 15,8$
G2	27	8	29,6	0,84	0,01	$8,88 \times 10^{-5} - 3,12$
G3	23	12	52,2	2,52	0,14	0,0006 – 12,49
Kontroly	30	19	63,3	0,44	0,03	$4,84 \times 10^{-6} - 7,43$

Tabulka č. 13 Vztah mezi fetálním mikrochimérismem a prognózou pacientek s nádory endometria

Vztah mezi FM a prognózou		
	t-test	Mann-Whitney
G1 x kontroly	0,46	0,16
G2 x kontroly	0,57	0,75
G3 x kontroly	0,12	0,12
G1 x G2	0,56	0,16
G1 x G3	0,91	0,03
G2 x G3	0,21	0,25

Hodnotila jsem také vztah mezi fetálním mikrochimérismem a stadiem nádoru, tj. jeho aktuálním rozšířením v době operace (pT). Nádor je klasifikován podle míry postižení zasaženého orgánu, v našem případě endometria. Hodnotí se, zda je ohraničen či se dále šíří do děložního čípku a mimo dělohu. Jsou hodnoceny také metastázy v regionálních mízních uzlinách (N) a vzdálené metastázy (M) v těle ženy. Jak jsem uvedla v kapitole o TNM klasifikaci se zvyšující se hodnotou pT je nádor více rozšířen. Metastázy jsou buď přítomny (N1, M1), nepřítomny (N0, M0) nebo nehodnoceny (NX, MX). V následující tabulce č. 14 jsou shrnuty údaje o počtu pacientek v určitém stadiu a jejich pozitivita na fetální mikrochimérismus. Můžeme vidět, že se procento pacientek pozitivních na mikrochimérismus mírně, ale nevýznamně zvyšuje. Průměrná koncentrace fetální DNA se v podstatě nemění v závislosti na stadiu nádoru. Statistická analýza provedená pomocí nepárového t-testu a Mann-Whitney U-testu také potvrzuje, že není žádný vztah mezi fetálním mikrochimérismem a stadiem nádoru endometria. Shrnutí můžete vidět v tabulce č. 15 a grafu č. 4 v příloze.

Tabulka č. 14 Stadia nádoru endometria u pacientek a fetální mikrochimérismus

Pozitivita FM a stadium nádoru						
Stage	Počet	FM ⁺	FM ⁺ %	Mean FM na 10 ⁷ buněk celkem	Medián FM na 10 ⁷ buněk celkem	Rozpětí FM na 10 ⁷ buněk celkem
pT1	47	18	38,3	2,33	0,009	1,38 × 10 ⁻⁵ – 15,8
pT2	7	3	42,9	1,23	0,48	0,07 – 3,12
pT3	11	6	54,5	1,2	0,11	8,88 × 10 ⁻⁵ – 6,44
N1	7	2	28,6	6,25	6,25	0,01 – 12,49
M1	3	2	66,7	0,1	0,1	0,001 – 0,21
Kontroly	30	19	63,3	0,44	0,03	4,84 × 10 ⁻⁶ - 7,43

Tabulka č. 15 Vztah fetálního mikrochimérismu a stadia nádoru endometria

Vztah FM a stadia nádoru		
Statistika	t-test	Mann-Whitney
pT1 x kontroly	0,13	0,76
pT3 x kontroly	0,41	0,57
pT1 x pT3	0,59	0,95

Statistickou analýzu jsem dále použila k posouzení vztahu fetálního mikrochimérismu a věku u kontrol a pacientek s nádorem endometria. Do této statistické analýzy bohužel bylo zařazeno pouze 17 kontrol, u nichž jsem získala údaje o věku. Průměrný věk všech kontrol byl 46,6 let, medián 44 let. Průměrný věk kontrol pozitivních na fetální mikrochimérismus byl 45,2 let a medián 44 let, průměrný věk negativních kontrol byl 51 let a medián 48,5 let. Průměrný věk všech 65 pacientek byl 65,2 let, medián 64 let. Pacientky pozitivní na fetální mikrochimérismus byly v době diagnózy v průměrném věku 65,2 let a medián byl 64 let. Průměrný věk negativních pacientek byl 65 let, medián 63,5 let. Pomocí Spearmanova korelačního koeficientu jsem posoudila vztah mezi fetálním mikrochimérismem a věkem v době diagnózy u pacientek a v době operace u kontrol. Vztah mezi frekvencí fetálního mikrochimérismu a věkem kontrol všech ($\rho = -0,38$; $p = 0,12$) a pouze pozitivních kontrol ($\rho = -0,25$; $p = 0,38$) nebyl statisticky signifikantní. Závislost mezi fetálním mikrochimérismem a věkem všech pacientek s nádorem endometria ($\rho = 0,07$; $p = 0,58$) a pozitivních pacientek ($\rho = 0,18$; $p = 0,36$) také nebyla nalezena. V tabulce č. 16 jsou znázorněny výsledky statistické analýzy a v příloze je také graf č. 5, znázorňující vztah FM a věku v době diagnózy u pozitivních pacientek s nádory endometria. Na základě těchto výsledků můžeme říct, že není závislost mezi fetálním mikrochimérismem a věkem v době diagnózy.

Tabulka č. 16 Závislost mezi fetálním mikrochimérismem a věkem u kontrol a pacientek s nádory endometria

Vztah mezi FM a věkem u kontrol a pacientek		
Spearmanův korelační koeficient	ρ	P value
Pozitivní kontroly x věk	-0,25	0,38
Kontroly celkem x věk	-0,38	0,12
Pozitivní pacientky x věk	0,18	0,36
Pacientky celkem x věk	0,07	0,58

Zpracované vzorky endometrií byly dále podrobeny analýze vztahu mezi fetálním mikrochimérismem a četností gravidit u 16 kontrol a 63 pacientek, u kterých byl tento údaj zjištěn. V tabulce č. 17 jsou uvedeny počty gravidit u kontrol i pacientek. Závislost mezi fetálním mikrochimérismem a četností gravidit u kontrol celkem ($\rho = -0,02$; $p = 0,93$) a u pozitivních kontrol ($\rho = -0,05$; $p = 0,86$) jsem testovala s použitím Spearmanova korelačního koeficientu. Stejným způsobem jsem statisticky analyzovala také závislost mezi fetálním mikrochimérismem a četností gravidit u všech pacientek s nádorem endometria ($\rho = 0,004$; $p = 0,98$) a u pozitivních pacientek s touto diagnózou ($\rho = -0,19$; $p = 0,34$).

Tabulka č. 17 Vztah FM k četnosti gravidit u pacientek s nádory endometria a kontrol

Četnost gravidity u kontrol a pacientek s nádory endometria								
Četnost gravidity	0	1	2	3	4	5	6	7
Kontroly celkem	3	4	3	2	3	0	1	0
Kontroly FM ⁺	1	4	3	2	2	0	0	0
Pacientky celkem	2	11	26	16	3	3	1	1
Pacientky FM ⁺	2	3	9	8	2	1	0	0

Vidíme, že četnost gravidit nemá na přítomnost fetálního mikrochimérismu vliv, jak jsme si původně mysleli. Očekávaná vyšší frekvence výskytu fetálního mikrochimérismu u žen s větším počtem dětí se nepotvrdila, nicméně to mohlo být zapříčiněno nedostatečným počtem pacientek s více než třemi těhotenstvími. Nezávislost fetálního mikrochimérismu na četnosti gravidit byla potvrzena statistickou analýzou, detailněji zobrazena v tabulce č. 18 a také v grafu č. 6, který se nachází v příloze.

Tabulka č. 18 Závislost mezi fetálním mikrochimérismem a četností gravidit u pacientek s nádory endometria a u kontrol

Závislost mezi FM a četností gravidit		
Spearmanův korelační koeficient	ρ	p value
Kontroly celkem x četnost gravidity	-0,02	0,93
Pozitivní kontroly x četnost gravidity	-0,05	0,86
Pacientky celkem x četnost gravidity	0,004	0,98
Pozitivní pacientky x četnost gravidity	-0,19	0,34

Na závěr jsem testovala vztah mezi fetálním mikrochimérismem a BMI (index tělesné hmotnosti). Tento vztah jsem mohla vyhodnotit pouze v části skupiny pacientek s nádory endometria (36), u kterých bylo BMI známo. Hodnota BMI se vypočítá podle vzorce: $\text{hmotnost v kg} / (\text{výška postavy v m})^2$. Hodnota pod 18,5 je považována za podváhu, 18,5-24,9 je ideální váha, 25- 29,9 nadváha, 30 a více obezita (Garrouste-Orgeas *et al.*, 2004). V tabulce č. 19 jsou uvedeny počty pacientek rozdělené podle kategorií BMI. Vzhledem k vyššímu věku pacientek (mean= 65,6 let; medián= 64 let) byla hodnota BMI nad normou u téměř všech pacientek. K testování vztahu mezi fetálním mikrochimérismem a BMI jsem použila Spearmanův korelační koeficient. Nebyla nalezena závislost mezi fetálním mikrochimérismem a BMI ani mezi pacientkami pozitivními ($\rho = -0,15$; $p = 0,6$) nebo pacientkami celkem ($\rho = -0,08$; $p = 0,64$). V příloze je možno vidět graf závislosti fetálního mikrochimérismu a BMI, graf č. 7.

