

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA FYZIOLOGIE ŽIVOČICHŮ A VÝVOJOVÉ BIOLOGIE
ODDĚLENÍ VÝVOJOVÉ BIOLOGIE A IMUNOLOGIE

Bakalářská práce

Fetální mikrochimérismus a jeho projevy

Praha 2006

Školitel bakalářské práce:
Doc. Mgr. Jan Černý, Ph.D.

Autor:
Denisa Dolečková

Poděkování

Za mnoho skvělých podnětů, velmi vstřícný přístup a pomoc při přípravě této práce upřímně děkuji svému školiteli Janu Černému.

Ráda bych poděkovala i paní Marii Nohýnkové za její nikdy nekončící podporu.

Úvod	4
Charakteristika fetálních buněk angažovaných ve vzniku fetálního mikrochimérismu a jejich diferenciační potenciál v mateřském organismu	8
Přehled relevantních mechanismů nastolení imunologické tolerance vůči plodu	14
Fetální mikrochimérismus a autoimunitní onemocnění	18
Závěr	22
Literatura	23

Úvod

Chiméra je definována jako organismus obsahující geneticky odlišné populace buněk, odvozené z různých zygot. Chiméru je třeba odlišovat od mozaiky - mozaika je sice rovněž organismem tvořeným ze dvou nebo i více geneticky odlišných buněčných populací, které však vznikly z jediné zygoty.

S chimérismem se setkáváme v různé míře u řady organismů, včetně člověka. Bylo pozorováno, že 8% dvojvaječných dvojčat a 21% trojčat má chimerické krevní buňky (van Dijk et al., 1996). V těchto případech příslušné krevní elementy v těle jedince pocházejí od dalšího sourozence (Flegr, 2005). Chimérismus u člověka často vede k závažným poruchám, může se uplatňovat například při vzniku autismu (Pearson, 2002).

Chiméru je třeba odlišovat od mozaiky. Mozaika je sice organismus tvořený ze dvou nebo i více geneticky odlišných buněčných populací vzniklých ale z jediné zygoty.

Nejobvyklejší je fetální mikrochimérismus, ke kterému dochází v průběhu těhotenství. Vzniká přechodem fetálních buněk do krevního oběhu a posléze případně do dalších tkání mateřského organismu. Zde mohou přetrvávat i desetiletí po porodu (Bianchi et al., 1996). Předpokládá se, že přechod buněk plodu, stejně jako uvolňování extracelulární DNA, do krevního oběhu mateřského organismu souvisí se strukturou placenty a je zapříčiněn zejména její kontinuální remodelací. K mikrochimérismu dochází také po krevní transfúzi nebo po orgánových transplantacích (Artlett, 2005). Vyskytuje se také jako důsledek transfúze buněk mezi dvojčaty *in utero* (De Moor et al., 1988). Byl popsán jev nazvaný gonadální parazitismus (Rinkevich, 2000), při kterém jeden z partnerů obsadí přednostně, někdy dokonce výhradně pohlavní orgány a produkuje veškeré pohlavní buňky chimerického organismu, v případě člověka byl popsán případ ženy, jejíž somatické tkáně byly geneticky uniformní, nebyly tedy chimerického původu, nicméně genetické testy jejích čtyř dětí ukázaly, že

pohlavní buňky v ováriích pocházely od jejího (dvouvaječného) sourozence (Flegr, 2005). Další možné zdroje mikrochimérismu, jako například přechod perzistujících fetálních buněk staršího sourozence z krevního oběhu matky do plodu nebyly zatím důkladně prozkoumány (Nelson, 2003) a zdá se, že jsou statisticky velice nepravděpodobné.

Přechod buněk skrz placentu je v případě lidského těhotenství oboustranný. Buňky matky jsou schopny přejít do plodu, jejich množství je však výrazně nižší než v opačném směru (Lo et al., 2000). Jedná se pak o tzv. maternální mikrochimérismus, který není neobvyklý v periferní krvi zdravých dospělých. Hladina mikrochimerických buněk maternálního původu je zvýšená u pacientů se systémovou sklerózou, přičemž byly tyto buňky nalezeny v kostní dřeni a v tkáních dotčených daným onemocněním (Lambert et al., 2004).

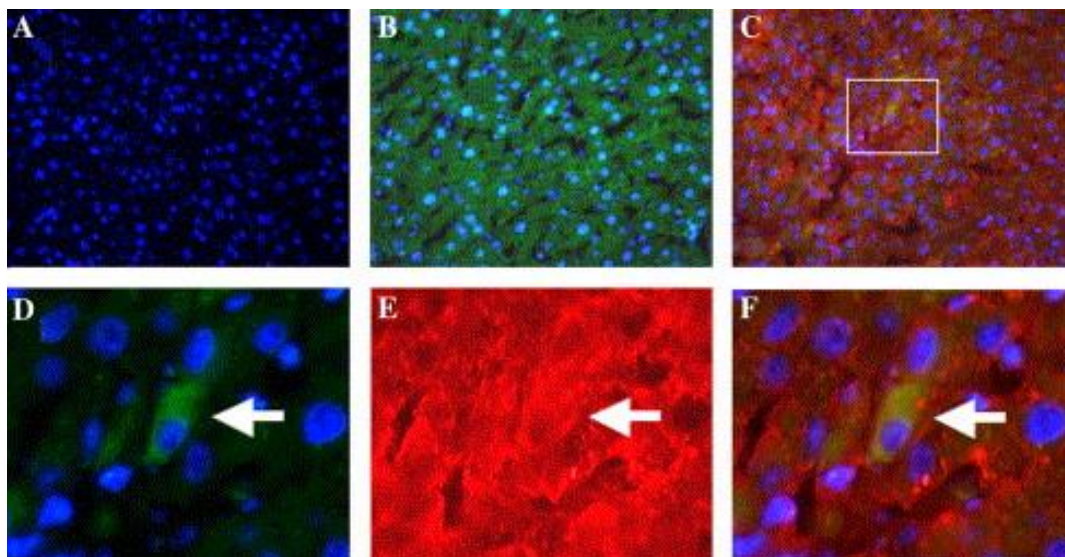
U lidí je fetální mikrochimérismus vždy přítomný a dochází k němu nejpozději v šestém týdnu gravidity (Ariga et al., 2001). Týká se tedy jak buněk donošených plodů, tak i plodů potracených. Poprvé byl fetální mikrochimérismus, ve smyslu přetrvávání geneticky odlišných buněk plodu v těle mateřského organismu bez zjevné reakce štěpu proti hostiteli (GvH), popsán na myších (Liégeois et al., 1977). Postupně bylo zjištěno, že se jedná o obecně rozšířený fenomén a bylo vysloveno velké množství hypotéz o jeho možných fyziologických funkcích a patofyziologických důsledcích.

