

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie se zaměřením na vzdělávání – Biologie se zaměřením na vzdělávání



Anna-Marie Šůchová

Vliv fetálního mikrochimérismu na karcinom prsu u matek

The influence of fetal microchimerism on breast carcinoma in mothers

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Ilona Hromadníková, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 05.05.2018

Podpis:

ABSTRAKT

Fetální mikrochimérismus je stav, kdy jsou v těle matky přítomny buňky plodu, které tam jsou přenášeny během těhotenství a mohou v něm přetrvávat i několik dekád po porodu. Jejich přítomnost má vliv na imunitní systém matky, který se zkoumá jak u autoimunitních tak u nádorových onemocnění. Tato práce, jakožto literární přehled, shrnuje dosavadní poznatky o vlivu fetálního mikrochimérismu na karcinom prsu u matek, který patří mezi jedno z nejčastějších nádorových onemocnění žen po celém světě. Opírá se o studie, které zkoumaly výskyt buněk plodu v periferní krvi a v neoplastické tkáni matky. Zatímco korelace mezi výskytem buněk plodu v periferní krvi a karcinomem prsu naznačují možnou protektivní roli, výsledky prací zkoumající stejnou korelaci u neoplastické tkáně tak jednoznačné nejsou. Některé z nich naznačují roli protektivní, jiné zase naopak roli negativní.

Klíčová slova – fetální mikrochimérismus, karcinom prsu, patogeneze, onkologie, nádor

ABSTRACT

Fetal microchimerism is a condition where fetal cells are present in the body of the mother, they are transmitted during pregnancy and may persist for several decades after parturition. Their presence affects the immune system of the mother, which is investigated in both autoimmune and tumor diseases. This work, as a literature review, summarizes the current knowledge of the effect of fetal microchimerism on breast carcinomas in mothers, which is one of the most common cancer in women worldwide. It is based on studies that examined the presence of fetal cells in peripheral blood and neoplastic maternal tissues. While the correlation between the presence of fetal microchimerism in peripheral blood and breast cancer suggests a possible protective role, the data on the investigation of the same correlation in neoplastic tissue are not so unambiguous. Some of them suggest a protective role, others have a negative role.

Key words – fetal microchimerism, breast carcinoma, pathogenesis, oncology, tumor

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APC – antigen-prezentující buňky

BRCA 1 – gen karcinomu prsu 1

BRCA 2 – gen karcinomu prsu 2

CD34 – diferenciační antigen 34

CD45 – diferenciační antigen 45

CK – cytokeratin

Cy3 – kyanin 3

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DYS14 – DNA segment na chromozomu Y 14

ER – estrogenový receptor

EGF – epidermální růstový faktor

PR – progesteronový receptor

HER2 – lidský receptor epidermálního růstového faktoru 2

FITC – fluorescein isothiokyanát

FISH – fluorescenční in situ hybridizace

FM – fetální mikrochimérismus

FMC – buňky fetálního mikrochimérismu

HLA – hlavní lidský antigen

H-Ras – Harvey Ras gen

ICD-10 – Mezinárodní statistická klasifikace nemocí a souvisejících zdravotních problémů
10. vydání

I-FISH – kombinace FISH a imunohistologických metod

KIR – inhibiční receptor NK buněk

MHC – hlavní histokompatibilní komplex

MMTV – nádorový prsní virus myši

NK – přirození zabíječi

NRBC – jaderné erytroblasty

PABC – s těhotenstvím asociovaný karcinom prsu

PCR – polymerázová řetězová reakce

TC – cytotoxické T lymfocyty

T_{reg} – regulační T lymfocyty

Tg – thyroglobulin

TSPY – gen kódující testes specifický protein

Taq polymeráza – enzym bakterie *Thermus aquaticus*

VEGFR2 – receptor vaskulárního endotelového růstového faktoru

VWF – Von-Willebrandův faktor

ssDNA – jednořetězcová DNA

SRY – oblast určující pohlaví na chromozomu Y

α SMA – alfa aktin hladkého svalstva

OBSAH

1. Úvod	1
2. Karcinom prsu	1
3. Fetální mikrochimérismus	2
3.1. Metody zkoumání FM	4
3.1.1. PCR	5
3.1.2. FISH	6
3.2. Výskyt FMC v periferní krvi	7
3.3. Výskyt FMC v neoplastické či zdravé tkáni	9
4. Diskuze a závěr	12
5. Přílohy	15
6. Použitá literatura	16
6.1. Online zdroje	21

1. ÚVOD

Mikrochimérismus je přítomnost dvou a více geneticky odlišných populací buněk odvozených z různých zdrojů v jednom orgánu nebo jednotlivci (Liégeois et al. 1977). U lidí vzniká například při krevních transfúzích, transplantacích orgánů, nebo během těhotenství. Termín feto-maternální mikrochimérismus pak specifikuje mikrochimérismus, který vzniká během těhotenství a to transplacentárním přenosem buněk plodu do cirkulace matky, který je označován jako fetální mikrochimérismus (Bianchi 1998), přenosem buněk matky do fetální cirkulace, což je označováno jako maternální mikrochimérismus a přenosem fetálních buněk u vícečetného těhotenství, přičemž je více buněk přeneseno z plodu do těla matky než naopak (Lo et al. 2000). Buňky plodu mohou v krevním oběhu nebo orgánech matky přetrvávat roky, dokonce dekády po těhotenství (Bianchi et al. 1996). Fetální buňky se vyskytují i v těle žen, které prodělaly potrat, a to jak přirozený, tak uměle vyvolaný (Peterson et al. 2012).

Imunologické dopady jejich přítomnosti v těle matky dokládá mnoho prací. Zabývají se rolí fetálního mikrochimérismu v patogenezi autoimunitních onemocněních a ostatních patologií. Velká část studií se věnuje zejména vlivu buněk plodu na vývoj nádorových onemocnění žen, které prodělaly těhotenství. Některé implikují jejich protektivní roli, jiné naopak naznačují možnost, že fetální buňky přispívají k rozvoji nádorů. Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o vlivu fetálního mikrochimérismu na výskyt karcinomu prsu u matek.

2. KARCINOM PRSU

Karcinom prsu je maligní nádorové onemocnění prsu a patří mezi nejčastější typy nádorů u žen. Podle celosvětových dat má karcinom prsu nejvíce diagnostikovaných případů. Zároveň je na druhém místě, v míře úmrtnosti na nádorová onemocnění u žen. Vůbec nejzhoubnější je karcinom plic (Ferlay et al. 2015). Karcinom prsu zároveň patří spolu s karcinomem děložního čípku mezi nejčastěji diagnostikované nádorové onemocnění během těhotenství (Barnes and Newman 2007). Přesný mechanismus patogeneze karcinomu prsu zatím není zcela známý, nicméně mezi rizikové faktory patří například ženské pohlaví, vyšší věk, karcinom prsu v rodinné anamnéze, začátek menstruace v nízkém věku, pozdní menopauza, vysoký věk při prvním těhotenství, dlouhodobé užívání hormonální substituční terapie, léčebné ozařování hrudního koše, benigní proliferativní onemocnění prsní tkáně, zvýšená hustota prsní tkáně a genetická mutace v genech BRCA 1 a BRCA 2 (Colditz and Bohlke 2014). Studie Lambeho a

kolektivu, která porovnávala případy 12 666 pacientek s karcinomem prsu s 62 121 zdravými kontrolami, ukázala, že po porodu sice dochází k přechodnému zvýšenému riziku vývoje karcinomu prsu. To trvá po dobu až 15ti let – nicméně poté je riziko u žen, které porodily, oproti ženám bez potomka, nižší (Lambe et al. 1994). Jiné studie navíc ukázaly, že porod může mít jakožto reproduktivní faktor silný pozitivní vliv na přežití v případě diagnostikovaného karcinomu prsu, což je dáno zvýšeným výskytem endogenních hormonů spojených s těhotenstvím (Rosenberg et al. 2004, Olson et al. 1998, Anderson et al. 2004). Korelaci mezi počtem porodů a šancí na přežití v případě diagnostikovaného karcinomu prsu zkoumala i práce amerických autorů (Warren Andersen et al. 2011), přičemž autoři na 22 302 účastnících ukázali, že vyšší počet porodů souvisí se sníženým rizikem úmrtí na nádorové onemocnění prsu.