Tabulka č. 19 Počet pacientek s nádory endometria v kategoriích podle BMI

Kategorie	BMI (kg/m ²)	Počet pacientek	FM pozitivní
Podváha	< 18,5	0	0
Norma	18,5-24,9	1	0
Nadváha	25-29,9	11	5
Obezita	> 30	24	7

Vztah mezi fetálním mikrochimérismem a stadiem nádoru podle FIGO klasifikace nebyl hodnocen, protože patolog hodnotil tyto nádory podle staré klasifikace.

8. Diskuze

Na základě výsledků můžeme říci, že fetální mikrochimérismus je detekován jak v nádorech endometria, prsu a ovaria, tak i v kontrolních tkáních bez malignizace. Frekvence výskytu fetálního mikrochimérismu je častější u kontrol ve srovnání s nádory endometria. Byl nalezen statisticky signifikantní vztah mezi fetálním mikrochimérismem a stupněm diferenciacie nádoru. Vyšší koncentrace fetálního mikrochimérismu se nacházejí v nádorových tkáních s horší prognózou, tj. málo diferencované nádory ve stadiu G3 (endometroidní adenokarcinom ve stadiu G3, karcinosarkomy, světlobuněčné karcinomy a serózní papilární adenokarcinomy), ve srovnání s prognosticky příznivějšími dobře diferencovanými nádory (G1). Vzhledem k tomu, že neexistují žádné studie zabývající se vztahem fetálního mikrochimérismu a nádorů endometria porovnávala jsem své výsledky s podobnými studiemi, které tento vztah hledaly u jiných typů nádorů.

Výsledky mé práce potvrdily přítomnost a dlouhodobé přetrvávání fetálního mikrochimérismu v tkáních endometria, prsu a ovaria. Přítomnost fetálních buněk v tkáních žen byla v minulosti prokázána řadou vědeckých skupin, které mikrochimérismus rovněž detekovaly (Johnson *et al.*, 2001a, 2001b, 2002; Khosrotehrani *et al.*, 2004; Stevens *et al.*, 2004; Guettier *et al.*, 2005; O'Donoghue *et al.*, 2003; Dubernard *et al.*, 2008; Gadi, 2010 a další). Frekvence fetálního mikrochimérismu se ukázala být častější u kontrol (63,3%) ve srovnání s nádory endometria (41,54%), ale průměrný počet kopií genu *SRY* na 10 milionů kopií celkem byl vyšší u nádorů endometria (1,95) v porovnání s kontrolami (0,44). Tyto výsledky nebyly statisticky signifikantní, pouze naznačují určitý trend. Nicméně lze říci, že častější přítomnost fetálního mikrochimérismu u kontrol ve srovnání s tkáněmi z nádorů endometria naznačuje možný protektivní charakter, který by mohl fungovat ve formě imunologického dohledu, podobně jak bylo naznačeno u nádorů prsu (Gadi 2009; Yu *et al.*, 2008). Častější výskyt fetálního mikrochimérismu u kontrol byl shodně nalezen například ve studii Gadi (2010). Gadi vyšetřoval zmražené tkáně prsu na přítomnost fetálního mikrochimérismu pomocí kvantitativní PCR, 19 tkání nádorových a 19 tkání kontrolních. Fetální mikrochimérismus se vyskytoval, stejně jako v mé práci, častěji u kontrolních vzorků (63%) ve srovnání se vzorky nádorů (26%). Nicméně je třeba upozornit na fakt, že se nejednalo o tkáň endometria a navíc byl detekován gen *DYS-14*, ne *SRY*. Opačný názor zastává Dubernard

et al. (2008), který také detekoval fetální buňky ve zkoumaných tkáních prsu zalitých v parafínu. Fetální mikrochimérismus našel v 9 z 10 nádorových tkání a v žádné ze 4 tkání kontrolních. Je však třeba přihlídnout k tomu, že kohorta kontrolních tkání byla velmi malá a navíc, jak se ukázalo v mé práci, koncentrace fetálních buněk v tkáních kontrol je velmi nízká. Dále se jednalo o jiný typ vzorků, které byly analyzovány metodou FISH s pomocí imunofenotypizace a navíc 6 z 10 pacientek podstoupilo před odebráním vzorku neoadjuvantní chemoterapii (Gadi, 2009). Všechny tyto faktory mohly ovlivnit výsledek práce Dubernarda *et al.* (2008). Podobně Srivatsa *et al.* (2001) zkoumal vzorky tkání ze štítné žlázy a prokázal vyšší koncentraci fetálních buněk u pacientek s nádorem štítné žlázy v porovnání s tkání nepostiženou. Jak můžeme vidět, výsledky jednotlivých studií se mezi sebou liší. Má práce přináší další nový pohled na vztah fetálního mikrochimérismu a nádorových onemocnění u žen.

Nenalezla jsem vztah mezi fetálním mikrochimérismem a subtypy a rozsahem nádoru endometria, ani mezi FM a BMI pacientek. Vztah mezi fetálním mikrochimérismem a četností gravidit nebyl nalezen, stejně tak tomu bylo i ve studii Gammill *et al.* (2010), ve které dospěli, ke stejnému závěru při vyšetřování vzorků periferní krve. Nicméně tento vztah nebyl v minulosti zkoumán v souvislosti s nádory endometria. U každé diagnózy se tento výsledek může lišit. Negativní vztah mezi paritou a autoimunitním onemocněním štítné žlázy našli Friedrich *et al.* (2008) i přesto, že Pedersen *et al.* (2006) a Walsh *et al.* (2005) v předešlých studiích žádný vztah neobjevili. Je tedy možné, že s větší kohortou pacientek a kontrol by mohl být nalezen vztah mezi fetálním mikrochimérismem a četností gravidit u pacientek s nádory endometria. Vztah mezi fetálním mikrochimérismem a věkem pacientek v době diagnózy, a kontrol v době operace, jsem také nenalezla. Naopak jsem našla statisticky signifikantní ($p=0,03$) vztah mezi koncentrací fetálního mikrochimérismu v tkáních nádorů endometria a stupněm diferenciací těchto nádorů. Konkrétně se jednalo o fakt, že nádory endometria se špatnou prognózou (endometroidní adenokarcinom ve stadiu G3, všechny karcinosarkomy, světlobuněčné karcinomy a serózní papilární karcinomy) mají signifikantně vyšší koncentrace fetálního mikrochimérismu ve srovnání s nádory s lepší prognózou (endometroidní adenokarcinomy ve stadiu G1). Na základě tohoto výsledku lze říci, že fetální mikrochimérismus má vztah k závažnosti a prognóze nádorů endometria, protože stupeň diferenciací nádoru je spolu s určením rozsahu nádoru jedním z hlavních ukazatelů

závažnosti a určení prognózy daného onemocnění (Sobin *et al.*, 2009). Pacientky s nádory označenými jako „high grade“ (G3 a další uvedené typy rakoviny endometria) mají vyšší riziko relapsu onemocnění a vzniku metastáz (Amant *et al.*, 2005). Vyšší četnost fetálního mikrochimérismu u nádorů s horší prognózou může znamenat buď to, že se fetální buňky podílí na reparaci poškozených tkání nebo to, že podporují angiogenezi a tím i další růst nádoru. Možnou roli fetálních buněk v novotvoření cév u žen s melanomy navrhl Huu *et al.* (2007). Na základě výsledků mé práce nelze rozhodnout, jakou konkrétní roli hrají nalezené mužské fetální buňky v patogenezi nádorů endometria, protože jsem pouze detekovala sekvenci genu *SRY*, ale neurčovala jsem fenotyp buněk. Jediné co mohu říci je, že se v tkáních vyskytovaly mužské buňky. V řadě studií byly nalezeny rozličné typy fetálních mikrochimérických buněk, jak ve tkáních žen, tak i v krevním oběhu. V krevní cirkulaci byly objeveny především buňky hematopoetického původu $CD34^+$ a $CD34^+CD38^+$ (Bianchi *et al.*, 1996). Tyto buňky jsou v krevním oběhu plodu hojně zastoupeny s nejvyšší frekvencí v druhém trimestru (Campagnoli *et al.*, 2000). Na myším modelu byl proveden také výzkum, ve kterém se poukázalo na to, že fetální lymfoidní progenitorové buňky jsou schopné se dále vyvíjet v thymu a kostní dřeni matky do funkčních T- a B-buněk (Khosrotehrani *et al.*, 2008). Nicméně fetální buňky mohou být přítomny v nádorové tkáni ve vyšší koncentraci také proto, že se podílí na reparačních procesech. Cirello *et al.* (2010) detekoval fetální mikrochimérismus v papilárním karcinomu štítné žlázy i u těch pacientek, u nichž nebyl nalezen v krvi. Jeho výsledky podporují hypotézu, že se fetální buňky mohou usidlovat v mateřských nikách, diferencovat se a zapojit se do reparačních procesů.