Z fyziologických funkcí fetálního mikrochimérismu je třeba zmínit zejména jeho důležitost při ustavení imunologické tolerance k plodu, který je vůči mateřskému organismu v podstatě semialogenním transplantátem (Thellin et al., 2000).

K velmi diskutovaným patří hypotézy o schopnosti určitých typů fetálních mikrochimerických buněk reparovat některé tkáně mateřského organismu, například játra (obrázek 1) nebo ledviny (Wang et al., 2004). V této souvislosti lze zmínit, že dlouho přetrvávající fetální mikrochimerické kmenové buňky mohou být příčinou dlouhověkosti žen ve srovnání s muži a dále mohou vysvětlovat preventivní vliv těhotenství ve

vztahu k náchylnosti k některým typům onemocnění (O'Donoghue et al., 2004).

Obrázek 1



Fetální mikrochimerické buňky v játrech

A – negativní kontrola

B - EGFP⁺ pozitivní kontrola

C až F – epifluorescence fetální buňky (D) v jaterní tkáni matky (E), na (C) a (F) v překryvu

Zdroj: Wang et al., 2004

Naproti tomu k dnes již prokázaným faktům patří vztah fetálního mikrochimérismu k patogenezi některých autoimunitních onemocnění, například systémové sklerózy (SSc) a některých tyreoiditid (Artlett, 2005). Některé dlouho přetrvávající typy fetálních mikrochimerických buněk mohou být vysvětlením toho, proč jsou ženy „horšími“ dárci orgánů, respektive kostní dřeně k transplantaci (O'Donoghue et al., 2004).

Fetální mikrochimérismus hraje roli také v některých patofyziologických stavech spojených s vlastním těhotenstvím, kdy zvýšené množství fetálních mikrochimerických buněk je dáváno do souvislosti s pre-eklampsií, předčasnými porody, případně s aneuploidií plodu, a naopak jejich snížené množství má vztah ke sklonu k samovolným opakovaným potratům (Artlett, 2005).

Podle analýzy prováděné v šestnácti rodinách existuje možnost, že fetální mikrochimerické buňky z předchozích gravidit mohou ovlivňovat pohlaví později narozených potomků. V rodinách, kde první potomek byl syn, v 75% případu další narozená byla dcera (Komlos et al., 1993).

Persistující mikrochimerické fetální buňky byly v širokém rozsahu nalezeny také v tkáních žen s jinými než autoimunitními nemocemi jako například hepatitida typu C nebo karcinom děložního hrdla (Khosrotehrani et Bianchi, 2005). Tento fenomén může souviset se schopností fetálních buněk preferenčně se usazovat, dělit se a diferencovat v poškozené mateřské tkáni.

Charakteristika fetálních buněk angažovaných ve vzniku fetálního mikrochimérismu a jejich diferenciační potenciál v mateřském organismu

Charakterizace buněčných typů přecházejících z plodu do mateřského organismu a určení jejich lokace v různých typech mateřských tkání, stejně tak jako pochopení jejich fyziologických funkcí může vést k prevenci případně minimalizaci škodlivých efektů tohoto fenoménu. Možný potenciál má využití fetálního mikrochimérismu ve smyslu terapeutického působení těchto buněk (Johnson et Bianchi, 2004).

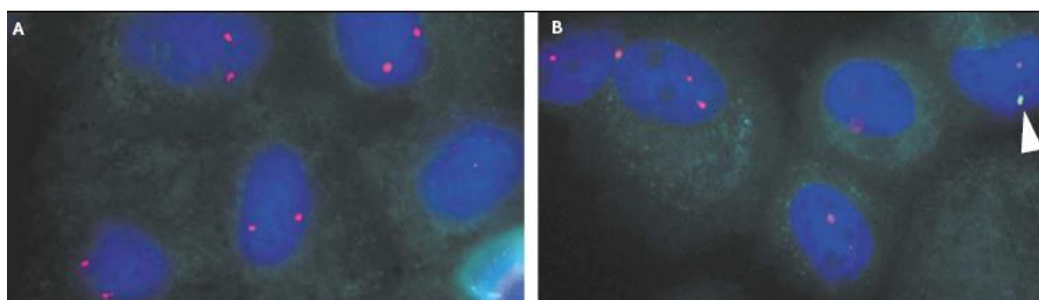
K neinvazivní prenatalní diagnostice se používají takové fetální buňky, které přechází do mateřského organismu a mají omezenou délku životnosti. Vhodné a dnes již klinicky používané jsou například fetální erytroblasty, které se vyskytují v krevním oběhu všech těhotných žen, a to v množství jeden na jeden milion až deset milionů mateřských jaderných buněk (Reischig et al., 2005).

Na druhé straně existují fetální buňky přetrvávající v tkáních mateřského organismu desítky let. Nejdelší popsání přežívání těchto buněk je čtyřicet tři let v jaterní tkáni (Tanaka et al., 2000). Právě tyto buňky, označované jako „zakladatelské buňky související s těhotenstvím“ (pregnancy-associated progenitor cells), jsou dávány na jedné straně do souvislosti se vznikem autoimunitních onemocnění založených na mechanismu reakce štěpu proti hostiteli, na druhé straně jsou díky své multipotentnosti předurčeny k regeneraci širokého spektra tkání (Reischig et al., 2005). Fetální buňky, které se v mateřském organismu vyskytují desetiletí, jsou např. buňky charakterizované přítomností povrchového proteinu CD34+, který je typický pro krvetvorné kmenové buňky. Ty se podařilo izolovat z krve všech testovaných těhotných žen v průběhu těhotenství a v době šest měsíců po porodu. Dalšími jsou buňky s povrchovými proteiny CD34+ a CD38+ (časné B- a T- buňky), které byly nalezeny u 75% matek synů (Bianchi et al., 1996; Tanaka et al., 2000;

Bianchi et al., 2005). V krvi plodu a v placentě se vyskytují různé typy kmenových buněk (Bianchi et al., 2005). Krvetvorných kmenových buněk CD34+ (HSCs-hematopoietic stem cells) bylo v tkáni placenty nalezeno dva až čtyřikrát více než v jiných krvetvorných tkáních (Alvarez-Silva et al., 2003). Navíc byla prokázána jejich větší proliferační schopnost ve srovnání například s jaterními progenitory (Bianchi et al., 2005).

Dalším typem jsou fetální mesenchymatické kmenové buňky, které dlouho přetrvávají v různých tkáních, konkrétně v kostní dřeni (obrázek 2) a v kostní tkáni žeber (obrázek 3). Pokud jsou samčího původu a obsahují chromosom Y je možné je poměrně snadno prokázat na pozadí mateřského genomu kombinací imunocytochemických metod, průtokové cytometrie a metody FISH (fluorescence in-situ hybridisation) ve všech vzorcích odebraných ženám, které porodily syny nebo prodělaly potrat plodu neznámého pohlaví v době od 13 do 51 let. Jedná se o buňky této imunofenotypové charakteristiky: CD45-, CD14-, CD11a-, CD49b-, CD49d^{low}, SH2+, SH3+, Vimentin+, CD29+, CD49e+, CD106+, HLA-Class II-. Prokázala se také jejich schopnost sebeobnovy dělením *in vitro* a jejich potenciál diferenciaci v kostní nebo tukovou tkáň (O'Donoghue et al., 2004).