3. FETÁLNÍ MIKROCHIMÉRISMUS

Fetální mikrochimérismus je termín označující přítomnost buněk plodu v těle matky, tedy přítomnost geneticky odlišné řady buněk. Příčiny vzniku tohoto biologického fenoménu nejsou zatím stoprocentně jasné, nicméně pravděpodobná je teorie, že k přenosu buněk z plodu do těla matky dochází kvůli imunizaci matky, tedy aby imunitní systém matky nezačal proti plodu aloimunitní reakci. Přesný proces, kterým je zajištěna tolerance imunitního systému matky vůči plodu, ale není zcela objasněn. Možný mechanismus navrhli Adams a kol. (Adams et al. 2007). Podle nich dojde nejprve k uvolnění apoptických tělísek syncytiotrofoblastu, které obsahují fetální HLA II. třídy, do krevní cirkulace matky – odtud jsou následně fagocytovány mateřskými dendritickými buňkami, které pak na svém povrchu prezentují peptidy plodu a ty poté interagují s cytotoxickými T lymfocyty (TC). To může vyvolat periferní toleranci skrz indukci regulačních T lymfocytů (T_{reg}), anergii nebo snížení množství TC.

K přenosu fetálních mikrochimerických buněk (FMC) do těla matky dochází od počátku těhotenství. V krvi matky mohou být detekovány už v sedmém týdnu (Ariga et al. 2001), přičemž jejich množství v krevním řečišti a tkáních matky postupně narůstá až do porodu (Khosrotehrani et al. 2005, Rijnink et al. 2015). Po něm je většina fetálních buněk z krevního řečiště matky odstraněna působením imunitního systému, který aktivuje jejich apoptózu (Kolialexi et al. 2004). I přes tuto činnost imunitního systému je ale přetrvávání FMC v krevním oběhu nebo tkáních matky po porodu mezi savci běžné (Khosrotehrani et al. 2005, Jimenez et al. 2005, Axiak-Bechtel et al. 2013, Bianchi et al. 1996).

Předpokládá se, že fetální buňky, které jsou přenášeny do těla matky, jsou převážně hematopoetického původu a to například jaderné erytroblasty (NRBC), lymfocyty nebo hematopoetické kmenové buňky (Osada et al. 2001, Bianchi 1999). Rozpoznány byly také trofoblasty a mesenchymální kmenové buňky (van Wijk et al. 1996, O'Donoghue et al. 2003). Autoři Khosrotehrani, Johnson, Cha, Salomon a Bianchi ve své práci navíc demonstrovali, že některé FMC prezentují markery leukocytů, epiteliálních buněk a hepatocytů, což naznačuje jejich možnou schopnost diferenciaci v různé buněčné typy (Khosrotehrani et al. 2004).

Současné práce předpokládají tři možné role fetálních buněk v těle matky. Některé navrhuji jejich možnou negativní roli, která přispívá k zánětlivé odpovědi a tím k poškození mateřské tkáně, jiné navrhuji naopak protektivní roli skrze fetální progenitorové buňky, které opravují případná poškození mateřské tkáně. Třetí hypotézou je pak to, že FMC v těle matky existují bez vlivu na zdraví matky (Kinder et al. 2017). O možné pozitivní roli FMC svědčí například studie, která dokazuje, že během těhotenství dochází k zlepšení prognózy některých autoimunitních onemocnění, jako je roztroušená skleróza nebo revmatoidní artritida (Confavreux et al. 1998, Ostensen and Villiger 2007). Přičemž tyto účinky jsou nejvýraznější během posledního trimestru těhotenství, tedy v době, kdy jsou koncentrace FMC v těle matky nejvyšší (Confavreux et al. 1998, Ariga et al. 2001, Straub, Buttgereit and Cutolo 2005, Patas et al. 2013). Korelace naznačující možné negativní účinky lze naopak pozorovat u autoimunitních onemocnění postihujících štítnou žlázu, jako je Hashimotova tyreoiditida nebo Graves-Basedowova choroba. Přítomnost FMC byla častěji detekována v krvi a tkáni štítné žlázy právě u žen s autoimunitními onemocněními v porovnání se zdravými kontrolami (Klintschar et al. 2006, Renné et al. 2004, Lepez et al. 2011, Greer et al. 2011, Ando et al. 2002). Rozporuplné závěry přináší i řada prací zkoumajících vliv přítomnosti FMC na nádorová onemocnění u matek. A to zejména v závislosti na typu nádoru. Například jedna z prvních prací, zkoumající korelaci mezi neoplastickou tkání a výskytem FMC, se zaměřila na karcinom děložního čípku a ukázala, že přítomnost fetálních buněk může implikovat vyšší riziko karcinomu děložního čípku (Cha et al. 2003). Naopak výsledky několika prací, které zkoumaly tutéž korelaci pro papilární karcinom štítné žlázy, naznačily možnou protektivní roli FMC (Cirello et al. 2008, Cirello et al. 2010, Cirello and Fugazzola 2014, Cirello et al. 2015).

Jakým mechanismem by ale fetální buňky měly interagovat s nádorovou tkání, ať už v pozitivním či negativním smyslu, není zcela jasné. Mezi teorie patří to, že pozitivní účinky FMC jsou dány jejich přímým bojem proti nádorovým buňkám a následnou reparací poškozené mateřské tkáně. Jejich možnou přímou interakci s nádorovými buňkami naznačují výsledky

práce O'Donoghuea a kolektivu (O'Donoghue et al. 2008). Autoři pomocí metody fluorescenční in situ hybridizace (FISH) identifikovali fetální buňky shlukující se v klastrech kolem nádorové tkáně v plicích. Možnost, že FMC reparují poškozené tkáně, podpořila i práce, která ukázala na jejich možnou schopnost diferencovat se v různé buněčné typy podle tkáně, ve které jsou lokalizovány (Khosrotehrani et al. 2004). Tři možné mechanismy protektivní role fetálních buněk v interakci s nádorovými buňkami popisuje i Gadi (Gadi 2009). Jako první uvádí možnost, že by FMC mohly sloužit jako efektory imunitního systému, tedy že by TC fetálního původu přímo napadaly maligní buňky a buňky prezentující nádorové antigeny. Druhou možností by podle něj mohlo být, že antigen-prezentující buňky (APC) fetálního původu prezentují nádorové antigeny a připravují tak efektory mateřského imunitního systému. V rámci třetí možnosti by pak přirození zabíječi (NK) fetálního původu iniciovaly cytotoxickou reakci vůči nádorovým buňkám a to díky inhibičním receptorům NK buněk (KIR) na svém povrchu, které nejsou schopny vázat ligandy mateřského původu a nedochází tak k inhibici NK buněk. FMC by tedy mohly reagovat proti maligní a geneticky odlišné mateřské tkáni a protekce je tak založena na takzvaném graft-versus-tumor efektu. Výsledky práce Jolise a kolektivu, který testoval přítomnost mužské DNA u 245 vzorků různých typů nádorové tkáně žen a detekoval FMC pouze u 4,9 % případů (tedy u 12 vzorků) naznačují, že mechanismus, kterým by FMC mohly poskytovat ochranu proti karcinomu, je zřejmě ještě jiný (Jolis et al. 2017). Autoři práce navrhovali dvě možnosti – první, že FMC na nádorové buňky pouze dohlíží a v případě nutnosti povolávají složky imunitního systému. Druhou možností by pak bylo, že down-regulace imunitního systému vyvolaná přítomností fetálních buněk v konečném důsledku vede k prevenci proti rozvoji karcinomu – a to proto, že ženy, u kterých jsou FMC přítomné, mají nižší koncentrace mediátorů zánětu, které za normálních okolností mohou vést k vývoji neoplastické tkáně (Coussens and Werb 2002).