Negativní výsledky kultivací mohly být způsobeny použitím velmi malých částí tkáně ke kultivaci. Ve studii Cha *et al.* (2003) zkoumal vzorky tkání děložního hrdla u pacientek s nádory děložního hrdla a kontrol. Pracoval se dvěma velikostmi vzorků a větší vzorky byly na fetální mikrochimérismus pozitivní ve všech 4 případech, menší vzorky pak jen ve 2 ze 4. V menších vzorcích se nachází menší množství fetálních buněk a je proto menší pravděpodobnost záchytu fetálního mikrochimérismu.

9. Závěr

Ve své práci jsem potvrdila, že fetální mikrochimérismus se vyskytuje jak v tkáních nádorů endometria, prsu a ovaria, tak i v kontrolních tkáních bez malignizace. Nejvhodnější typ vzorku pro detekci fetálních buněk je tkáň nativní a dále hluboce zmražená. V obou typech tkání jsem detekovala fetální mikrochimérismus. Tkáně zalité v parafínu a buněčné kultury kultivované z nativních tkání se ukázaly pro zkoumání přítomnosti fetálního mikrochimérismu jako nevhodné. Vzorky zalité v parafínu nemohly být k detekci fetálního genomu použity vůbec a všechny buněčné kultury byly na fetální mikrochimérismus negativní. Kultivované buňky byly na gen *SRY* negativní i v případech, kdy nativní tkáň ze které byla kultivace vytvořena byla pozitivní.

Fetální mikrochimérismus se vyskytoval častěji, ale v nižší koncentraci v endometriálních tkáních, které nebyly postiženy nádorovým onemocněním. Nalezla jsem statisticky signifikantní vztah mezi frekvencí fetálního mikrochimérismu a stupněm diferenciací u nádorů endometria. Nádory s horší prognózou (endometroidní adenokarcinom ve stadiu G3, karcinosarkom, světlobuněčný karcinom a serózní papilární adenokarcinom) měly signifikantně vyšší koncentraci fetálních buněk ve srovnání s nádory s lepší prognózou (endometroidní nádory ve stadiu G1). Pokud by se v budoucnu potvrdilo, že pacientky s vyšší koncentrací fetálního mikrochimérismu mají kratší dobu přežití a dochází u nich ve vyšší míře k návratu choroby, mohla by se stát míra FM v nádoru prognostickým údajem. Častější výskyt fetálních buněk v nízké koncentraci v kontrolních tkáních endometria pak může naznačovat možný protektivní charakter. Je možné, že nízká koncentrace buněk plodu v těle matky funguje podobně jako v případě nádorů prsu, u nichž byla vyslovena hypotéza, že mikrochimérické buňky fungují jako imunologický dozor. Nicméně je možné, že s vyšší koncentrací fetálního mikrochimérismu převládá spíše negativní efekt. Jak jsem uvedla ve své práci, do těla matky se dostávají kmenové a progenitorové buňky, které mají schopnost se dále diferencovat v rozmanité buněčné typy s odlišnou funkcí. Pokud se v nádorech usadí, diferencují a proliferyjí fetální buňky schopné angiogeneze, následně podpoří růst nádoru. Ve své práci jsem nezjišťovala fenotyp nalezených buněk, a proto nemohu určit, jaký typ buněk jsem v nádorech endometrií detekovala, ani to jakou konkrétní roli v patogenezi karcinomu endometria hrají.

Literatura

1. Abbud Filho M., Pavarino-Bertelli E.C., Alvarenga M.P.S., Fernandes I.M.M., Toledo R.A., Tajara E.H., Savoldi-Barbosa M., Goldmann G.H., Goloni-Bertollo E.M. (2002) Systemic lupus erythematosus and microchimerism in autoimmunity. *Transplant Proc* 34: 2951–2952.
2. Abushahin N., Fadare O., Liang S.X., Zheng W. (2011) Endometrial Clear Cell Carcinoma: An Update on Recent Concepts. *Pathology Case Reviews* 16(3): 108-114.
3. Adams K.M., Lambert N.C., Heimfeld S., Tylee T.S., Pang J.M., Erickson T.D., Nelson J.L. (2003) Male DNA in female donor apheresis and CD34-enriched products. *Blood* 102: 3845–3847.
4. Akhmedkhanov A., Zeleniuch-Jacquotte A., Toniolo P. (2001) Role of exogenous and endogenous hormones in endometrial cancer. *Annals of the New York Academy of sciences* 943: 296-315.
5. Allen N.E., Key T.J., Dossus L., Rinaldi S., Cust A., Lukanova A., Peeters P.H., Onland-Moret N.C., Lahmann P.H., Berrino F., Panico S., Larrañaga N., Pera G., Tormo M.-J., Sánchez M.-J., Quirós J.R., Ardanaz E., Tjønneland A., Olsen A., Chang-Claude J., Linseisen J., Schulz M., Boeing H., Lundin E., Palli D., Overvad K., Clavel-Chapelon F., Boutron-Ruault M.-C., Bingham S., Khaw K.-T., Bueno-de-Mesquita H.B., Trichopoulou A., Trichopoulos D., Naska A., Tumino R., Riboli E., Kaaks R. (2008) Endogenous sex hormones and endometrial cancer risk in women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Endocr Relat Cancer* 15: 485–97.
6. Amant F., Moerman P., Neven P., Timmerman D., Van Limbergen E., Vergote I. (2005) Endometrial cancer. *Lancet* 366: 491-505.
7. Ando T., Imaizumi M., Graves P.N., Unger P., Davies T.F. (2002) Intrathyroidal fetal microchimerism in Graves` disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(7): 3315-3320.
8. Ando T., Davies T.F. (2004) Self-recognition and the role of fetal microchimerism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18(2): 197–211.
9. Arbyn M., Castellsagué X., de Sanjosé S., Bruni L., Saraiya M., Bray F., Ferlay J. (2011) Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol* (doi: 10.1093/annonc/mdr015)
10. Ariga H., Ohto H., Busch M.P., Imamura S., Watson R., Reed W., Lee T.-H. (2001) Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion* 41(12): 1524-1530.
11. Arnemann J., Jakubiczka S., Thüring S., Schmidtke J. (1991) Cloning and sequence analysis of a human Y-chromosome-derived, testicular cDNA, TSPY. *Genomics* 11: 108-114.

12. Artlett C.M. (2005) Pathophysiology of fetal microchimeric cells. *Clin Chim Acta* 360(1–2): 1–8.
13. Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., Ghissassi F.E., Bouvard V., Altieri A., Cogliano V. (2007) Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncology* 8(4): 292-293.
14. Bayes-Genis A., Bellosillo B., de La Calle O., Salido M., Roura S., Ristol F.S., Soler C., Martinez M., Espinet B., Serrano S., Bayes de Luna A., Cinca J. (2005) Identification of male cardiomyocytes of extracardiac origin in the hearts of women with male progeny: male fetal cell microchimerism of the heart. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 24(12): 2179–2183.
15. Bianchi D.W. (2000) Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell microchimerism. *European J of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 92: 103-108.
16. Bianchi D.W., Fraina A., Weber W., Delli-Bovi L.C., DeRiso M., Williams J.M., Klinger K.W. (2001) Significant fetal-maternal hemorrhage after terminativ of pregnancy: Implications for development of fetal cell microchimerism. *Am J Obstet Gynecol* 184: 703-706.
17. Bianchi D.W., Shuber A.P., DeMaria M.A., Fougner A.C., Klinger K.W. (1994) Fetal cells in the maternal blood:determination of purity and yield by quantitative PCR. *Am J Obstet Gynecol* 171: 922-926.
18. Bianchi D.W., Williams J.M., Sullivan L.M., Hanson F.W., Klinger K.W., Shuber A.P. (1997) PCR quantification of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 61: 822-829.
19. Bianchi D.W., Zickwolf G.K., Weil G.J., Sylvester S., DeMaria M.A. (1996) Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years post partum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 705-708.
20. Bonney E.A., Matzinger P. (1997) The maternal immune system`s interaction with circulating fetal cells. *The Journal of Immunology* 158(1): 40-47.
21. Booth M., Beral V., Smith P. (1989) Risk factors for ovarian cancer: a case-control study. *British Journal of Cancer* 60(4): 592-598.
22. Burton G.J., Jauniaux E., Watson A.L. (1999) Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: The Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol* 181: 718–24.
23. Calle E.E., Rodriguez C., Walker-Thurmond K., Thun M.J. (2003) Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. *N Engl J Med* 348: 1625-1638.
24. Campagnoli C., Fisk N.M., Bennett P.R., Overton T.G., Roberts I.A.G. (2000) Circulating multipotent haematopoietic progenitors in first trimester fetal blood. *Blood* 95: 1967-1972.

25. Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S., Bennett P.R., Bellantuono I., Fisk N.M. (2001) Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98 (8): 2396-2402.
26. Cha D., Khosrotehrani K., Kim Y., Stroh H., Bianchi D.W., Johnson K.L. (2003) Cervical cancer and microchimerism. *Obstet Gynecol* 102: 774–81.
27. Ciaranfi A., Curchod A., Odartchenko N. (1977) Postpartum survival of fetal lymphocytes in the maternal blood. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 107: 134–138.
28. Cirello V., Perrino M., Colombo C., Muzza M., Filopanti M., Vicentini L., Beck-Peccoz P., Fugazzola L. (2010) Fetal cell microchimerism in papillary thyroid cancer: studies in peripheral blood and tissues. *Int J Cancer* 126: 2874-2878.
29. Cirello V., Recalcati M.P., Muzza M., Rossi S., Perrino M., Vicentini L., Beck-Peccoz P., Finelli P., Fugazzola L. (2008) Fetal Cell Microchimerism in Papillary Thyroid Cancer: A Possible Role in Tumor Damage and Tissue Repair. *Cancer Res* 68: 8482-8488.
30. Colombo N., Van Gorp T., Parma G., Amant F., Gatta G., Sessa C., Vergote I. (2006) Ovarian cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 60(2): 159-179.
31. Cooper G.S., Stroehla B.C. (2003) The epidemiology of autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews* 2: 119–125.
32. Domen J., Weissman I.L. (1999) Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mole Med Today* 5: 201–208.
33. Dubernard G., Aractingi S., Oster M., Rouzier R., Mathieu M.C., Uzan S., Khosrotehrani K. (2008) Breast cancer stroma frequently recruits fetal derived cells during pregnancy. *Breast Cancer Res.* 10: R14 (doi:10.1186/bcr1860)
34. Elias S., Price J., Dockter M., Wachtel S., Tharapel A., Simpson J.L., Klinger K.W. (1992) First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. *Lancet* 340(8826): 1033.
35. Elston C.W., Ellis I.O. (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow up. *Histopathology* 19: 403-410.
36. Endo Y., Negishi I., Ishikawa O. (2002) Possible contribution of microchimerism to the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Rheumatology* 41: 490–495.
37. Enger S.M., Ross R.K., Henderson B., Bernstein L. (1997) Breastfeeding history, pregnancy experience and risk of breast cancer. *British Journal of Cancer* 76(1): 118-123.
38. Evans P.C., Lambert N., Maloney S., Furst D.E., Moore J.M., Nelson J.L. (1999) Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood* 93: 2033-2037.
39. Friedrich N., Schwarz S., Thonack J., John U., Wallaschofski H., Völzke H. (2008) Association between parity and autoimmune thyroiditis in a general female population. *Autoimmunity* 41(2): 174-180.

40. Fujiki Y., Johnson K., Peter I., Tighiouart H., Bianchi D.W. (2009) Fetal cells in the pregnant mouse are diverse and express a variety of progenitor and differentiated cell markers. *Biol Reprod* 81: 26-32.
41. Gadi V., Nelson J.L. (2007) Fetal microchimerism in women with breast cancer. *Cancer Res* 67: 9035-9038.
42. Gadi V.K. (2009) Fetal microchimerism and cancer. *Cancer Letters* 276: 8-13.
43. Gadi V.K. (2010) Fetal microchimerism in breast from women with and without breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 121: 241-244.
44. Gadi V.K., Malone K.E., Guthrie K.A., Porter P.L., Nelson J.L. (2008) Case-control study of fetal microchimerism and breast cancer. *PLoS ONE* 3(3): e1706. doi:10.1371/journal.pone.0001706
45. Gammill H.S., Guthrie K.A., Aydelotte T.M., Adams Waldorf K.M., Nelson J.L. (2010) Effect of parity on fetal and maternal microchimerism: interaction of grafts within a host? *Blood* 116(15): 2706-2712.
46. Ganz P.A. (2005) Breast cancer, menopause, and long-term survivorship: critical issues for the 21st century. *Am J Med* 118: 136-141.
47. Garrouste-Orgeas M., Troché G., Azoulay E., Caubel A., de Lassence A., Cheval C., Montesino L., Thuong M., Vincet F., Cohen Y., Timsit J.-F. (2004) Body Mass Index: An additional prognostic factor in ICU patients. *Intensive Care Med* 30: 437-443.
48. Gilmore G.L., Haq B., Shaddock R.K., Jasthy S.L., Lister J. (2008) Fetal-maternal microchimerism in normal parous females and parous female cancer patients. *Exp Hematol* 36: 1073-1077.
49. Grice J., Ek M., Greer B., Koh W.-J., Muntz H.G., Cain J., Tamimi H., Stelzer K., Figg D., Goff B.A. (1998) Uterine Papillary Serous Carcinoma: Evaluation of Long-Term Survival in Surgically Staged Patients. *Gynecologic Oncology* 69: 69–73.
50. Guettier C., Sebah M., Buard J., Feneux D., Ortin-Serrano M., Gigou M., Tricottet V., Reynès M., Samuel D., Féray C. (2005) Male cell microchimerism in normal and diseased female livers from fetal life to adulthood. *Hepatology* 42: 35–43.
51. Guillot P.V., Abass O., Bassett J.H., Shefelbine S.J., Bou-Gharios G., Chan J., Kurata H., Williams G.R., Polak J., Fisk N.M. (2008a) Intrauterine transplantation of human fetal mesenchymal stem cells from first-trimester blood repairs bone and reduces fractures in osteogenesis imperfecta mice. *Blood* 111: 1717–1725.
52. Gussin H.A., Bischoff F.Z., Hoffman R., Elias S. (2002) Endothelial precursor cells in the peripheral blood of pregnant women. *J Soc Gynecol Invest* 9(6): 357-361.
53. Hamada H., Arinami T., Kubo T., Hamaguchi H., Iwasaki H. (1993) Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Human Genetics* 91(5): 427-432.

54. Hartge P., Schiffman M.H., Hoover R., McGowan L., Leshner L., Norris H.J. (1989) A case-control study of epithelial ovarian cancer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 161(1): 10-16.
55. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-994.
56. Hendrickson M., Ross J., Eifel P., Martinez A., Kempson R. (1982) Uterine papillary serous carcinoma: a highly malignant form of endometrial adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 6: 93-108.
57. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10(4): 413-417.
58. Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS* 88(16): 7276-7280.
59. Holzgreve W., Ghezzi E., DiNaro E., Ganshirt D., Maymon E., Hahn S. (1998) Fetomaternal cell traffic is disturbed in pre-eclampsia. *Obstet Gynecol* 91: 669-72.
60. Horowitz M.M., Gale R.P., Sondel P.M., Goldman J.M., Kersey J., Kolb H.J., Rimm A.A., Ringden O., Rozman C., Speck B. (1990) Graft-versus leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75(3): 555-562.
61. Hromadnikova I., Zlacka D., Nguyen T.T.H., Sedlackova L., Zejskova L., Sosna A. (2008) Fetal cells of mesenchymal origin in cultures derived from synovial tissue and skin of patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 75: 563-566
62. Hromadnikova I., Benesova M., Zejskova L., Stehnova J., Doucha J., Sedlacek P., Dlouha K., Krofta L. (2009) The Effect of *DYS-14* Copy Number Variations on Extracellular Fetal DNA Quantification in Maternal Circulation. *DNA and Cell Biol* 28(7): 351-358.
63. Hulka B.S., Moorman P.G. (2001) Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* 38(1): 103-113.
64. Huu S.N., Dubernard G., Aractingi S., Khosrotehrani K. (2006) Feto-maternal cell trafficking: A transfer of pregnancy associated progenitor cells. *Stem Cell Reviews and Reports* 2(2): 111-116.
65. Huu S.N., Oster M., Uzan S., Chareyre F., Aractingi S., Khosrotehrani K. (2007) Maternal neoangiogenesis during pregnancy partly derives from fetal endothelial progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1871-1876.
66. Huu S.N., Oster M., Avril M.-F., Boitier F., Mortier L., Richard M.-A., Kerob D., Maubec E., Souteyrand P., Moguelet P., Khosrotehrani K., Aractingi S. (2009) Fetal microchimeric cells participate in tumour angiogenesis in melanomas occurring during pregnancy. *Am J Pathol* 174: 630-637.
67. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69-90.