Obrázek 2

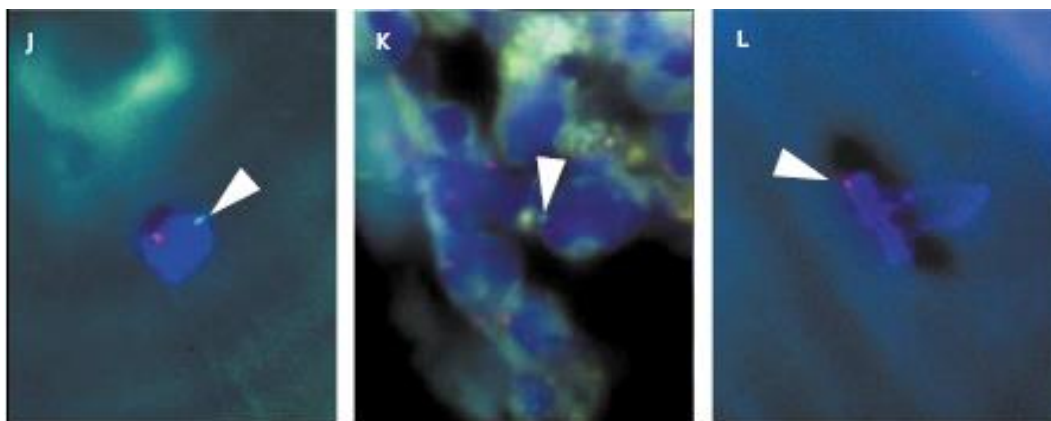


A- Mesenchymatické kmenové buňky kostní dřeni ženy. X chromozómy označené metodou FISH

B- Tkáňová kultura mesenchymatických kmenových buněk ženy s fetálními mikrochimerickými buňkami nesoucími chromozóm Y označený pomocí SpectrumGreen

Zdroj: O'Donoghue et al., 2004

Obrázek 3



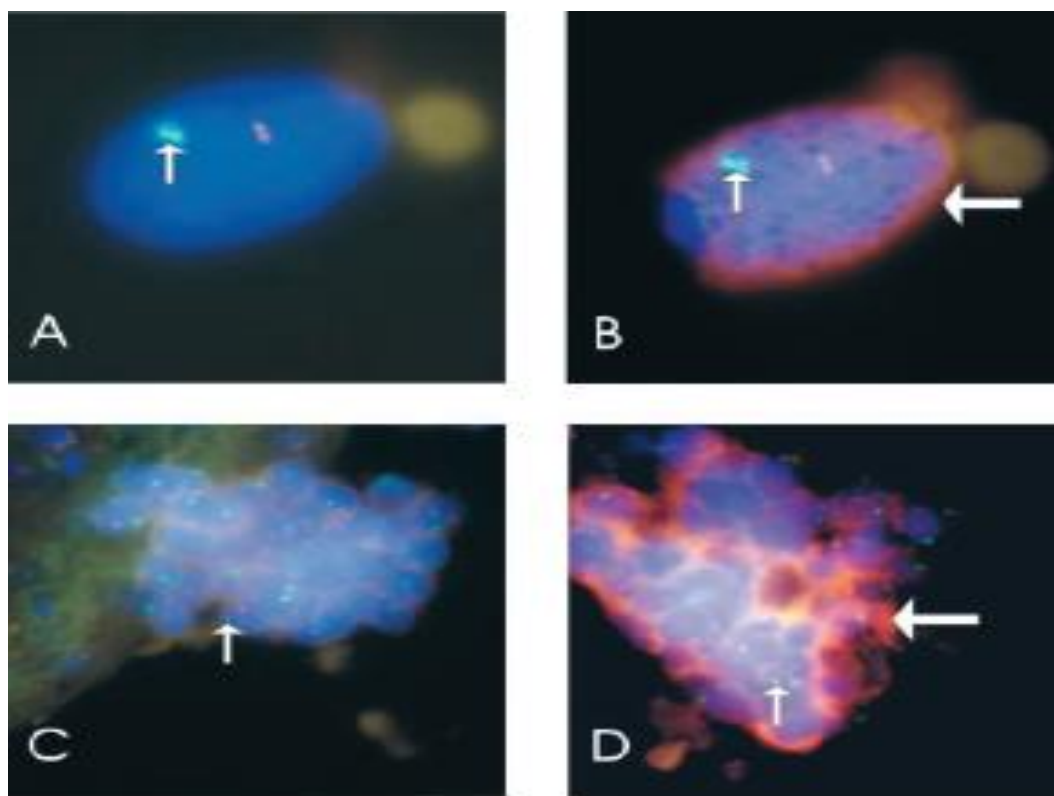
J, K – Fetální buňka s fenotypem osteocytu obsahující chromozóm Y v kostní tkáni ženy. Y chromozóm značen pomocí SpectrumGreen.

L - Fetální buňka s fenotypem osteocytu obsahující chromozóm Y v kostní tkáni ženy. Y chromozóm značen pomocí SpectrumOrange.

Zdroj: O'Donoghue et al., 2004

V tkáních mateřských organismů byly nalezeny také fetální mikrochimerické buňky s markery typickými pro buňky epiteliální, respektive pro buňky jaterní tkáně (Khosrotehrani et al., 2003). To ukazuje na schopnost dalšího typu prekursoru migrovat z krevního řečiště do rozličných typů tkání mateřského organismu, kde se může začlenit mezi buňky přítomné v daných tkáních a zde se dále diferencovat (Johnson et Bianchi, 2004). Imunohistochemická vyšetření (za pomoci fluorescenčně značených protilátek) podala jasný důkaz, že fetální mikrochimerické buňky, v tomto případě identifikované přítomností chromozómu Y, syntetizují v mateřském organismu cytokeratiny. Tyto proteiny, typicky syntetizované buňkami epitelů, mohou produkovat fetální buňky, pokud se nalézají ve folikulech štítné žlázy (obrázek 4), v tkáni děložního hrdla, žlučníku nebo v epitelu střev. Také se z nich mohou stát buňky s jaterními charakteristikami - hepatocyty, pokud se staly součástí jaterní tkáně (Khosrotehrani et Bianchi, 2005).