3.1. METODY ZKOUMÁNÍ FM

Pro detekci fetálních buněk v těle matky se využívá dvou základních metod, polymerázové řetězové reakce (PCR) a FISH, přičemž obě detekují FMC skrz detekci sekvencí přítomných na chromozomu Y v těle matky. Předpokládá se přitom, že přítomnost sekvencí přítomných na chromozomu Y je v těle matky odvozena od předchozího těhotenství s plodem mužského pohlaví. Metoda FISH bývá navíc někdy zkombinována s imunohistologickými metodami, které pomocí barvení určitých markerů odhalují typ buněk.

3.1.1. PCR

Metodu PCR, tedy takzvanou polymerázovou řetězovou reakci umožňující vytvořit neomezený počet kopií DNA nebo jejich fragmentů, představil Kary Mullis v roce 1983 (Mullis 1990). Pro její provedení je potřeba templát DNA, primery, nukleotidy a DNA polymeráza jakožto klíčový enzym, který váže jednotlivé nukleotidy k sobě a vytváří tak kopii DNA. Jako nukleotidy se využívají čtyři báze a to adenin, thymin, cytosin a guanin, tedy nukleotidy, které se vyskytují v dvoušroubovici DNA. Jako primery jsou využity krátké úseky DNA komplementární k fragmentům, které mají být pomocí PCR amplifikovány. Slouží jako počáteční bod, na kterém DNA polymeráza startuje svou aktivitu. Templát DNA, primery, nukleotidy a DNA polymeráza jsou smíchány dohromady a poté vloženy do přístroje, který cyklicky zvyšuje a snižuje teplotu a umožňuje tak polymerační reakci DNA. Teplota je nejprve zvýšena natolik, že dojde k rozdělení dvoušroubovice DNA na dvě komplementární vlákna ssDNA. Poté se teplota opět sníží, aby se primery mohly navázat na specifickou část DNA, ke které jsou komplementární. V posledním kroku je teplota opět zvýšena a DNA polymeráza začíná prodlužovat primery přidáváním nukleotidů a vzniká tak nové vlákno ssDNA. Při každém zopakování tří zmíněných teplotních cyklů se počet kopií DNA zdvojnásobí. Produkt PCR se dá vizualizovat pomocí barvení chemickými barvami, jejichž molekuly se interkalují mezi řetězce dvoušroubovice DNA nebo pomocí označení primerů a / nebo nukleotidů fluorescenčními barvivy před zahájením PCR. Pro samotnou analýzu se pak nejčastěji využívá elektroforéza na agarovém gelu, která umožňuje rozdělení DNA na základě náboje a velikosti (Garibyan and Avashia 2013).

Pro kvantitativní analýzu nukleových kyselin se pak využívá PCR v reálném čase (Heid et al. 1996). Přístup využívá dvojnásobně značené fluorogenní hybridizační sondy, přičemž první fluorescenční barvivo slouží jako informační, zatímco druhé se používá pro potlačení emisního spektra prvního barviva. Fluorescenční hybridizační sonda je pak během polymerační fáze PCR rozštěpena pomocí 5' nukleázové aktivity Taq polymerázy, což vede k zvýšení intenzity emisního spektra informačního barviva. To je při fluorescentní emisi při dané vlnové délce vizualizováno peakem. Metodu PCR v reálném čase použili autoři, kteří zkoumali, zda je vyšší výskyt fetálního mikrochimérismu u žen se sklerodermií oproti zdravým kontrolám dán volnou DNA, která se uvolnila při rozpadu postižené tkáně, nebo přítomností cirkulujících FMC (Lambert et al. 2002). Pro detekci mužské DNA použili DYS14, tedy sekvenci specifickou pro chromozom Y vyskytující se ve více kopiích. Předpokládali přitom, že mužská DNA je

odvozena od předchozího těhotenství s plodem mužského pohlaví. Jako první tak použili kvantitativní PCR v reálném čase pro detekci buněk fetálního mikrochimérismu.

3.1.2. FISH

Hybridizace in situ byla představena v roce 1969 jako metoda pro detekci nukleových kyselin v daném místě (Gall and Pardue 1969), autoři v práci detekovali DNA pomocí komplementární sekvence radioaktivně značených nukleotidů. Sondy značené fluorochromy byly pro snazší detekci nukleových kyselin zavedeny v roce 1986 (Pinkel, Straume and Gray 1986).

Metoda FISH využívá Watsonova a Crickova principu párování bází, přičemž sonda, která se pro detekci využívá, hybridizuje s cílovou sekvencí přímo v buňce. Sonda je označena buď přímo nebo nepřímo. Nepřímo značené nukleotidy jsou nukleotidy, ke kterým je připojena molekula, která může být detekována jinou molekulou (takzvanou sekundární molekulou) anebo protilátkou. Používají se zejména dva typy nepřímo značených nukleotidů, zaprvé nukleotidy značené biotinem, které jsou detekovány pomocí navázání avidinu konjugovaného s fluorochromem. Zadruhé se využívají nukleotidy nepřímo značené digoxigeninem, který je detekován pomocí anti-digoxigeninu s konjugovaným fluorochromem. Přímě značené nukleotidy mají naopak pomocí kovalentních interakcí přímo navázané fluorochromy. Takto značené nukleotidy se pak musí inkorporovat do dané DNA sondy, tedy sekvence, která se pak na základě komplementarity bází připojí k cílové sekvenci DNA, kterou chceme detekovat. Nukleotidy lze k sondě připojit například pomocí takzvané zlomové translace („nick translation“), tato metoda využívá enzymů DNÁza I a DNA polymeráza I. Nejprve pomocí DNÁzy I provede potřebný zlom v řetězci DNA sondy a poté pomocí exonukleázové aktivity DNA polymerázy I ve směru 5'–3' vystřihne část nukleotidů z řetězce DNA sondy a ty poté nahradí značenými nukleotidy pomocí polymerázové aktivity. K inkorporaci značených nukleotidů lze využít i metody zvané random primer labeling, ta využívá nespécifické primery, které jsou většinou dlouhé 6-9 nukleotidů, a které nasedají na ssDNA. Značené nukleotidy jsou následně vloženy mezi dva úseky nespécifických primerů pomocí polymerázové aktivity Klenowova fragmentu DNA polymerázy I. K vytvoření sondy se značenými nukleotidy lze využít také metody PCR, ta však na rozdíl od zlomové translace a metody „random primer labeling“ sondu DNA navíc amplifikuje. K vizualizaci takto detekovaných nukleových kyselin se pak využívá fluorescenčních mikroskopů (Nath and Johnson 1998).

Z hlediska detekce mikrochimérismu byla důležitá práce kolektivu autorů Johnson, Zhen a Bianchi (Johnson, Zhen and Bianchi 2000). Podařilo se jim vyvinout postup, který umožňuje provádět metodu FISH i v parafínem fixovaných vzorcích různých typů tkáně, a to specificky pro detekci mužské DNA. Metoda vizualizuje chromozomy Y, konkrétně sekvenci PHY10 zeleným fluorescentním signálem, na červeném pozadí sekvence DXZ1 na chromozomech X.

O tři roky později kolektiv autorů Johnson, Khosrotehrani, Stroh a Bianchi publikoval práci, ve které srovnávali jednotlivé postupy pro barvení preparátů za účelem detekce různých povrchových markerů na parafínem fixovaných vzorcích různých typů tkání (Khosrotehrani et al. 2003). V závěru představili postup, který kombinuje tradiční FISH metodu s imunoznačením, tedy postup, který umožňuje lokalizaci a zároveň rozpoznání typu chimérických buněk v různých typech tkáních. Jako markery použili CD34 pro hematopoetické prekurzory, CD45 pro leukocyty a cytokeratin AE1 a AE3 (CK) pro keratinocyty. Nejefektivnějším shledali imunoznačení pomocí peroxidázy po provedení FISH podle protokolu uvedeného v minulé práci autorů (Johnson et al. 2000).