68. Johnson K.L., Bianchi D.W. (2004) Fetal cells in maternal tissue following pregnancy: what are the consequences? *Hum Reprod Update* 10(6): 497-502.
69. Johnson K.L., McAlindon T.E., Mulcahy E., Bianchi D.W. (2001a) Microchimerism in a female patient with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 44(9): 2107–2111.
70. Johnson K.L., Nelson J.L., Furst D.E., McSweeney P.A., Roberts D.J., Zhen D.-K., Bianchi D.W. (2001b) Fetal cell microchimerism in tissue from multiple sites in women with systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism* 44(8): 1848-1854.
71. Johnson K.L., Samura O., Nelson J.L., McDonnell W.M., Bianchi D.W. (2002) Significant fetal cell microchimerism in a nontransfused woman with hepatitis C: evidence of long-term survival and expansion. *Hepatology* 36: 1295–1297.
72. Johnson K.L., Tao K., Stroh H., Kallenbach L., Peter I., Richey L., Rust D., Bianchi D.W. (2010) Increased fetal cell trafficking in murine lung following complete pregnancy loss from exposure to lipopolysaccharide. *Fertil Steril* 93: 1718–1721.e2.
73. Jonson A.L., Bliss R.L., Truskinovski A., Judson P., Argenta P., Carson L., Dusenbery K., Downs L.S. (2006) Clinical features and outcomes of uterine and ovarian carcinosarcoma. *Gynecologic Oncology* 100(3): 561-564.
74. Kaaks R., Lukanova A., Kurzer M.S. (2002) Obesity, Endogenous Hormones, and Endometrial Cancer Risk: A Synthetic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 1531.
75. Kallenbach L.R., Johnson K.L., Bianchi D.W. (2011) Fetal Cell Microchimerism and Cancer: A Nexus of Reproduction, Immunology, and Tumor Biology. *Cancer Res* 71; 8.
76. Key T.J., Verkasalo P.K., Banks E. (2001) Epidemiology of breast cancer. *The Lancet Oncology* 2(3): 133-140.
77. Key J., Hodgson S., Omar R.Z., Jensen T.K., Thompson S.G., Roobis A.R., Davies D.S., Elliott P. (2006) Meta-analysis of studies of alcohol and breast cancer with consideration of the methodological issues. *Cancer Causes Control* 17: 759-770.
78. Khosrotehrani K., Johnson K.L., Lau J., Dupuy A., Cha D.H., Bianchi D.W. (2003) The influence of fetal loss on the presence of fetal cell microchimerism. *Arthritis and Rheumatism* 48(11): 3237-3241.
79. Khosrotehrani K., Johnson K.L., Cha D.H., Salomon R.N., Bianchi D.W. (2004) Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue. *JAMA* 292: 75–80.
80. Khosrotehrani K., Johnson K.L., Guégan S., Stroh H., Bianchi D.W. (2005) Natural history of fetal cell microchimerism during and following murine pregnancy. *J Reprod Immunol* 66: 1-12.
81. Khosrotehrani K., Leduc M., Bachy V., Huu S.N., Oster M., Abbas A., Uzan S., Aractingi S. (2008) Pregnancy allows the transfer and differentiation of fetal lymphoid progenitors into functional T and B cells in mothers. *J Immunol* 180: 889–897.

82. Klonisch T., Drouin R. (2009) Fetal–maternal exchange of multipotent stem/progenitor cells: microchimerism in diagnosis and disease. *Trends Mol Med* 15: 510–518.
83. Krabchi K., Gros-Louis F., Yan J., Bronsard M., Massé J., Forest J.-C., Drouin R. (2001) Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clin Genet.* 60: 145-150.
84. Kremer Hovinga I.C.L., Koopmans M., Baelde H.J., de Heer E., Bruijn J.A., Bajema I.M. (2007) Tissue chimerism in systemic lupus erythematosus is related to injury. *Ann Rheum Dis* 66: 1568–1573.
85. Kuhl C.K., Schrading S., Leutner C.C., Morakkabati-Spitz N., Wardelmann E., Fimmers R., Kuhn W., Schild H.H. (2005) *Journal of Clinical Oncology* 23(33): 8469-8476.
86. Kuroki M., Okayama A., Nakamura S., Sasaki T., Murai K., Shiba R., Shinohara M., Tsubouchi H. (2002) Detection of maternal–fetal microchimerism in the inflammatory lesions of patients with Sjögren’s syndrome. *Ann Rheum Dis* 61: 1041–1046.
87. Kvåle G., Heuch I. (1987) Lactation and cancer risk: is there a relation specific to breast cancer? *Journal of Epidemiology and Community Health* 42: 30- 37.
88. Kvåle G., Heuch I., Nilssen S., Beral V. (1988) Reproductive factors and risk of ovarian cancer: A prospective study. *International Journal of Cancer* 42(2): 246-251.
89. Lambert N.C., Evans P.C., Hashizumi T.L., Maloney S., Gooley T., Furst D.E., Nelson J.L. (2000) Cutting edge: Persistent fetal microchimerism in T lymphocytes is associated with HLA-DQA1*0501: Implications in autoimmunity. *The Journal of Immunology* 164(11): 5545-5548.
90. Lambert N.C., Lo Y.M., Erickson T.D., Tylee T.S., Guthrie K.A., Furst D.E., Nelson J.L. (2002) Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulating DNA? A quantitative answer. *Blood.* 100(8): 2845-2851.
91. Lee E.S.M., Bou-Gharios G., Seppanen E., Khosrotehrani K., Fisk N.M. (2010) Fetal stem cell microchimerism: natural-born healers or killers? *Mol Hum Rep* 16(11): 869-878.
92. Liégeois A., Escourrou J., Ouvré E., Charreire J. (1977) Microchimerism: a stable state of low-ratio proliferation of allogeneic bone marrow. *Transplantation Proceedings* 9(1): 273-276.
93. Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4(6): 357–362.
94. Lo Y.M.D., Lau T.K., Chan L.Y.S., Leung T.N., Chang A.M.Z. (2000) Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem* 46: 1301-1309.
95. Lo Y.M., Tein M.S., Lau T.K., Haines C.J., Leung T.N., Poon P.M., Wainscoat J.S., Johnson P.J., Chang A.M.Z., Hjelm N.M. (1998) Quantitative analysis of fetal DNA in

maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 62(4): 768-75.

96. Lo Y.M., Leung T.N., Tein M.S., Sargent I.L., Zhang J., Lau T.K., Haines C.J., Redman C.W. (1999a) Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 45: 184-188.

97. Lo Y.M.D., Lau T.K., Zhang J., Leung T.N., Chang A.M.Z., Hjelm N.M., Elmes R.S., Bianchi D.W. (1999b) Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clinical Chemistry* 45(10): 1747-1751.

98. Lo Y.M., Zhang J., Leung T.N., Lau T.K., Chang A.M., Hjelm N.M. (1999c) Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma. *Am J Hum Genet* 64: 218-24.

99. Lukanova A., Kaaks R. (2005) Endogenous Hormones and Ovarian Cancer: Epidemiology and Current Hypotheses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 98- 107.

100. Lynch H.T., Watson P., Lynch J.F., Conway T.A., Fili M. (1993) Hereditary ovarian cancer: Heterogeneity in age at onset. *Cancer* 71(2): 573-581.

101. Marshall C.J., Thrasher A.J. (2001) The embryonic origins of human haematopoiesis. *Br J Haematol* 112: 838-50.

102. Michels K.B., Willett W.C., Rosner B.A., Manson J.E., Hunter D.J., Colditz G.A., Hankinson S.E., Speizer F.E. (1996) Prospective assessment of breastfeeding and breast cancer incidence among 89,887 women. *The Lancet* 347: 431-436.

103. Mikhail M.A., M'Hamdi H., Welsh J., Levicar N., Marley S.B., Nicholls J.P., Habib N.A., Louis L.S., Fisk N.M., Gordon M.Y. (2008) High frequency of fetal cells within a primitive stem cell population in maternal blood. *Hum Reprod* 23: 928-933.

104. Mullis K.B., Faloona F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.

105. Nelson J.L. (1996) Maternal-fetal immunology and autoimmune disease. *Arthritis and Rheum* 39(2): 191-194.

106. Nelson J.L. (2001) HLA relationships of pregnancy, microchimerism and autoimmune disease. *J Reprod Immunol* 52: 77-84.

107. Nelson J.L. (2009) Naturally acquired microchimerism: for better or for worse. *Arthritis Rheum* 60: 5-7.

108. Nelson J.L., Furst D.E., Maloney S., Gooley T., Evans P.C., Smith A., Bean M.A., Ober C., Bianchi D.W. (1998) Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *The Lancet* 351: 559-562.

109. Nelson J.L., Hughes K.A., Smith A.G., Nisperos B.B., Branchaud A.M., Hansen J.A. (1993) Maternal-Fetal Disparity in HLA Class II Alloantigens and the Pregnancy-Induced Amelioration of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 329: 466-471.

110. O'Donoghue K. (2006) Implication of fetal stem cell trafficking in pregnancy. *Reviews in Gynaecological and Perinatal Practise* 6: 87-98.