Obrázek 4



Mikrochimerické fetální buňky v tkáni štítné žlázy značené metodou FISH

A – fetální mikrochimerická buňka, chromozóm Y označen tenkou šipkou

B – buňka A, značená protilátkou proti cytokeratinu, označeno velkou šipkou

C – skupina fetálních mikrochimerických buněk v tkáni štítné žlázy obsahující chromozómy Y

D - skupina fetálních mikrochimerických buněk v tkáni štítné žlázy produkující cytokeratin

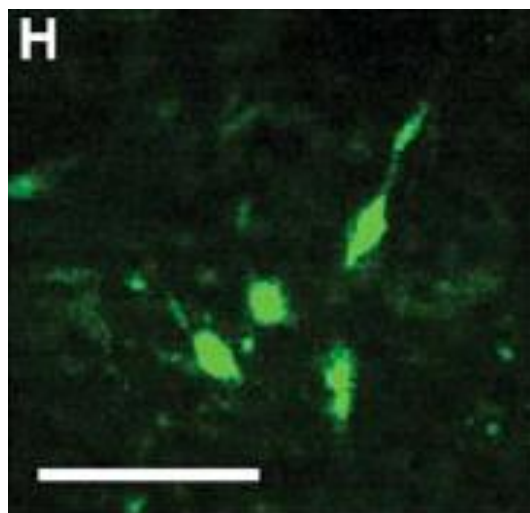
Značení: X chromozóm – Cy3 (oranžová), Y chromozóm – FITC (zelená), cytokeratin – Texas Red (červená), jádro – DAPI (modrá)

Zdroj: Khosrotehrani et Bianchi, 2005

Některé fetální buňky navíc mohou prostupovat, po překonání placentální bariéry a vstupu do krevního řečiště mateřského organismu, také hemato-encefalickou bariérou do mozku. Zde posléze exprimují některé z imunocytochemických markerů charakteristických pro nervové tkáně. V pokusu, kdy byly kříženy myši samice „wild-type“ s transgeními samci „Green Mice“, exprimujícími zelený fluorescenční protein (EGFP-enhanced green fluorescent protein), se EGFP pozitivní fetální buňky objevily v mozku myších samic (obrázek 5) (Tan et al., 2005). Jejich umístění, morfologické vlastnosti a tomu odpovídající exprese imunocytochemických

markerů svědčily o jejich diferenciaci v buňky podobné perivaskulárním makrofágům, neuronům, astrocytům a oligodendrocytům. V mozkové tkáni těchto samic byly tyto fetální EGFP pozitivní buňky obvykle pozorovány nahloučené ve skupinách, klastrech, ve kterých jednotlivé buňky měly odlišný morfologický a imunocytochemický profil. K tomuto „klastrování“, shromažďování se do skupin, může docházet tak, že jedna fetální progenitorová, respektive kmenová buňka pronikne hemato-encefalickou bariérou do tkáně mozku, podstoupí diferenciaci do různých subpopulací, popřípadě fúzuje s různými typy buněk nervové tkáně. Další možností je to, že již odlišně diferencované typy fetálních buněk pronikají hemato-encefalickou bariérou ve stejném místě, buď v důsledku její odlišné lokální permeability nebo pod vlivem uvolňovaných signálních molekul s atrahujícím účinkem. Třetí možností je, že embryonální buňky mají vyšší spontánní homotypickou adhezi, která usnadňuje jejich seskupování po proniknutí do mozku (Tan et al., 2005).

Obrázek 5



Epifluorescence EGFP⁺ fetálních buněk v mozkové tkáni (kortexu) myší samice

Zdroj: Tan et al., 2005

Další studie by měly vést k pochopení mechanismu, jakým fetální buňky hemato-encefalickou bariéru překonávají, faktorů ovlivňujících jejich konečnou lokalizaci, diferenciaci v odlišné buněčné typy a objasnění principu vzniku klastrů (Tan et al., 2005). Atraktivitu takového výzkumu

jen zvyšuje některými studii prokázaná schopnost buněk obsažených v pupečnickové krvi prostupovat hemato-encefalickou bariérou a přednostně osidlovat poškozená místa mozkové tkáně, kde, stejně jako v předchozím případě, dochází k jejich diferenciaci v různé typy nervových buněk exprimující odlišné imunocytochemické markery (Chen et al., 2001; Lu et al., 2002).

Přehled relevantních mechanismů nastolení imunologické tolerance vůči plodu

Buňky plodu nesou na povrchu velké množství aloantigenů MHC (major histocompatibility complex) glykoproteinů i jiných proteinů zděděných po otci, takže těhotenství představuje situaci v zásadě podobnou alogenní orgánové transplantaci. Ve velké většině případů však imunitní systém matky plod dobře toleruje (Hořejší et Bartůňková, 2002). V procesu vedoucímu k navození tolerance vůči plodu se uplatňuje řada mechanismů modifikujících imunitní systém matky v závislosti na jejím aktuálním imunologickém stavu. Mohou působit lokálně, řekněme na úrovni placenty, mohou mít celkové účinky na imunitní systém matky, mohou působit jednotlivě nebo společně, a to v různé míře také v závislosti na délce gravidity (Thelin et al., 2003; Mincheva-Nilsson et al., 2006).

Kromě toho, že plod je relativně izolován od imunitního systému matky, tvoří imunologickou bariéru bránící ataku aloreaktivními T lymfocyty matky trofoblast, jehož buňky neexprimují klasické MHC glykoproteiny I. třídy a nemohou být tudíž T buňkami rozpoznány. Tomu, aby se nestaly cílem NK buněk (natural killer – přirozený zabíječ), které se normálně specializují na ničení buněk s abnormálně nízkou expresí MHC glykoproteinů I. třídy, je zabráněno tím, že na trofoblastu jsou specificky exprimovány dva neklasické MHC glykoproteiny I. třídy (nazývané též MHC glykoproteiny Ib), HLA-G a HLA-E (HLA-human leukocyte antigens, označení pro lidské MHC molekuly). Komplexy HLA-G a HLA-E jsou rozpoznávány specializovanými inhibičními receptory NK buněk a tím přispívají k toleranci vůči plodu (Hořejší et Bartůňková, 2002).

V těhotenství dochází k výraznému utlumení T_H1 typu imunitních reakcí ve prospěch mechanismů založených na T_H2 buňkách (Hořejší et Bartůňková, 2002).

Zdá se, že aloreaktivní T buňky matky jsou nějakým způsobem aktivně tolerizovány stykem s malým množstvím buněk plodu, které

pronikají do oběhu matky (Hořejší et Bartůňková, 2002). Tyto fetální buňky, mající na svém povrchu specifické antigeny včetně paternálních HLA molekul, musí být imunitním systémem mateřského organismu rozpoznávány, musí tedy existovat aktivní mechanismus, který by inhiboval imunoreaktivitu proti fetálním antigenům (Tanaka et al., 2000). Od čtyřicátých let minulého století je známo, že antigenní expozice prostřednictvím hepatoportálního oběhu může navodit antigeně specifickou toleranci, jev se nazývá Chase-Sulzberger efekt (Chase, 1946 v Tanaka et al., 2000). Dále je známo, že mikrochimérismus vzniklý jako důsledek alogenní transplantace může být spojován s tolerancí bez nutnosti imunosupresivní podpůrné terapie, zvláště po transplantaci jater (Starzl et al., 1996).