3.2. VÝSKYT FMC V PERIFERNÍ KRVI

Několik prací zkoumalo výskyt FMC v periferní krvi u žen s diagnostikovaným karcinomem prsu (Eun et al. 2013, Gadi and Nelson 2007, Gadi et al. 2008, Kamper-Jørgensen et al. 2012). Zaměřily se na výskyt mužské DNA v periferní krvi pomocí kvantitativní PCR, detekující sekvenci DYS14 na chromozomu Y. Autoři předpokládali, že mužská DNA v krvi matky je odvozená od předchozího těhotenství s plodem mužského pohlaví.

První byla práce dvojice Gadi a Nelson (Gadi and Nelson 2007), testovali v ní hypotézu, zda alogenní FMC poskytují ochranu proti karcinomu prsu. Zkoumali vzorky periferní krve 82 žen, přičemž 35 z nich mělo diagnostikovaný karcinom prsu. DNA byla extrahována z mononukleárních buněk periferní krve. FMC byly detekovány pomocí kvantitativní PCR výrazněji častěji u zdravých žen než u žen s diagnostikovaným karcinomem. Ze 35 žen s karcinomem prsu byla mužská DNA nalezena v 5 vzorcích, což odpovídá 14 % případů. U zdravých žen pak byla mužská DNA nalezena ve 43 % případů – to znamená u 20 žen ze 47 testovaných. Autoři tato zjištění brali jako potvrzení formulované hypotézy.

Gadi a kolektiv o rok později publikovali rozšířenou studii (Gadi et al. 2008) testující stejnou hypotézu, znovu byly testovány vzorky periferní krve. Tentokrát od 99 žen (z toho 54 mělo diagnostikovaný karcinom prsu). DNA byla extrahována z takzvaného buffy coatu

periferní krve, tedy z krevní složky připravené odstředěním jednotky plné krve, která obsahuje významný podíl leukocytů a trombocytů. FMC byly i v této studii detekovány výrazně častěji u zdravých žen (celkem ve 25 případech ze 45, to znamená v 56 % případů) než u žen s diagnostikovaným karcinomě. Z 54 žen s karcinomě byla u 14 detekována přítomnost FMC, to znamená ve 26 % případů. Získaná data tak nejen znovu potvrdila hypotézu, že alogenní FMC v periferní krvi poskytují ochranu proti karcinomě prsu ale navíc naznačila, že u žen, u kterých se vyvine karcinom prsu, může docházet k selhání v procesu získávání a udržení si alogenních imunitních buněk přenášěných z plodu na matku během těhotenství.

Korelací výskytu FMC v periferní krvi s karcinomě prsu se zabývala i práce dánských autorů (Kamper-Jørgensen et al. 2012), která testovala hypotézu, zda je mikrochimérismus spojený se sníženým rizikem vývoje nádoru prsu. Aby určili, zda je možný pozitivní efekt specifický pro karcinom prsu, testovali také ženy, které měly diagnostikovaný kolorektální karcinom. Oproti předchozím pracím byla periferní žilní krev žen, zapojěných do výzkumu, odebrána několik let před diagnózou nádorového onemocnění. Byly zkoumány vzorky krve 428 žen, z toho bylo 272 zdravých kontrol, 89 žen mělo diagnostikovaný karcinom prsu a 67 žen kolorektální karcinom. DNA byla extrahována z buffy coatu vzorků periferní krve a pomocí kvantitativní PCR byl každý vzorek testován na přítomnost DYS14 sekvence. Přítomnost mužské DNA byla potvrzena u 36 žen s diagnostikovaným karcinomě prsu, tedy u 40,4 % vzorků, u 60 žen s diagnostikovaným kolorektálním karcinomě, což odpovídá 89,6 % a v neposlední řadě u 190 zdravých žen, tedy u 69,9 %. Další analýza výsledků ukázala, že přítomnost FMC snižuje pravděpodobnost vývoje karcinomě prsu (při započítání faktorů věku, užívání antikoncepce a substituční hormonální terapie) o 70 % a naopak čtyřnásobně zvyšuje pravděpodobnost vývoje kolorektálního karcinomě (adjustováno pouze na věk žen).

K výsledkům práce se Kamper-Jørgensen vrátil, aby zjistil, zda má přítomnost FMC vliv na přežití u pacientek s karcinomě prsu a kolorektálním karcinomě (Kamper-Jørgensen 2012). Dohledal proto osudy žen z původní studie, které měly diagnostikované nádorové onemocnění, a to od okamžiku diagnózy po čas úmrtí, odstěhování se, anebo do okamžiku, kdy přestaly docházet k lékaři. Jejich osud před vyhodnocením studie sledoval po dobu 13,5 let od první diagnózy karcinomě. Příčiny úmrtí rozdělil podle desátého vydání Klasifikace nemocí (*ICD-10 Version:2010* [online]. 2010), přičemž úmrtí spojená se zhoubným nádorem prsu nebo konečniku byla považovány za události. Z 89 žen, které měly diagnostikovaný karcinom prsu jich 8 zemřelo v důsledku onemocnění a 3 z jiných důvodů. U 75 % z žen, které zemřely na karcinom prsu (tedy u 6 z 8), nebyly podle předchozí studie (Kamper-Jørgensen et al. 2012)

nalezeny FMC v periferní krvi, zbylých 25 % žen (tedy 2 z 8) mělo ve vzorcích mužskou DNA přítomnou. Z 67 žen s diagnostickým kolorektálním karcinomem jich na následky nemoci zemřelo 22, u 9 žen byla příčina úmrtí jiná. U 20 z 22 žen, které zemřely v souvislosti s kolorektálním karcinomem, byla potvrzena přítomnost FMC v periferní krvi, šlo tedy o 90,0 % případů (zbylých 9,1 %, tedy 2 ženy byly na přítomnost mužské DNA negativní). Ačkoliv se jedná o nízký počet zkoumaných žen (a tedy statisticky nevýznamné výsledky), lze pozorovat, že přítomnost FMC v periferní krvi může být u karcinomu prsu spojená s větší šancí na přežití.

Protektivní roli FMC naznačují také výsledky práce Jinnyho Euna a jeho týmu (Eun et al. 2013). Z jejich práce navíc vyplývá, že absence FMC je pravděpodobněji predispozicí než důsledkem rozvoje karcinomu prsu. Studie se zúčastnilo celkem 177 žen, přičemž 89 z nich prodělalo karcinom prsu in situ. FMC byly opět potvrzeny pomocí PCR detekující sekvence DYS14 ve vzorcích buffy coatu z periferní krve, a to u 75 zdravých žen, což odpovídá 85 % a u 57 pacientek s karcinomem prsu in situ, tedy u 64 % vzorků.

Všechny zmíněné práce tedy podporují hypotézu, že buňky fetálního mikrochimérismu v periferní krvi mohou mít protektivní charakter proti karcinomu prsu. Žádná z nich ale neobjasňuje, jakým molekulárním mechanismem by tato protektivní role FMC měla být zajištěna.

3.3. VÝSKYT FMC V NEOPLASTICKÉ ČI ZDRAVÉ TKÁNI

Korelaci výskytu FMC s karcinomem prsu zkoumalo několik autorů i na vzorcích odebraných ze zdravé či neoplastické tkáně (Nemescu et al. 2016, Gadi 2010, Dubernard et al. 2008, Dubernard et al. 2009, Dhimolea et al. 2013). Vzorky byly testovány na přítomnost mužské DNA pomocí PCR a pomocí FISH a kombinace FISH s imunohistologickými metodami (I-FISH), které byly zaměřeny na různé markery.