111. O'Donoghue K., Choolani M., Chan J., de la Fuente J., Kumar S., Campagnoli C., Bennett P.R., Roberts I.A.G., Fisk N.M. (2003) Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Hum Reprod* 9: 497–502.
112. O'Donoghue K., Chan J., de la Fuente J., Kennea N., Sandison A., Anderson J.R., Roberts I.A.G., Fisk N.M. (2004) Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy. *Lancet* 364: 179–182.
113. O'Donoghue K., Sultan H.A., Al-Allaf F.A., Anderson J.R., Wyatt-Ashmead J., Fisk N.M. (2008) Microchimeric fetal cells cluster at sites of tissue injury in lung decades after pregnancy. *Reprod Biomed* 16(3): 382–390.
114. Oliva E., Soslow R.A. (2011) High-Grade Endometrial Carcinomas. *Surgical Pathology Clinics* 4(1): 199-241
115. Osborne C.K. (1998) Tamoxifen in the Treatment of Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine* 339: 1609-1618.
116. Parkin D.M., Pisani P., Ferlay J. (1999) *GLOBAL* cancer statistics. *CA Cancer* 49: 33-64.
117. Parant O., Dubernard G., Challier J.-C., Oster M., Uzan S., Aractingi S., Khosrotehrani K. (2009) CD34+ cells in maternal placental blood are mainly fetal in origin and express endothelial markers. *Lab Invest* 89: 915–923.
118. Pedersen I.B., Laurberg P., Knudsen N., Jorgensen T., Perrild H., Ovesen L., Rasmussen L.B. (2006) Lack of association between thyroid autoantibodies and parity in a population study argues against microchimerism as a trigger of thyroid autoimmunity. *Eur J Endocrinol* 154: 39–45.
119. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
120. Potischman N., Hoover R.N., Brinton L.A., Siiteri P., Dorgan J.F., Swanson C.A., Berman M.L., Mortel R., Twiggs L.B., Barrett R.J., Wilbanks G.D., Persky V., Lurain J.R. (1996) Case-Control Study of Endogenous Steroid Hormones and Endometrial Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 88(16): 1127-1135.
121. Reeves G.K., Pirie K., Beral V., Green J., Spencer E., Bull D. (2007) Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ* 335: 1134-1139.
122. Renne C., Ramos Lopez E., Steimle-Grauer S.A., Ziolkowski P., Pani M.A., Luther C., Holzer K., Encke A., Wahl R.A., Bechstein W.O., Usadel K.H., Hansmann M., Badenhoop K. (2004) Thyroid fetal male microchimerisms in mothers with thyroid disorders: presence of y-chromosomal immunofluorescence in thyroid-infiltrating lymphocytes is more prevalent in hashimoto's thyroiditis and graves' disease than in follicular adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5810–5814.
123. Risch H.A., Marrett L.D., Howe G.R. (1994) Parity, Contraception, Infertility, and the Risk of Epithelial Ovarian Cancer. *American Journal of Epidemiology* 140(7): 585- 597.

124. Rose N.R., Bona C. (1993) Defining criteria for autoimmune diseases. *Immunol Today* 14: 426-430.
125. Rosenberg L., Palmer J.R., Zauber A.G., Warshauer M.E., Lewis Jr. J.L., Strom B.L., Harlap S., Shapiro S. (1994) A Case-Control Study of Oral Contraceptive Use and Invasive Epithelial Ovarian Cancer. *American Journal of Epidemiology* 139(7): 654-661.
126. Santos M.A., O'Donoghue K., Wyatt-Ashmead J., Fisk N.M. (2008) Fetal cell in the maternal appendix: a marker of inflammation or fetal tissue repair? *Hum Reprod* 23: 2319-2325.
127. Saunders NA (2004) Quantitative real time PCR. In: Edwards K, Logan J, Saunders N (eds), *Real-Time PCR: An Essential Guide*, Horizon Bioscience, Hethersett, Norwich, UK: 103-123.
128. Sawaya H.H.B., Jimenez S.A., Artlett C.M. (2004) Quantification of fetal microchimeric cells in clinically affected and unaffected skin of patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* 43: 965-968.
129. Schiffman M., Castle P.E., Jeronimo J., Rodriguez A.C., Wacholde S. (2007) Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370: 890-907.
130. Schröder J., Tiilikainen A., de la Chapelle A. (1974) Fetal leukocytes in maternal circulation after delivery. *Transplantation* 17: 346-360.
131. Sekizawa A., Jimbo M., Saito H., Iwasaki M., Matsuoka R., Okai T., Farina A. (2003) Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 188: 480-484.
132. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. (2012) Cancer statistics, 2012. *A Cancer Journal for Clinicians* 62(1): 10-29.
133. Smid M., Vassallo A., Lagona F., Valsecchi L., Maniscalco L., Danti L., Lojacono A., Ferrari A., Ferari M., Cremonesi L. (2001) Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma in pathological conditions associated with placental abnormalities. *Ann N Y Acad Sci* 945: 132-137.
134. Snider J.V., Wechser M.A., Lossos I.S. (2001) Human disease characterization: real-time quantitative PCR analysis of gene expression. *DDT* 6(20): 1062-1067.
135. Sohda S., Arinami T., Hamada H., Nakauchi H., Hamaguchi H., Kubo T. (1997) The proportion of fetal nucleated red blood cells in maternal blood: estimation by FACS analysis. *Prenat Diagn* 17: 743-752.
136. Srivatsa B., Srivatsa S., Johnson K.L., Samura O., Lee S.L., Bianchi D.W. (2001) Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case-control study. *Lancet* 358: 2034-2038.
137. Stevens A.M., McDonnell W.M., Mullarkey M.E., Pang J.M., Leisenring W., Nelson J.L. (2004) Liver biopsies from human females contain male hepatocytes in the absence of transplantation. *Lab Invest* 84: 1603-1609.

138. Stevens A.M. (2006) Microchimeric cells in systemic lupus erythematosus: targets or innocent bystanders? *Lupus* 15: 820-826.
139. Studničková M., Ľubušký M., Ordeltová M., Procházka M. (2010) Možnosti stanovení fetomaternální hemoragie. *Česká gynekologie* 75(5): 443-446.
140. Stuebe A.M., Willett W.C., Xue F., Michels K.B. (2009) Lactation and Incidence of Premenopausal Breast Cancer, A Longitudinal Study. *Arch Intern Med* 169(15): 1364-1371.
141. Sunami R., Komuro M., Yuminamochi T., Hoshi K., Hirata S. (2010) Fetal cell microchimerism develops through the migration of fetus-derived cells to the maternal organs early after implantation. *J Reprod Immunol* 84: 117–123.
142. Tan X.-W., Liao H., Sun L., Okabe M., Xiao Z.-C., Dawe G.S. (2005) Fetal microchimerism in the maternal mouse brain: a novel population of fetal progenitor or stem cells able to cross the blood-brain barrier? *Stem Cells* 23: 1443–1452.
143. Thomas M.R., Williamson R., Craft I., Yazdani N., Rodeck C.H. (1994) Y chromosome sequence DNA amplified from peripheral blood of women in early pregnancy. *Lancet* 343: 413-414.
144. Toda I., Kuwana M., Tsubota K., Kawakami Y. (2001) Lack of evidence for an increased microchimerism in the circulation of patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 60: 248–253.
145. Traggiari E., Chicha L., Mazzucchelli L., Bronz L., Piffaretti J.-C., Lanzavecchia A., Manz M.G. (2004) Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 304: 104–107.
146. Van Gorp T., Neven P. (2002) Endometrial safety of hormone replacement therapy: review of literature. *Maturitas* 42(2): 93-104.
147. Vogel T., Schmidtke J. (1998) Structure and function of TSPY, the Y-chromosome gene coding for the "testis-specific protein". *Cytogenet Cell Genet* 80: 209-213.
148. Vogt P.H., Affara N., Davey P., Hammer M., Jobling M.A., Lau Y.F., Mitchell M., Schempp W., Tyler-Smith C., Williams G., Yen P., Rappold G.A. (1997) Report of the Third International Workshop on Y Chromosome Mapping 1997. Heidelberg, Germany, April 13–16, 1997. *Cytogenet Cell Genet* 79(1-2): 1–20.
149. de Waard F., Baanders-van Halewijn E.A. (1974) A prospective study in general practice on breast-cancer risk in postmenopausal women. *Int J Cancer* 14: 153–160.
150. Walknowska J., Conte F.A., Grumbach M.M. (1969) Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 293: 1119–1122.
151. Walsh J.P., Bremner A.P., Bulsara M.K., O'Leary P., Leedman P.J., Feddema P., Michelangeli V. (2005) Parity and the Risk of Autoimmune Thyroid Disease: A Community-Based Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(9): 5309-5312.