Výše popsané dovoluje vyslovit hypotézu, vysvětlující vznik tolerance vůči plodu. Významnou roli v ní hrají játra jako imunokompetentní orgán, ve kterém jsou T buňky schopné diferenciaci. V raných stádiích gravidity, kdy dochází k pronikání fetálních buněk do krevního oběhu matky, mohou tyto buňky vstoupit portální vénou do jater, kde mohou vystupovat jako buňky prezentující antigen (APC, antigen-presenting cell) mateřským T buňkám, včetně regulačních T buněk. Alogenně specifická, v tomto případě fetospecifická tolerance je navozena díky absenci a/nebo blokování kostimulačních receptorů. Jedná se o toleranci „infekční“, vedoucí k celkové periferní toleranci buněk plodu mateřskými T buňkami, tedy k inhibici aloreaktivity vůči plodu (Tanaka et al., 2000).

Některé otázky zbývá dořešit, například migrace fetálních buněk do jater matky se ukázala být velmi sporadickou událostí v případě myší (Bonney et al., 1997), ovšem citlivost použité PCR metody mohla ovlivnit výsledek (Tanaka et al., 2000). Dále bude potřeba přesně charakterizovat buněčný typ fetálních buněk, které vstupují do jater matky a určit, zda jsou skutečně schopné předkládat antigen (Tanaka et al., 2000). Periferní antigen specifická tolerance vůči plodu navozená mechanismem klonální delecce – fyzickou eliminací určitých klonů lymfocytů během gestace v důsledku

kontaktu mateřského imunitního systému s fetálními mikrochimerickými buňkami byla experimentálně potvrzena také u myší (Jiang et al., 1998).

Velmi důležitým faktorem ovlivňujícím navození tolerance je počet fetálních mikrochimerických buněk, které se dostanou do oběhu a tkání matky. V krvi se objevují nejpozději v šestém gestačním týdnu (Ariga et al., 2001) a jejich počet v čase stoupá (Khosrotehrani et Bianchi, 2005). Během druhého trimestru je jejich normální počet v krvi matky 1-6 buněk na 1 ml mateřské krve (Bianchi et al., 2001; Krabchi et al., 2001; Bianchi et al., 1997).

Pokud je fetálních buněk příliš málo, je těhotenství ohroženo spontánním potratem a nízký stupeň fetálního mikrochimérismu je proto dáván do souvislosti se sklonem k samovolným potratům (RSA-recurent spontaneous abortion) (Artlett et al., 2005; Bianchi et al., 2001).

Naopak množství vyšší než potřebné k navození tolerance pak může být indikátorem patologického stavu, jak bylo zmíněno v úvodu, vedoucího například k pre-eklampsii (Holzgreve et al., 1998; Lo et al. 1999; Leung et al. 2001; Zhong et al. 2001), předčasnému porodu (Leung et al. 1998) nebo aneuploidii plodu (Bianchi et al. 1997, Zhong et al. 2000). Můžeme však jen spekulovat, v jakém vztahu je zvýšená hladina fetální buněk v oběhu matky k mechanismu vzniku těchto patologických stavů, protože u všech výše jmenovaných může být způsobena přítomnými abnormalitami ve struktuře placenty (Artlett et al., 2005).

V případě pre-eklampsie je hladina fetálních buněk v krevním oběhu matky zvýšena pětikrát (Lo et al., 1999), a to velmi dlouho před manifestací prvních klinických příznaků (Leung et al., 2001).

Pre-eklampsie, také označovaná jako pozdní gestóza, je závažná multisystémová porucha třetího trimestru, neznámé etiologie, která může ovlivnit vývoj plodu nebo zanechat trvalé následky na zdravotním stavu ženy a pokud vyústí v tzv. eklampsii, jde již o stav ohrožující život matky i plodu. Dnes se předpokládá, že při jejím vzniku přinejmenším spolupůsobí vaskulární nedostatečnost endotelu a špatná placentace, tedy patologické jevy, které mohou mít za následek zvýšení hladiny fetálních buněk v krevním oběhu matky (Macků et Macků, 1998; Artlett et al., 2003).

Zmíněné abnormality ve vaskularizaci placenty stejně jako hematologické odlišnosti spojené s aneuploidií plodu jsou známy již dlouho (Strobel et al. 1985). Až později byla při některých aneuploidích, například u karyotypu 47,XY,21 a 47,XY,+inv(dupl)15, v krvi matek naměřena vysoká hladina fetálních buněk. U některých jiných, například u karyotypů 47,XY,+18 nebo 47,XXY, však ke zvýšení hladiny nedochází. (Bianchi et al., 1997).

Fetální mikrochimerické buňky byly detekovány také ve vzorcích z kožních lézí těhotných žen, u kterých se vyskytla těhotenská vyrážka s typickými nefolikulárními erytematózními papulkami obvykle na břicho, rukou, hýždích a stehnech. Histologicky prokázaná perivaskulární infiltrace lymfatických buněk se souběžnou přítomností fetálních buněk naznačuje možnost jejich zapojení v zánětlivých odpovědích mateřských tkání (Aractingi et al., 1998).

Množství fetálních buněk přecházejících do krevního oběhu matky během gestace bylo předmětem pokusu provedeného na zvířecím modelu, na myších, jeho cílem bylo zjištění, jak feto-maternální histokompatibilita ovlivňuje hladinu těchto buněk v hematopoetických tkáních myších samic-matek. V případě syngenního plodu (shodná histokompatibilita, identická alela v H-2 lokusu) bylo v hematopoetických tkáních myších samic-matek nalezeno více fetálních mikrochimerických buněk než pokud byl plod alogenního původu (Bonney et Matzinger, 1999). U lidí se analogický trend závislosti feto-maternální histokompatibility a počtu perzistujících fetálních buněk v tkáních matky nepodařilo prokázat (Evans et al., 1999).

Fetální mikrochimérismus a autoimunitní onemocnění

Přestože fenomén fetálního mikrochimérismu byl popsán před téměř třiceti lety, v roce 1977 (Liégeois et al., 1977), první hypotézy o jeho možných důsledcích se začaly objevovat až po roce 1996, kdy byly během výzkumu týkajícího se neinvazivní prenatalní diagnostiky izolovány z krve těhotných žen progenitorové hematopoetické buňky s charakteristickými povrchovými molekulami CD34+ a CD34+/CD38+, později identifikované jako dlouho přetrvávající (Bianchi et al., 1996).

Nejprve se v souvislosti s perzistujícími fetálními mikrochimerickými buňkami začalo hovořit o jejich možných negativních důsledcích, a to o jejich možném zapojení do mechanismu vzniku některých autoimunitních onemocnění (Nelson, 1996). Tato hypotéza je založena především na podobnosti patogeneze těchto onemocnění s reakcí štěpu proti hostiteli (GVH-graft versus host), a dále pak na epidemiologických pozorování incidence některých autoimunitních onemocnění, kdy frekvence jejich vzniku je charakteristicky vyšší u žen středního věku a to u žen-matek (Johnson et Bianchi, 2004).