První práci publikoval spolu s kolektivem autorů Dubernard (Dubernard et al. 2008). Zkoumali, zda existuje nějaká interakce mezi typem nádoru, který se vyvíjí v prsní tkáni během těhotenství a FMC. Jejich přítomnost se proto snažili detekovat ve vzorcích neoplastické tkáně u 14 žen, z toho 10 žen mělo diagnostikovaný s těhotenstvím asociovaný karcinom prsu (PABC), neboli karcinom prsu, který vznikl během těhotenství nebo během prvního roku po porodu (Barnes and Newman 2007, Petrek 1994). Mužské fetální buňky byly detekovány pomocí metody FISH, přičemž chromozom X byl vizualizován červeně (pomocí Cy3) a

chromozom Y zeleně (pomocí FITC). Aby dokázali určit i druh FMC, využili kombinace metody FISH s imunohistologickým barvením, přičemž CD45 sloužil jako marker pro leukocyty, CD34 pro progenitorové endoteliální buňky, vimentin pro stromální buňky a CK AE1 a AE3 pro epiteliální buňky. FCM byly detekovány u 9 z 10 žen s PABC a naopak v žádném ze 4 kontrolních vzorků. Navíc byly lokalizovány přednostně ve stroma nádoru než ve zdravé tkáni, která nádor obklopovala. Pomocí I-FISH bylo navíc zjištěno, že se v nádoru objevují fetální buňky prezentující epiteliální, endoteliální i stromální markery. Přítomnost FMC ve stroma nádoru může podle autorů znamenat jejich negativní vliv na prognózu onemocnění.

Výsledky této práce se pokusil Dubernard se svým týmem zopakovat na myším modelu (Dubernard et al. 2009). Zkřížili proto MMTV-H-ras transgenní samici myši se samcem transgenním pro luciferázu kontrolovanou promotorem VEGFR2. Každá z 24 samic měla alespoň jednoho samčího potomka, ale jen u 10 z nich se vyvinuly nádory během 10 týdnů po spáření, přičemž v 9 případech šlo o nádor v prsní tkáni a desátý byl nádor slinné žlázy. Pro detekci FMC využili metodu FISH, chromozom Y byl vizualizován zeleně (pomocí FITC). Pro určení druhu fetálních buněk využili stejně jako v minulé práci metodu I-FISH. Jako marker pro epiteliální buňky sloužil CK AE1 a AE3, pro pericyty a myofibroblasty alfa aktin hladkého svalstva (α SMA), pro leukocyty CD45, pro endoteliální buňky Von-Willebrandův faktor (VWF) a pro stromální buňky vimentin. Nádory prsní tkáně byly rozděleny na nádory nižší (4 z 9) a vyšší třídy (5 z 9), což odpovídá gradingu u lidských karcinomů. Nádory nižší třídy se skládaly z buněk s malými jádry pravidelného tvaru a bohatou cytoplazmou, naopak nádory vysoké třídy měly vysokou jadernou hustotu a hrubý chromatin, časté mitózy a nekrózy. FMC byly detekovány ve všech devíti typech prsních nádorů a ve 2 z 8 kontrolních vzorků, extrahovaných z jater daných myší. Zároveň byly FMC mnohem častější v nádorech vyšší třídy než v nádorech nižší třídy. U 60 % zkoumaných FMC byl detekován cytokeratin naznačující epiteliální buňky, které navíc byly od ostatních fetálních buněk vždy izolovány. Naopak nebyly detekovány žádné leukocyty, pericyty ani endoteliální buňky. Výsledky jsou tak velmi podobné výsledkům předchozí práce autorů. Na jejich základě navíc formulovali hypotézu vysvětlující závěry práce Gadiho a Nelsona (Gadi and Nelson 2007). Podle Dubernarda by menší míra FMC v periferní krvi pacientek s diagnostikovaným karcinomem prsu mohla být důsledkem migrace fetálních buněk do stroma nádoru. Vyšší množství FMC v nádorech vyšší třídy by navíc podle autorů mohlo znamenat buď patologickou roli fetálních buněk nebo větší míru jejich migrace.

Gadi publikoval rok na to práci, ve které zkoumal vzorky prsní tkáně 19 zdravých žen a vzorky nezasažené tkáně 19 žen s karcinomem prsu (Gadi 2010). Přítomnost mužské DNA

určoval pomocí kvantitativní PCR pro sekvenci DYS14 na chromozomu Y. FMC byly častěji detekovány u zdravých žen než u těch s karcinomem prsu – respektive byla mužská DNA nalezena u 12 z 19 kontrol, což odpovídá 63 % a jen u 5 z 19 vzorků získaných od žen s nádorem prsu, tedy u 26 %. Podle autora tak výsledky svědčí o možné protektivní roli fetálních buněk. Zároveň ale nevylučuje možnost, že výsledky vypovídají spíše o tom, že se protektivní role FMC snižuje s věkem. Kontrolní skupina se totiž pohybovala ve věkovém rozmezí 21-45 let, zatímco skupina žen s karcinomem prsu byla ve věkovém rozmezí 38-78 let.

Podle práce Dhimolea a kolektivu má FMC v souvislosti s karcinomem prsu jak pozitivní tak negativní důsledky (Dhimolea et al. 2013). A to v závislosti na množství FMC, tedy na úrovni mikrochimérismu. Testovali přítomnost mužské DNA ve 182 fixovaných vzorcích prsní tkáně, z toho 68 pocházelo od zdravých žen a zbylých 114 od žen s diagnostikovaným nádorem. Pro detekci využili metody PCR a signál Y chromozomu zesílili pomocí TSPY genů. FMC byly detekovány u 56 % vzorků zdravých tkání, tedy u 38 z celkových 68 a u 21 % vzorků neoplastických tkání, tedy u 24 ze 114 testovaných žen. Vědci se snažili popsat vzorky neoplastické tkáně, u kterých byla detekována mužská DNA na molekulární úrovni za využití molekulárních markerů, jejichž role je v patologii nádoru zásadní. Bylo sice určeno, že exprese estrogenových (ER) a progesteronových receptorů (PR) byla u vzorků pozitivních na přítomnost FMC obvykle nízká, nicméně výsledky nebyly statisticky významné. Významné naopak bylo zvýšení HER2-pozitivity. Zatímco pouze 21 z 90 vzorků negativních na přítomnost chromozomu Y bylo HER2-pozitivních, ze vzorků, které obsahovaly FMC byla HER2-pozitivní polovina (tedy 12 z celkových 24 vzorků). Statistické vyhodnocení navíc ukázalo, že pravděpodobnost změny ze stavu nízké exprese HER2 do stavu nadměrné exprese HER2 je skoro pětinašobná v případě, že jsou v nádorové tkáni ve zvýšené míře integrovány mužské fetální buňky. Přítomnost FMC tedy může vést ke spuštění nadměrné exprese HER2 a jde tak o selektivní výhodu nádoru. Ligandy HER2, tedy epidermální růstové faktory, jsou zapojeny do kmenové diferenciaci buněk a tak by jedním z možných mechanismů interakce fetálních buněk s hostitelskou, tedy mateřskou tkání mohla být EGF dráha. Výsledky práce tedy naznačují, že velmi záleží na míře fetálního mikrochimérismu; příliš nízká i příliš vysoká koncentrace FMC může souviset s malignitami a zhoršovat prognózu nádorového onemocnění, ale při určité míře je přítomnost fetálních buněk spojena s ochranou proti karcinomu prsu. Absence a nízká míra FMC by tak mohly sloužit jako signál naznačující predispozici k vyvinutí karcinomu.