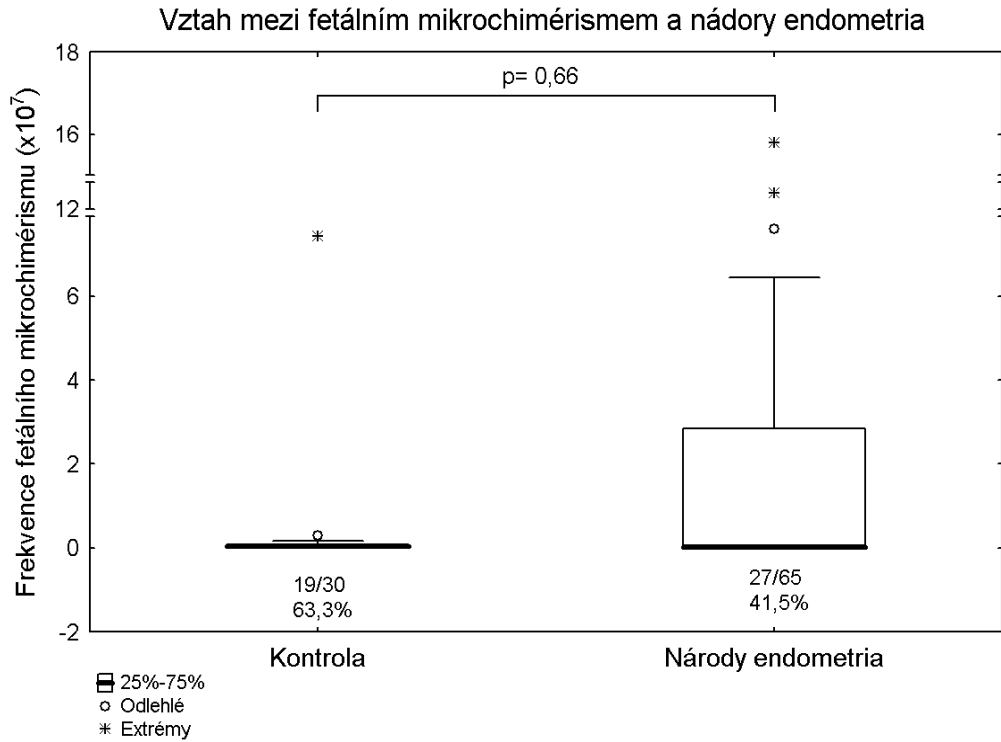
152. Wang Y., Iwatani H., Ito T., Horimoto N., Yamato M., Matsui I., Imai E., Hori M. (2004) Fetal cells in mother rats contribute to the remodeling of liver and kidney after injury. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 961–967.
153. Whiteman D.C., Siskind V., Purdie D.M., Green A.C. (2003) Timing of pregnancy and the risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12: 42–6.
154. Yan Z., Lambert N.C., Guthrie K.A., Porter A.J., Loubiere L.S., Madeleine M.M., Stevens A.M., Hermes H.M., Nelson J.L. (2005) Male microchimerism in women without sons: quantitative assessment and correlation with pregnancy history. *Am J Med* 118: 899–906.
155. Yu J., Ren X., Cao S., Li H., Hao X. (2008) Beneficial effects of fetal-maternal microchimerism on the activated haplo-identical peripheral blood stem cell treatment for cancer. *Cytother* 10: 331-339.
156. Zhong X.Y., Hahn S., Steinborn A., Holzgreve W. (2006) Quantitative analysis of intact fetal cells in maternal plasma by real-time PCR. *European J of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 133: 20-24.
157. Zhong X.Y., Volgmann T., Hahn S., Holzgreve W. (2007) Large scale analysis of circulatory fetal DNA concentrations in pregnancies which subsequently develop preeclampsia using two Y chromosome specific real-time PCR assay. *JTTGA* 8:135-139.
158. Zhou B., Sun Q., Cong R., Gu H., Tang N., Yang L., Wang B. (2002) Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Gynecologic Oncology* 108(2): 415-417.
159. Zimmermann B., El-Sheikhah A., Nicolaides K., Holzgreve W., Hahn S. (2005) Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 51: 1598-1604.
160. Zimmermann B.G., Holzgreve W., Avent N., Hahn S. (2006) Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci* 1075: 347-349.

Internetové zdroje

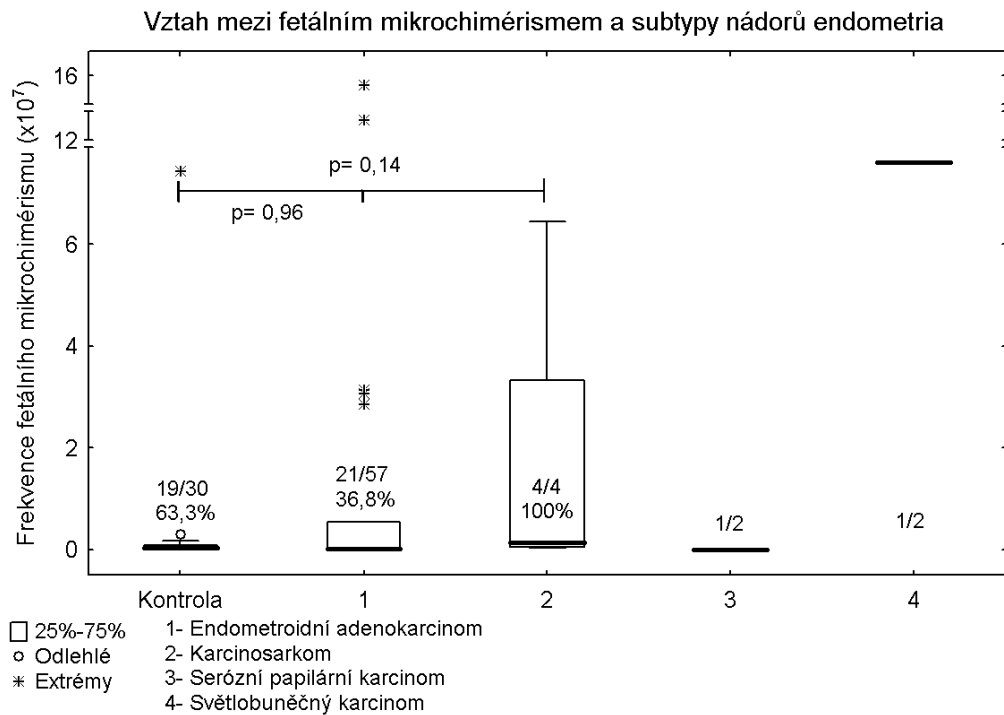
1. Generi Biotech [online]. © 2012 [cit. 2012-04-22]. Dostupné z: <http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/>
2. Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind Ch. TNM klasifikace zhoubných novotvarů 7.vydání 2009, česká verze 2011. Novák J., Praha 2011: Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2011 [online]. © 2012 [cit. 2012-04-22]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/katalog/klasifikace/tnm-klasifikace-zhoubnych-novotvaru>.

Přílohy

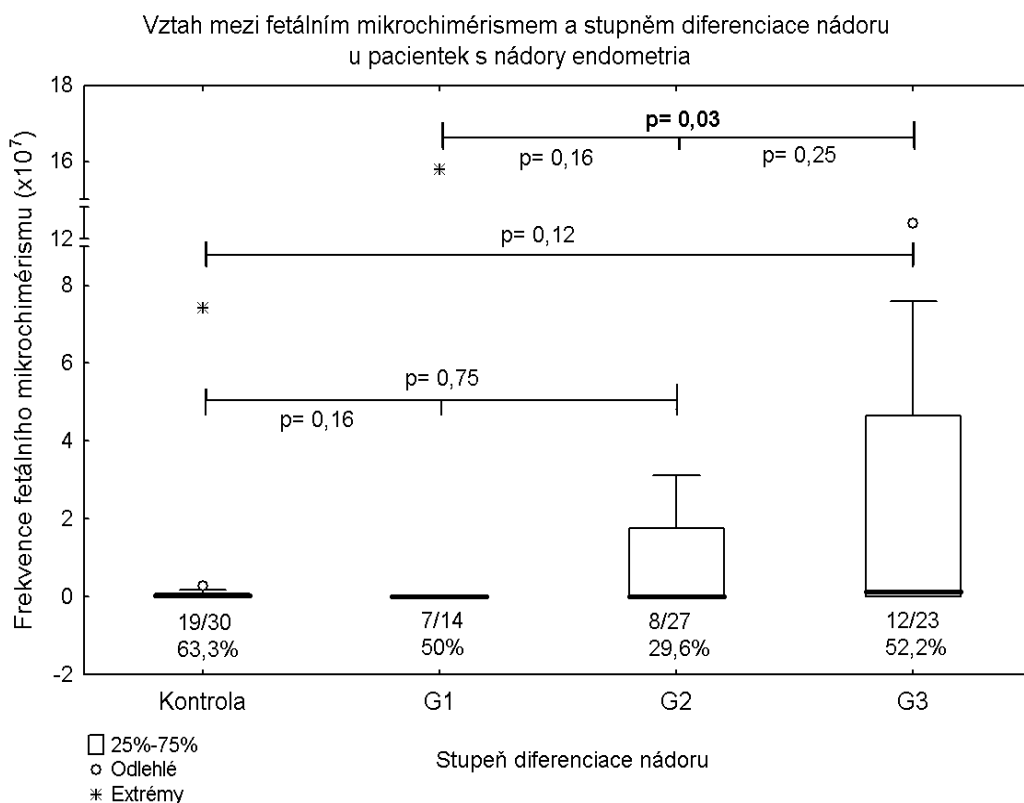
Graf č. 1 Vztah mezi FM a nádory endometria