Podobnost patogeneze onemocnění s reakcí štěpu proti hostiteli je výrazná zejména u často zmiňovaného autoimunitního onemocnění tzv. systémové sklerózy (Chosidow et al., 1992; Claman et al., 1985; Clamn et al., 1990). To, že by se fetální mikrochimerické buňky mohly angažovat v etiologii systémové sklerózy vyplývá z průkazu jejich přítomnosti v kožních lézích (Artlett et al., 1998) i v jiných tkáních postižených systémovou sklerózou (ve srovnání se zdravými kontrolami) (Johnson et al., 2001). Fetální buňky izolované z periferní krve nemocných žen exprimují CD3 (součást TCR-receptoru T lymfocytů) (Artlett et al., 1998) a analýza populací jejich CD4+ buněk (CD4 je koreceptor pro MHC glykoprotein II. třídy; CD4+ buňky jsou většinou prekurzory pomocných Th lymfocytů) a CD8+ buněk (CD 8 je koreceptor pro MHC glykoprotein I. třídy; CD8+ jsou většinou prekurzory cytotoxických Tc lymfocytů) mikrochimerických

T lymfocytů prokázala, že CD4+ buněk je u postižených systémovou sklerózou prokazatelně více v porovnání s kontrolou (Artlett et al., 2002) a je možné, že po aktivaci produkují IL-2 s následnou klonální expanzí (Artlett, 2005).

Další studie se zaměřily na vztah kompatibility HLA II. třídy a mikrochimérismu při systémové skleróze a nemocí podobné etiologie. Souvislost se podařilo prokázat v případě vztahu alel genu DRB 1, který je součástí genového komplexu pro lidské MHC glykoproteiny (HLA) a kóduje příslušné β řetězce. Ukázalo se, že riziko vzniku této nemoci je devětkrát vyšší pokud jsou žena a její potomek HLA kompatibilní, přičemž riziko ještě stoupne pokud se alela u potomka vyskytuje v homozygotním stavu (Nelson et al., 1998). Naopak se nepodařilo prokázat analogický vztah mezi alelou DQA1*501 (Artlett et al., 2003).

Rozporuplnost těchto i dalších dat z imunologických studií ukazuje na značné nedostatky ve znalosti rolí pertistujících fetálních mikrochimerických buněk v patofyziologických mechanismech vzniku autoimunitních onemocnění (Johnson et Bianchi, 2004).

Některé studie vliv fetálních buněk v patogenezi nemoci signifikantně vylučují, jako je tomu například u primární žlučové cirhózy (PBC-primary biliary cirrhosis) (Invernizzi et al., 2000; Schoniger-Hekele et al., 2002), zatímco u té samé nemoci studie jiných autorů připouští opak, v tomto případě na základě nálezu fetálních buněk, mužských-obsahujících chromosom Y, u osmi z devatenácti pacientek s PCB a ani u jedné pacientky s chronickou hepatitidou typu C nebo s jaterní cirhózou způsobenou nadměrnou konzumací alkoholu, tedy nemocí neautoimunitní etiologie (Fanning et al., 2000).

Nejednoznačnosti najdeme také v závěrech studií snažících se o nalezení korelace mezi autoimunitními onemocněními a fetálními buňkami, ve kterých se tento vztah nepodařilo potvrdit ale ani vyvrátit. Z přítomnosti fetálních mikrochimerických buněk ve vzorcích štítné žlázy u žen-matek s rozličnými typy tyreoiditid, autoimunitních i neautoimunitních, včetně Graves-Basedovy choroby, potvrzující možný vztah fetálních buněk a

některých patologií štítné žlázy, nelze nezačít uvažovat o fetálních buňkách jako o možných modifikátorech, nikoli však jako o přímém patologickém agens (Srivatsa et al., 2001; Ando et al., 2002). Ke stejnému závěru došli autoři studie týkající se Hashimotovy tyreoiditidy (autoimunitní typ) (Klintschar et al., 2001).

Pokud se dále podíváme na studii možného vlivu fetálního mikrochimérismu v patogenezi některých autoimunitních nemocí, včetně systémové sklerózy, prováděnou analýzou vzorků různých pojivových tkání nemocných a kontrolních zdravých jedinců, ve které byly počty fetálních mikrochimerických buněk v obou skupinách shodné (Gannage et al., 2002), můžeme vyloučit fetální mikrochimérismus jako rizikový faktor patogeneze autoimunit pojivových tkání a od pohledu na fetální mikrochimérismus jako něco negativního a potenciálně škodlivého se dostáváme k tomu, že by se na tento fenomén dalo nahlížet jako na něco v podstatě neutrálního, bez vlivu na zdravotní stav matky (Johnson et Bianchi, 2004) ve smyslu dlouhodobých následků gravidity.

Poslední, v literatuře zmiňovaná, hypotéza pohlíží na fetální mikrochimerické buňky jako na elementy schopné se díky svému diferenciačnímu potenciálu účastnit reparačních mechanismů mateřských tkání.

V jedné ze studií, jejíž výsledek podporuje právě tuto hypotézu, byly analyzovány vzorky jaterní tkáně ženy s hepatitidou typu C (jedná o neautoimunitní zánět jater způsobený virovou infekcí), u které, přestože svévolně ukončila *lege artis* terapii, došlo k výraznému zlepšení klinických příznaků onemocnění. Vzorky obsahovaly tisíce buněk, které byly metodou FISH (fluorescence in situ hybridization) identifikovány jako mužské obsahující chromosom Y. Jednalo se o ženu bezdětnou, nikdy nebyla příjemkyní transfúze ani orgánového transplantátu a neměla sourozence dvojče. Následné analýzy DNA polymorfismu ukázaly jako možný zdroj mužských fetálních buněk v její jaterní tkáni interrupci, kterou podstoupila před asi osmnácti lety. V jejím případě došlo k tomu, že fetální buňky byly morfologicky neodlišitelné od okolní tkáně a vše tedy naznačuje, že se

diferencovaly v hepatocyty, buňky se specifickými charakteristikami pro jaterní tkáň (Johnson et al., 2002).

Také když porovnáme vzorky z nemocné a ze zdravé tkáně štítné žlázy, fetálních buněk, zmíněných v kapitole 2, produkujících keratin je více ve vzorcích s tkáněmi postiženými. Tyto fetální buňky, pravděpodobně hematopoetického původu, se přednostně usadily v místech poškození štítné žlázy, kde se diferencovaly do stejného fenotypu jaký má okolní mateřská tkáň (Khosrotehrani et Bianchi, 2005).