Cílem práce týmu Nemesca bylo specifikovat koncentraci a frekvenci FMC v neoplastické prsní tkáni (Nemesca et al. 2016). Celkem byly odebrány vzorky od 19 žen s diagnostikovaným karcinomem prsu a to tak, že každá žena poskytla tři vzorky, jeden pocházející ze stroma nádoru (core), jeden z periferní nádorové tkáně a jeden z přiléhající prsní tkáně nezasazené nádorem. Ze všech vzorků byla extrahována DNA, která poté byla pomocí kvantitativní PCR testována na přítomnost mužské DNA. Jako marker FMC posloužil SRY gen. 14 z 19 žen mělo alespoň jednoho syna, 3 neměly mužského potomka, ale prodělaly potrat a 2 nebyly podle lékařských záznamů nikdy těhotné. Ani u jedné z žen, které nebyly nikdy těhotné, nebyla detekována mužská DNA v žádném z poskytnutých vzorků. U žen bez mužského potomka byly FMC detekovány ve 2 ze 3 vzorků nádorové tkáně, v 1 vzorku periferní nádorové tkáně a v žádném ze vzorků odebraných z okolní tkáně nádoru. Koncentrace FMC ale byly nízké – a proto je bylo možné kvantifikovat jen u nádorové tkáně. U žen s alespoň jedním potomkem byly FMC detekovány ve 100 % vzorků nádorových a periferních tkání a u 64 % vzorků zdravé tkáně přilehlé k nádoru, tedy u 9 ze 14 vzorků. FMC byly pětkrát až šestkrát častější ve stroma nádorové tkáně než v periferních oblastech nádoru, v přilehlé zdravé tkáni byla jejich frekvence nízká. Velký rozdíl v detekci FMC v nádorové tkáni oproti výsledkům týmu Dhimolea (Dhimolea et al. 2013) vysvětlují autoři použitím nefixovaných preparátů čerstvé tkáně, která byla skladována při teplotě -80 ° Celsia . Výsledky práce popisují heterogenní distribuci FMC v prsní tkáni, přičemž jejich koncentrace klesají od stroma nádoru po zdravou prsní tkáň.

Zatímco při zkoumání vzorků periferní krve byly koncentrace FMC u žen s karcinomem prsu nižší v porovnání se zdravými kontrolami, práce, které zkoumaly jejich výskyt v neoplastické tkáni ukazovaly opačný trend.

4. DISKUZE A ZÁVĚR

Těhotenství má podle několika studií pozitivní vliv na prognózu karcinomu prsu (Rosenberg et al. 2004, Olson et al. 1998, Anderson et al. 2004) a zřejmě zvyšuje i šanci na přežití po diagnóze tohoto nádorového onemocnění (Warren Andersen et al. 2011). Možný pozitivní vliv těhotenství, který autoři navrhovali, by mohl být dán persistencí fetálních buněk v krvi a tkáních matky (Bianchi et al. 1996).

Všechny práce, zkoumající korelaci přítomnosti fetálních buněk v periferní krvi a výskytu karcinomu prsu, naznačují protektivní charakter (Eun et al. 2013, Gadi and Nelson 2007, Gadi et al. 2008, Kamper-Jørgensen et al. 2012). U všech totiž byla četnost FMC v periferní krvi

nižší u pacientek v porovnání se zdravými kontrolami. Pokud se však stejná korelace zkoumala na vzorcích neoplastické tkáně, ukázalo se, že četnost fetálních buněk je vyšší v neoplastických tkáních v porovnání se zdravou tkání, ať už v porovnávání pacientek se zdravými kontrolami nebo v porovnávání neoplastické a zdravé tkáně u pacientek s karcinomem prsu (Nemescu et al. 2016, Gadi 2010, Dubernard et al. 2008, Dubernard et al. 2009, Dhimolea et al. 2013). Z výsledků citovaných studií vyplývá jedna zásadní informace; v případě karcinomu prsu buňky plodu pravděpodobně aktivně migrují z periferní krve do nádorové tkáně (Dubernard et al. 2009), kde se navíc preferenčně usazují ve stroma nádoru (Dubernard et al. 2008) a jejich koncentrace klesají, čím více se blíží zdravé prsní tkáni (Nemescu et al. 2016).

Domnívám se ale, že není zodpovězena zásadní otázka, zda fetální buňky migrují do stroma nádoru před jeho vznikem nebo až v reakci na něj. První případ by totiž svědčil spíše o patologické roli FMC, druhý by naopak mohl znamenat jejich protektivní charakter a snahu o likvidaci nádorových buněk a následnou reparaci mateřské tkáně podobně, jako to popisovali autoři u jiných typů nádorových onemocnění (O'Donoghue et al. 2008, Khosrotehrani et al. 2004).

Záleží také na úrovni mikrochimérismu, neboť hyperchimérismus (příliš vysoká míra mikrochimérismu) může stejně jako hypochimérismus (nízká míra mikrochimérismu) souviset s negativním vlivem FMC a může tak podporovat vznik a zhoršovat prognózu karcinomu prsu (Dhimolea et al. 2013). Podobný závěr byl publikován i ve starší práci z roku 2008 (Gadi et al. 2008). Podle autorů může u žen s karcinomem prsu docházet k selhání v procesu získávání a udržování alogenních buněk plodu. Nízká koncentrace či úplná absence fetálních buněk by tak mohly indikovat predispozici k rozvoji maligního procesu. Míra mikrochimérismu by tedy mohla v budoucnu sloužit jako indikační faktor predispozice ke karcinomu prsu.

Ačkoliv se hypotetickou rolí fetálních buněk v patogenezi nádorových onemocnění zabývá řada prací, žádná nepřináší vysvětlení, jakým způsobem by FMC měly s nádorovými buňkami interagovat. Tým Jolise a kolektivu testoval přítomnost mužské DNA v různých typech karcinomů a navrhl dva možné mechanismy, kterými by buňky plodu mohly proti nádorovým onemocněním poskytovat ochranu (Jolis et al. 2017). Podle první varianty by FMC na nádorové buňky pouze dohlížely a v případě nutnosti by povolaly složky imunitního systému. Druhou variantou by pak bylo, že down-regulace imunitního systému vyvolaná přítomností fetálních buněk by v konečném důsledku mohla vést k prevenci proti nádorovým onemocněním – a to proto, že ženy, u kterých jsou FMC přítomné, produkují nižší koncentrace mediátorů zánětu,

kteřé za normálních okolností mohou vést k vývoji neoplastické tkáně (Coussens and Werb 2002).

Všechny studie kvůli snazší detekci mužské DNA zkoumaly pouze ženy po předchozím těhotenství s plody mužského pohlaví. Otázkou tedy je, zda by stejné korelace vykazovaly i případy žen po těhotenství s plodem ženského pohlaví. Tedy zda jsou tyto korelace dány přítomností fetálních buněk bez ohledu na pohlaví plodu. Dalším problémem je, že v případech, kdy autoři využili jen metody PCR (ať už pro detekci FM v periferní krvi nebo neoplastických tkáních), došlo pouze k detekci DNA, ta však může být volně cirkulující a její detekce tak nemusí ve všech případech znamenat výskyt fetálních buněk. Za nedostatek citovaných prací lze pokládat i předpoklad, že výskyt mužské DNA je spjat s těhotenstvím s plodem mužského pohlaví, to totiž nemusí být jediným zdrojem mužské genetické informace v těle ženy. Mužská DNA byla detekována i v těle žen, které podle lékařských záznamů nebyly těhotné s plodem mužského pohlaví (Yan et al. 2005). Samotné těhotenství s plodem mužského pohlaví navíc nemusí být kvůli spontánnímu potratu rozpoznáno a zaznamenáno v lékařských záznamech (Wang et al. 2003), což může ovlivňovat výsledky studovaných korelací.

Možným směrem pro přesnější poznání funkce FMC a jejich možných dopadů na zdraví matky by mohla být analýza jednotlivých buněk (Ståhlberg et al. 2017). Zkoumat by se také měly interakce buněk plodu s mateřskými buňkami v podmínkách in vitro, což by mohlo pomoci lepšímu nastavení experimentu pro in vivo podmínky.

Budoucí studie by se měly zaměřit na odhalení přesného molekulárního mechanismu interakce fetálních buněk s cirkulujícími nádorovými buňkami a potvrdit nebo vyvrátit jejich protektivní roli, kterou doposud publikované články naznačují.