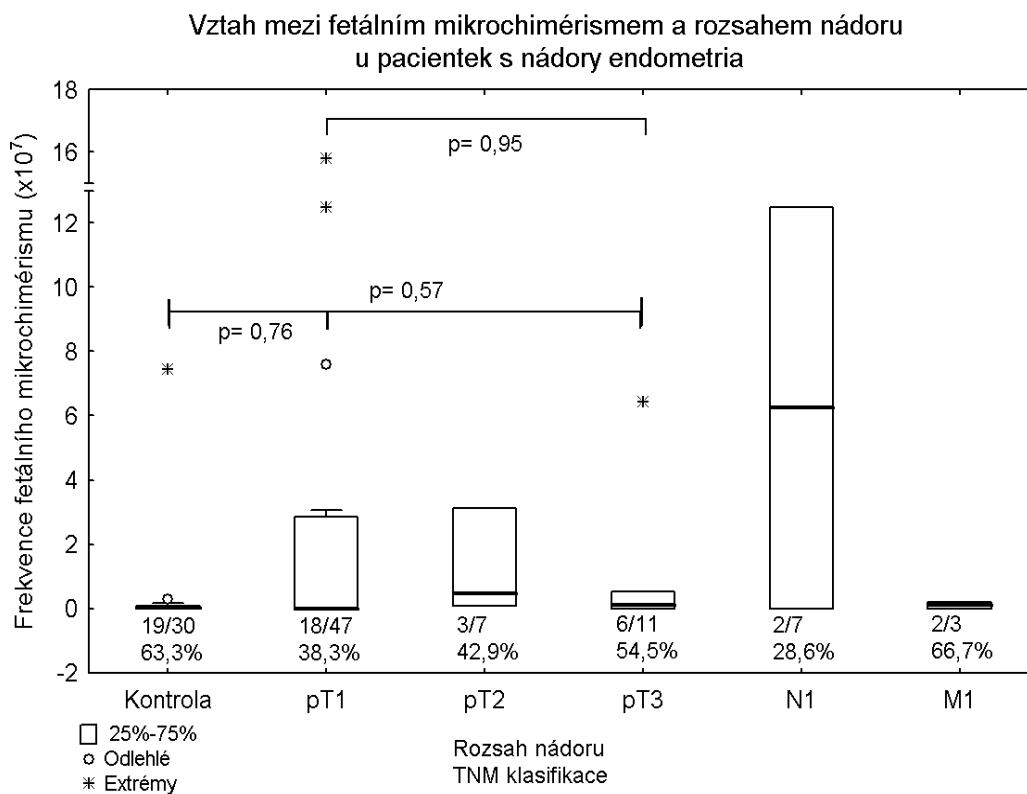
Graf č. 2 Vztah mezi FM a subtypy nádorů endometria



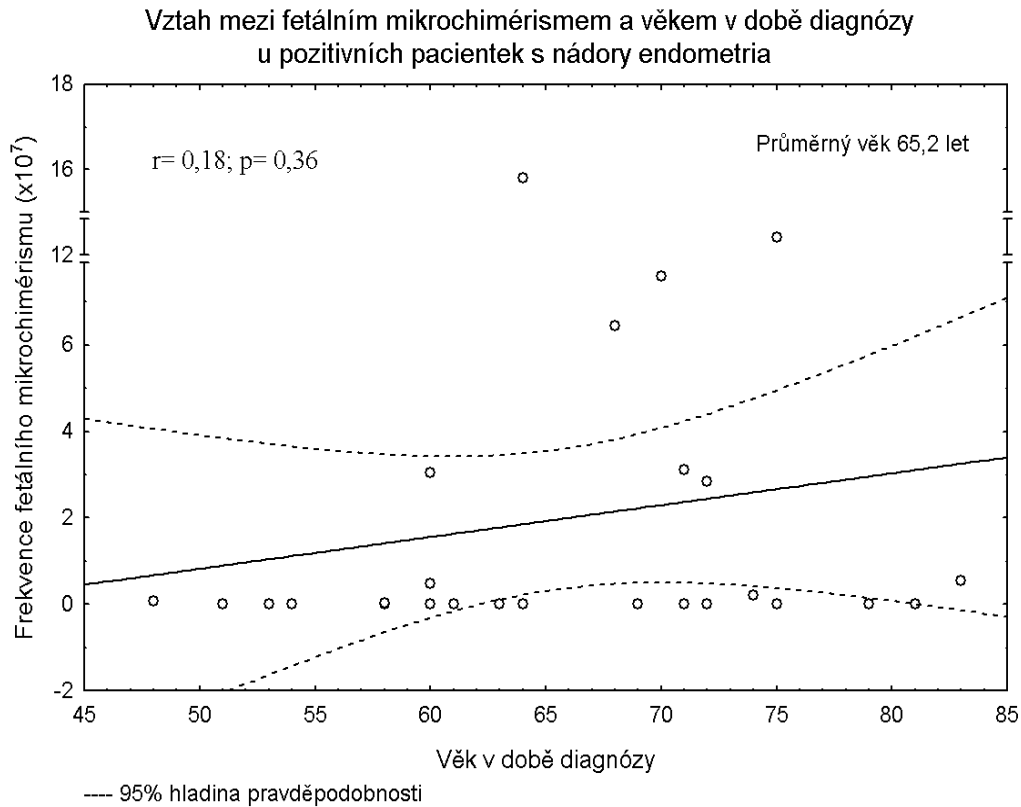
Graf č. 3 Vztah mezi FM a gradem nádoru u pacientek s nádory endometria



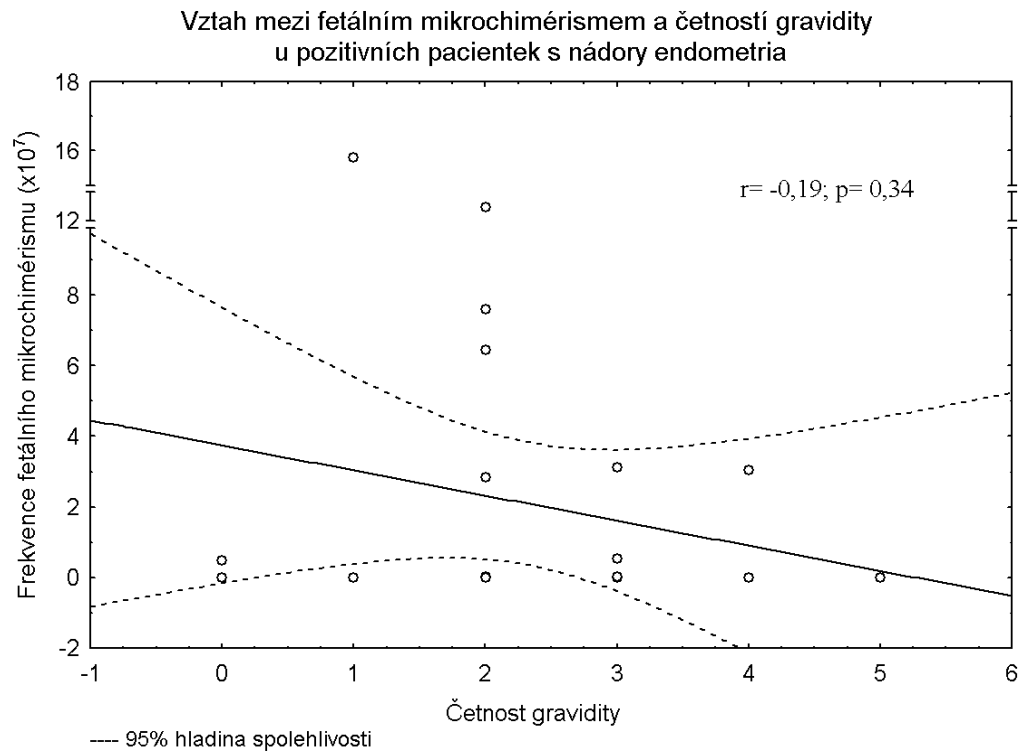
Graf č. 4 Vztah mezi FM a stagem nádoru u pacientek s nádory endometria



Graf č. 5 Vztah mezi FM a věkem v době diagnózy u pozitivních patientek s nádory endometria



Graf č. 6 Vztah mezi FM a četností gravidit u pozitivních patientek s nádory endometria



Graf č. 7 Vztah mezi FM a BMI u pacientek s nádory endometria