O možných mechanismech, kterými by fetální mikrochimerické buňky byly schopné nalézat poškození v různých typech tkání, se toho mnoho neví, ale zajisté budou jedním z výzkumných směrů v oblasti mikrochimérismu stejně jako studium jejich diferenciačního potenciálu.

Závěr

Ve své práci jsem se pokusila nastítnit, jak zajímavým a v současné době aktuálním tématem je fetální mikrochimérismus. Doufám, že se mi podařilo shrnout základní informace o této problematice, která se *de facto* týká každého z nás. Nastolení tolerance matky vůči plodu, různá autoimunitní onemocnění, jakým může být systémová skleróza a další, jsou jen příklady, jichž se jev fetální mikrochimérismus více než dotýká.

Neméně důležitým je přesah výzkumu fetálního mikrochimérismu do oblasti transplantační imunologie.

Úvodní kapitola fenomén fetálního mikrochimérismu popisuje a charakterizuje, následující kapitola pak upozorňuje na různé následky diferenciacie fetálních buněk v mateřském organismu. Tato první část se snaží zasazením do obecného rámce nastítnit, jak důležitá je dobrá znalost a charakteristika fyziologie fetálního mikrochimérismu pro případnou minimalizaci škodlivých efektů tohoto fenoménu.

Následující dvě kapitoly pak přinášejí podrobnější informace z oblasti výzkumu nastolení imunologické tolerance a autoimunitních onemocnění. Fakta jsou doplněna o konkrétní příklady z praxe a klinických studií.

Literatura

Alvarez-Silva, M., Belo-Diabangouaya, P., Salaun, J. and Dieterlen-Lievre, F. (2003). Mouse placenta is major hematopoietic organ. *Development* **130**, 5437-5444.

Ando, T., Imaizumi, M., Graves, P. N., Unger, P. and Davies, T.F. (2002) Intrathyroidal fetal microchimerism in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 3315–3320

Aractingi, S., Berkane, N., Bertheau, P., et al. (1998). Fetal DNA in skin of polymorphic eruptions of pregnancy. *Lancet*, **352**, 1898–1901.

Ariga, C. M., Ohto, H., Busch, M. P., Imamura, S., Watson, R., Reed, W. and 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**, 1524-1530.

Artlett, C. M. (2005). Pathophysiology of fetal microchimeric cells. *Clinica Chimica Acta*, **360**, 1-8.

Artlett, C.M., Cox, L. A., Ramos, R. C., et al. (2002). Increased microchimeric CD4+ T lymphocytes in peripheral blood from women with systemic sclerosis. *Clin Immunol*, **103**,303–308.

Artlett, C. M., O'Hanlon, T. P., Lopez, A. M., Song, Y. W., Miller, F. W. and Rider, L. G. (2003). HLA-DQA1 is not an apparent risk factor for microchimerism in patients with various autoimmune diseases and in healthy individuals. *Arthritis Rheum*, **48**, 2567–2572.

Artlett, C. M., Smith, J. B., Jimenez, S. A. (1998). Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from woman with systemic sclerosis. *N Eng J Med*, **338**, 1186-1191.

Bianchi, D. W., Farina, A., Weber, W., Delli-Bovi, L. C., Deriso, M., Williams, J. M. and Klinger, K. W. (2001). Significant fetal–maternal hemorrhage after termination of pregnancy: implications for development of fetal cell microchimerism. *Am J Obstet Gynecol*, **184**,703–706.

Bianchi, D. W., Williams, J. M., Sullivan, L. M., Hanson, F. W., Klinger, K. W. and Shuber, A. P. (1997). PCR quantification of fetal cell in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am. J. Hum. Genet.*, **61**, 822-829.

Bianchi, D.W., Zickwolf, G.K., Weil, G.J., Sylvester, S. and DeMaria, M.A. (1996). Male fetal progenitor cells persist in Materna blood for as long as 27 years postparum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 705-708.

Bonney, E. A., Matzinger, P. (1997). The maternal immune systems interaction with circulating fetal cells. *J Immunol*, **158**, 40-47.

Chosidow, O., Bagot, M., Vernant, J-P., et al. (1992). Sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *J Am Acad Dermatol*, **26**,49– 55.

Claman, H. N., Jaffee, B. D., Huff, J. C., Clark, R. A. F. (1985). Chronic graft versus host disease as a model for scleroderma. Mast cell depletion with deposition of immunoglobulins in the skin and fibrosis. *Cell Immunol*, **94**, 73– 84.

Claman, H. N. (1990). Graft-versus-host disease and animal models for scleroderma. *Curr Opin Rheumatol*, **2**, 929–931.

De Moor, G., De Brock, G., Noens, L. and De Bie, S. (1988). A new case of human chimerism detected after pregnancy: 46,XY karyotype in the lymphocytes of woman. *Acta Clin. Belg.* **43**, 231-235.

Evans, P. C., Lambert, N., Maloney, S., Furst, D. E., Moore, J. M. and Nelson, J. L. (1999). Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and with scleroderma. *Blood*, **93**, 2033-2037.

Fanning, P. A., Jonsson, J. R., Clouston, A. D., Edwards-Smith, C., Balderson, G. A., Macdonald, G. A., Crawford, D. H., Kerlin, P., Powell, L. W. and Powell, E. E. (2000). Detection of male DNA in the liver of female patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*, **33**, 690–695.

Gannage, M., Amoura, Z., Lantz, O., Peitte, J. C. and Caillat-Zucman, S. (2002). Feto-maternal microchimerism in connective tissue diseases. *Eur J Immunol*, **32**, 3405–3413.

Flegr, J. (2005). *Evoluční biologie*. Vydala Academia, nakladatelství Akademie věd České republiky, 1. vydání.

Holzgreve, W., Gheezi, E., DiNaro, E., Ganshirt, D., Maymon, E. and Hahn, S. (1998). Fetomaternal cell traffic is disturbed in preeclampsia. *Obstet Gynecol*, **91**, 669–672.

Hořejší, V., Bartůňková J. (2005). *Základy imunologie*. Nakladatelství TRITON, 3. vydání.

Chase, W. (1946). Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of sensitizing agent. *Proc Soc Exp Biol Med*, **61**, 257-259.

Chen J., Sanberg P.R., Li Y. et al. (2001). Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke*, **32**,2682–2688.

Invernizzi, P., DeAndreis, C., Sirchia, S. M., Battezzati, P. M., Zuin, M., Rosella, F., Perego, F., Bignotto, M., Simoni, G. and Podda, M. (2000). Blood fetal microchimerism in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol*, **122**, 418–422.

Jiang, S-P., Vacchio, M. S. (1998). Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal „allograft“. *J Immunol*, **160**, 3086-3090.

Johnson, K. L., Bianchi, D. W. (2004). Fetal cells in maternal tissue following pregnancy: What are the consequences? *Human Reproduction Update*, **10(6)**, 497-502.