5. PŘÍLOHY

Tabulka č. 1 – shrnutí výzkumů zabývajících se korelací výskytu FMC s karcinomem prsu

<i>Typ vzorku</i>	<i>subjekt</i>	<i>karcinom</i>	<i>N</i>	<i>metoda</i>	<i>marker</i>	<i>Lokalizace a/nebo hypotetická role fetálních buněk</i>	<i>reference</i>
<i>Periferní krev</i>	člověk	prsu	82	PCR	žádný	Ochrana proti karcinomu prsu	(Gadi and Nelson 2007)
<i>Periferní krev</i>	člověk	prsu	99	PCR	žádný	Ochrana proti karcinomu prsu	(Gadi et al. 2008)
<i>Neoplastická tkáň</i>	člověk	prsu	14	FISH, I-FISH	CD45, CD34, vimentin, CK	Zvýšený výskyt ve stroma nádoru oproti normální tkáni, možná patologická role	(Dubernard et al. 2008)
<i>Neoplastická tkáň</i>	myš	prsu	10	FISH, I-FISH	CD45, CK, vimentin, VWF, αSMA	Zvýšený výskyt fetálních buněk v nádorech vyšší třídy oproti nádorům nižší třídy, možná patologická role	(Dubernard et al. 2009)
<i>Normální tkáň</i>	člověk	prsu	38	PCR	žádný	Ochrana proti karcinomu prsu	(Gadi 2010)
<i>Periferní krev</i>	člověk	prsu, kolorektální	428	PCR	žádný	Snížené riziko vývoje karcinomu prsu, a naopak zvýšené riziko pro vývoj kolorektálního karcinomu	(Kamper-Jørgensen et al. 2012)
<i>Normální a neoplastická tkáň</i>	člověk	prsu	182	PCR	žádný	Protektivní nebo patologická role fetálních buněk v závislosti na míře mikrochimérismu	(Dhimolea et al. 2013)
<i>Periferní krev</i>	člověk	prsu in situ	177	PCR	žádný	Protektivní role fetálních buněk	(Eun et al. 2013)
<i>Neoplastická tkáň</i>	člověk	prsu	19	PCR	žádný	Snižující se koncentrace fetálních buněk od tumoru po normální prsní tkáň	(Nemescu et al. 2016)

Legenda: N – počet subjektů

6. POUŽITÁ LITERATURA

- Adams, K. M., Z. Yan, A. M. Stevens & J. L. Nelson (2007) The changing maternal "self" hypothesis: a mechanism for maternal tolerance of the fetus. *Placenta*, 28, 378-82.
- Anderson, P. R., A. L. Hanlon, G. M. Freedman & N. Nicolaou (2004) Parity confers better prognosis in older women with early-stage breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Clin Breast Cancer*, 5, 225-31.
- Ando, T., M. Imaizumi, P. N. Graves, P. Unger & T. F. Davies (2002) Intrathyroidal fetal microchimerism in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 3315-20.
- Ariga, H., H. Ohto, M. P. Busch, S. Imamura, R. Watson, W. Reed & T. H. Lee (2001) Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion*, 41, 1524-30.
- Axiak-Bechtel, S. M., S. R. Kumar, S. A. Hansen & J. N. Bryan (2013) Y-chromosome DNA is present in the blood of female dogs suggesting the presence of fetal microchimerism. *PLoS One*, 8, e68114.
- Barnes, D. M. & L. A. Newman (2007) Pregnancy-associated breast cancer: a literature review. *Surg Clin North Am*, 87, 417-30.
- Bianchi, D. W. (1998) Current knowledge about fetal blood cells in the maternal circulation. *J Perinat Med*, 26, 175-85.
- (1999) Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol*, 105, 574-83.
- Bianchi, D. W., G. K. Zickwolf, G. J. Weil, S. Sylvester & M. A. DeMaria (1996) Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 705-8.
- Cha, D., K. Khosrotehrani, Y. Kim, H. Stroh, D. W. Bianchi & K. L. Johnson (2003) Cervical cancer and microchimerism. *Obstet Gynecol*, 102, 774-81.
- Cirello, V., C. Colombo, M. Perrino, S. De Leo, M. Muzza, M. A. Maffini & L. Fugazzola (2015) Fetal cell microchimerism in papillary thyroid cancer: A role in the outcome of the disease. *Int J Cancer*, 137, 2989-93.
- Cirello, V. & L. Fugazzola (2014) Positive effect of fetal cell microchimerism on tumor presentation and outcome in papillary thyroid cancer. *Chimerism*, 5, 106-8.
- Cirello, V., M. Perrino, C. Colombo, M. Muzza, M. Filopanti, L. Vicentini, P. Beck-Peccoz & L. Fugazzola (2010) Fetal cell microchimerism in papillary thyroid cancer: studies in peripheral blood and tissues. *Int J Cancer*, 126, 2874-8.

- Cirello, V., M. P. Recalcati, M. Muzza, S. Rossi, M. Perrino, L. Vicentini, P. Beck-Peccoz, P. Finelli & L. Fugazzola (2008) Fetal cell microchimerism in papillary thyroid cancer: a possible role in tumor damage and tissue repair. *Cancer Res*, 68, 8482-8.
- Colditz, G. A. & K. Bohlke (2014) Priorities for the primary prevention of breast cancer. *CA Cancer J Clin*, 64, 186-94.
- Confavreux, C., M. Hutchinson, M. M. Hours, P. Cortinovis-Tourniaire & T. Moreau (1998) Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N Engl J Med*, 339, 285-91.
- Coussens, L. M. & Z. Werb (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-7.
- Dhimolea, E., V. Denes, M. Lakk, S. Al-Bazzaz, S. Aziz-Zaman, M. Pilichowska & P. Geck (2013) High male chimerism in the female breast shows quantitative links with cancer. *Int J Cancer*, 133, 835-42.
- Dubernard, G., S. Aractingi, M. Oster, R. Rouzier, M. C. Mathieu, S. Uzan & K. Khosrotehrani (2008) Breast cancer stroma frequently recruits fetal derived cells during pregnancy. *Breast Cancer Res*, 10, R14.
- Dubernard, G., M. Oster, F. Chareyre, M. Antoine, R. Rouzier, S. Uzan, S. Aractingi & K. Khosrotehrani (2009) Increased fetal cell microchimerism in high grade breast carcinomas occurring during pregnancy. *Int J Cancer*, 124, 1054-9.
- Eun, J. K., K. A. Guthrie, G. Zirpoli & V. K. Gadi (2013) In situ breast cancer and microchimerism. *Sci Rep*, 3, 2192.
- Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman & F. Bray (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136, E359-86.
- Gadi, V. K. (2009) Fetal microchimerism and cancer. *Cancer Lett*, 276, 8-13.
- (2010) Fetal microchimerism in breast from women with and without breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 121, 241-4.
- Gadi, V. K., K. E. Malone, K. A. Guthrie, P. L. Porter & J. L. Nelson (2008) Case-control study of fetal microchimerism and breast cancer. *PLoS One*, 3, e1706.
- Gadi, V. K. & J. L. Nelson (2007) Fetal microchimerism in women with breast cancer. *Cancer Res*, 67, 9035-8.
- Gall, J. G. & M. L. Pardue (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 63, 378-83.
- Garibyan, L. & N. Avashia (2013) Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*, 133, 1-4.

- Greer, L. G., B. M. Casey, L. M. Halvorson, C. Y. Spong, D. D. McIntire & F. G. Cunningham (2011) Antithyroid antibodies and parity: further evidence for microchimerism in autoimmune thyroid disease. *Am J Obstet Gynecol*, 205, 471.e1-4.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak & P. M. Williams (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6, 986-94.
- Jimenez, D. F., A. C. Leapley, C. I. Lee, M. N. Ultsch & A. F. Tarantal (2005) Fetal CD34+ cells in the maternal circulation and long-term microchimerism in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Transplantation*, 79, 142-6.
- Johnson, K. L., D. K. Zhen & D. W. Bianchi (2000) The use of fluorescence in situ hybridization (FISH) on paraffin-embedded tissue sections for the study of microchimerism. *Biotechniques*, 29, 1220-4.
- Jolis, T. W., B. M. Brucker, C. Schorl, J. N. Butera & P. J. Quesenberry (2017) Low microchimeric cell density in tumors suggests alternative antineoplastic mechanism. *Med Oncol*, 34, 65.
- Kamper-Jørgensen, M. (2012) Microchimerism and survival after breast and colon cancer diagnosis. *Chimerism*, 3, 72-3.
- Kamper-Jørgensen, M., R. J. Biggar, A. Tjønneland, H. Hjalgrim, N. Kroman, K. Rostgaard, C. L. Stamper, A. Olsen, A. M. Andersen & V. K. Gadi (2012) Opposite effects of microchimerism on breast and colon cancer. *Eur J Cancer*, 48, 2227-35.
- Khosrotehrani, K., K. L. Johnson, D. H. Cha, R. N. Salomon & D. W. Bianchi (2004) Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue. *JAMA*, 292, 75-80.
- Khosrotehrani, K., K. L. Johnson, S. Guégan, H. Stroh & D. W. Bianchi (2005) Natural history of fetal cell microchimerism during and following murine pregnancy. *J Reprod Immunol*, 66, 1-12.
- Khosrotehrani, K., H. Stroh, D. W. Bianchi & K. L. Johnson (2003) Combined FISH and immunolabeling on paraffin-embedded tissue sections for the study of microchimerism. *Biotechniques*, 34, 242-4.
- Kinder, J. M., I. A. Stelzer, P. C. Arck & S. S. Way (2017) Immunological implications of pregnancy-induced microchimerism. *Nat Rev Immunol*, 17, 483-494.
- Klitschar, M., U. D. Immel, A. Kehlen, P. Schwaiger, T. Mustafa, S. Mannweiler, S. Regauer, M. Kleiber & C. Hoang-Vu (2006) Fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis: a quantitative approach. *Eur J Endocrinol*, 154, 237-41.
- Kolialexi, A., G. T. Tsangaris, A. Antsaklis & A. Mavroua (2004) Rapid clearance of fetal cells from maternal circulation after delivery. *Ann N Y Acad Sci*, 1022, 113-8.

- Lambe, M., C. Hsieh, D. Trichopoulos, A. Ekblom, M. Pavia & H. O. Adami (1994) Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *N Engl J Med*, 331, 5-9.
- Lambert, N. C., Y. M. Lo, T. D. Erickson, T. S. Tylee, K. A. Guthrie, D. E. Furst & J. L. Nelson (2002) Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulating DNA? A quantitative answer. *Blood*, 100, 2845-51.
- Lepez, T., M. Vandewoestyne, S. Hussain, F. Van Nieuwerburgh, K. Poppe, B. Velkeniers, J. M. Kaufman & D. Deforce (2011) Fetal microchimeric cells in blood of women with an autoimmune thyroid disease. *PLoS One*, 6, e29646.
- Liégeois, A., J. Escourrou, E. Ouvré & J. Charreire (1977) Microchimerism: a stable state of low-ratio proliferation of allogeneic bone marrow. *Transplant Proc*, 9, 273-6.
- Lo, Y. M., T. K. Lau, L. Y. Chan, T. N. Leung & A. M. Chang (2000) Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem*, 46, 1301-9.
- Mullis, K. B. (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*, 262, 56-61, 64-5.
- Nath, J. & K. L. Johnson (1998) Fluorescence in situ hybridization (FISH): DNA probe production and hybridization criteria. *Biotech Histochem*, 73, 6-22.
- Nemescu, D., R. G. Ursu, E. R. Nemescu & L. Negura (2016) Heterogeneous Distribution of Fetal Microchimerism in Local Breast Cancer Environment. *PLoS One*, 11, e0147675.
- O'Donoghue, K., M. Choolani, J. Chan, J. de la Fuente, S. Kumar, C. Campagnoli, P. R. Bennett, I. A. Roberts & N. M. Fisk (2003) Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Hum Reprod*, 9, 497-502.
- O'Donoghue, K., H. A. Sultan, F. A. Al-Allaf, J. R. Anderson, J. Wyatt-Ashmead & N. M. Fisk (2008) Microchimeric fetal cells cluster at sites of tissue injury in lung decades after pregnancy. *Reprod Biomed Online*, 16, 382-90.
- Olson, S. H., A. G. Zauber, J. Tang & S. Harlap (1998) Relation of time since last birth and parity to survival of young women with breast cancer. *Epidemiology*, 9, 669-71.
- Osada, H., S. Doi, T. Fukushima, H. Nakauchi, K. Seki & S. Sekiya (2001) Detection of fetal HPCs in maternal circulation after delivery. *Transfusion*, 41, 499-503.
- Ostensen, M. & P. M. Villiger (2007) The remission of rheumatoid arthritis during pregnancy. *Semin Immunopathol*, 29, 185-91.

- Patas, K., J. B. Engler, M. A. Friese & S. M. Gold (2013) Pregnancy and multiple sclerosis: fetomaternal immune cross talk and its implications for disease activity. *J Reprod Immunol*, 97, 140-6.
- Peterson, S. E., J. L. Nelson, K. A. Guthrie, V. K. Gadi, T. M. Aydelotte, D. J. Oyer, S. W. Prager & H. S. Gammill (2012) Prospective assessment of fetal-maternal cell transfer in miscarriage and pregnancy termination. *Hum Reprod*, 27, 2607-12.
- Petrek, J. A. (1994) Breast cancer and pregnancy. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 113-21.
- Pinkel, D., T. Straume & J. W. Gray (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 2934-8.
- Renné, C., E. Ramos Lopez, S. A. Steimle-Grauer, P. Ziolkowski, M. A. Pani, C. Luther, K. Holzer, A. Encke, R. A. Wahl, W. O. Bechstein, K. H. Usadel, M. L. Hansmann & K. Badenhop (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, 5810-4.
- Rijnink, E. C., M. E. Penning, R. Wolterbeek, S. Wilhelmus, M. Zandbergen, S. G. van Duinen, J. Schutte, J. A. Bruijn & I. M. Bajema (2015) Tissue microchimerism is increased during pregnancy: a human autopsy study. *Mol Hum Reprod*, 21, 857-64.
- Rosenberg, L., L. Thalib, H. O. Adami & P. Hall (2004) Childbirth and breast cancer prognosis. *Int J Cancer*, 111, 772-6.
- Straub, R. H., F. Buttgereit & M. Cutolo (2005) Benefit of pregnancy in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*, 64, 801-3.
- Ståhlberg, A., A. El-Heliebi, P. Sedlmayr & T. Kroneis (2017) Unravelling the biological secrets of microchimerism by single-cell analysis. *Brief Funct Genomics*, elx027.
- van Wijk, I. J., J. M. van Vugt, M. A. Mulders, A. A. Könst, S. M. Weima & C. B. Oudejans (1996) Enrichment of fetal trophoblast cells from the maternal peripheral blood followed by detection of fetal deoxyribonucleic acid with a nested X/Y polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol*, 174, 871-8.
- Wang, X., C. Chen, L. Wang, D. Chen, W. Guang & J. French (2003) Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. *Fertil Steril*, 79, 577-84.
- Warren Andersen, S., P. A. Newcomb, J. M. Hampton, L. Titus-Ernstoff, K. M. Egan & A. Trentham-Dietz (2011) Reproductive factors and histologic subtype in relation to mortality after a breast cancer diagnosis. *Breast Cancer Res Treat*, 130, 975-80.

Yan, Z., N. C. Lambert, K. A. Guthrie, A. J. Porter, L. S. Loubiere, M. M. Madeleine, A. M. Stevens, H. M. Hermes & J. L. Nelson (2005) Male microchimerism in women without sons: quantitative assessment and correlation with pregnancy history. *Am J Med*, 118, 899-906.

6.1. ONLINE ZDROJE

ICD-10 Version:2010 [online]. 2010 [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>