Johnson, K. L., Mc Alindon, T. E., Mulcahy, E. and Bianchi, D.W. (2001). Microchimerism in female patient with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, **44**, 2107-2111.

Johnson, K. L., Nelson, J. L., Furst, D. E., McSweeney, P. A., Roberts, D. J., Zhen, D. K. and Bianchi D. W. (2001). Fetal cell microchimerism in tissue from multiple sites in women with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, **44**, 1848–1854.

Johnson, K. L., Samura, O., Nelson, J. L., McDonnell, M. and 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.

Khosrotehrani, K., Bianchi, D. W. (2005). Multi-lineage potential of fetal cell in maternal tissue: a legacy in reverse. *Journal of Cell Science*, **118**, 1559-1563.

Khosrotehrani, K., Johnson, K. L., Cha, D. H., Salomon, R. N., Bianchi, D. W. (2003). Pregnancy-associated fetal progenitor/stem cells differentiate into various epithelial tissues in maternal organs. *AM J Hum Genet*, **73**, 622.

Klintschar, M., Schwaiger, P., Mannweiler, S., Regauer, S. and Kleiber, M. (2001). Evidence of fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 2494–2498.

Komlos, L., Livni, E., Klein, T., et al. (1993). Mode of inheritance of HLA haplotypes locus A, B in siblings of different sexes. *Am J Reprod Immunol*, **29**, 224-230. Citováno podle Artlett et al., (2005).

Lambert, C. N., Erickson T. D., Zhen Yan, Pang, J. M., Guthrie, K. A., Furst, D. E. and Nelson, J. L. (2004). Quantification of Maternal Microchimerism by HLA-Specific Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, **50(3)**, 906–914.

Leung, T. N., Zhang, J., Lau, T. K., Hjelm, N. H., Lo, Y. M. D. (1998). Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet*, **352**, 1904–1905.

Leung, T. N., Zhang, J., Lau, T. K., Chan, L. Y., Lo, Y. M. D. (2001). Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem*, **47**, 137–139.

Liégeois, A., Escourrou, J., Kufre, E. and Charreire, J. (1997). Microchimerism: a stable state of low-ratio proliferation of allogeneic bone marrow. *Transplant. Proc.* **9**, 273-276.

Lo, E.S.F., Lo, Y.M., Hjelm, N.M. and Thilaganathan, B. (1998) Transfer of nucleated maternal cells into fetal circulation during the second trimester of pregnancy /letter/. *Br. J. Haematol.* **100**, 605-606.

Lo, Y. M. D., Leung, T. N., Tein, M. S. C. , et al. (1999) Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem*, **45**, 184–188.

Lu D., Sanberg PR, Mahmood A et al. (2002). Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury. *Cell Transplant*, **11**, 275–281.

Macků, F., Macků, J. (1998). Průvodce těhotenstvím a porodem. Nakladatelství Grada Publishing, s. r. o. 1. vydání.

Mincheva-Nilsson, L., Nagaeva, O., Chen, T., Stendahl, U., Antsiferova, J., Mogren, I., Hernestal, J., Baranov, V. (2006). Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *J immunol*, **176(6)**, 3585-3592.

Nelson, J. L. (1996). Viewpoint. Maternal-fetal immunology and autoimmune disease: is some autoimmune disease auto-alloimmune or alloautoimmune? *Arthritis Rheum*, **39**, 191–194.

Nelson, J. L. (2003) Microchimerism in human health and disease. *Autoimmunity*, **36**, 5-9.

Nelson, J. L., Furst, D. E., Maloney, S., Gooley, T., Evans, P. C., Smith, A., Bean, M. A., Ober, C. and Bianchi, D. W. (1998) “Microchimerism and

HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma”, *Lancet*, **351**, 559–562.

O'Donoghue, K., Chan, J., de la Fuente, J., Kennea, N., Sandison, A., Anderson, J. R., Roberts, I., Fisk, N. M. (2004). Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy. *Lancet* 2004, **364**, 179-182.

Pearson, H. (2002). Dual identities. *Nature*, **417**, 10-11. Citováno podle Flegr, (2005).

Reischig, J., Hořínek, A., Korabečná, M., Křížková, V. (2005). Plod „opravuje“ matčino tělo. *Vesmír*, **84**, 264.

Rinkevich, B. (2000). A critical approach to the definition of Darwinian units of selection. *Biol. Bull.*, **199**, 231-240.

Senturk, L. M., Arici, A. (1998). Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Reprod. Immunol.*, **39**, 144-151.

Schoniger-Hekele, M., Muller, C., Ackermann, J., Drach, J., Wrba, F., Penner, E. and Ferenci, P. (2002). Lack of evidence for involvement of fetal microchimerism in pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci*, **47**, 1909–1914.

Srivatsa, B., Srivatsa, S., Johnson, K. L., Samura, O., Lee, S. L. and Bianchi D. W. (2001). Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case–control study. *Lancet*, **358**, 2034–2038.

Starzl, T. E., Demertis, A. J., Murase, N., Trucco, M., Thomson, A. W., Rao, A. S. (1996). The lost chord: Microchimerism and allograft survival. *Immunol Today*, **17**, 577-584.

Strobel, S. L., Brandt, J. T. (1985). Abnormal hematologic features in a live-born female infant with triploidy. *Arch Pathol Lab Med*, **109**, 775–777.

Tanaka, A., Lindor, K., Ansari, A. and Gershwin E. M. (2000). Fetal microchimerism in the mother: immunologic implications. *Liver Transplantation*, **6(2)**, 138-143.

Theillin, O., Coumans, B., Zorzi, W., About, A., Heijnen, E. (2000). Tolerance to the foeto-placental ‘graft’: ten wals to support a child for nine month. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 731-737.

van Dijk, B. A., Boomsma D. I., de Man, A. J. (1996). Blood group chimerism in human multiple birth is not rare. *Am J Med Genet*, **61**, 264-268.

Xiao-Wei Tan, Hong Liao, Li Sun, Masaru Okabe, Zhi-Cheng Xiao and Gavin S. Dawe (2005). Progenitor or Stem Cells Able to Cross the Blood–Brain Barrier? Fetal Microchimerism in the Maternal Mouse Brain: A Novel Population of Fetal. *Stem Cells*, **23**, 1443-1452.

Yu Wang, Hirotsugu Iwatani, Takahito Ito, Naoko Horimoto, Masaya Yamato, Isao Matsui, Enyu Omak, Masatsugu Hori (2004). Fetal cells in mother rats contribute to the remodeling of liver and kidney after injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **325**, 961-967.

Zhong, X. Y., Burk, M. R., Troeger, C., Jackson, L. R., Holzgreve, W., Hahn, S. (2000). Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat Diagn*, **20**, 795–798.

Zhong, X. Y., Holzgreve, W., Hahn, S. (2001). Circulatory fetal and maternal DNA in pregnancies at risk and those affected by preeclampsia. *Ann NY Acad Sci*, **945**, 138–140.