

JUSTYNA RAK

*Laboratoire Immunogénétique de la Polyarthrite Rhumatoïde INSERM
163, av de Luminy
Marsylia, Francja
E-mail : justyna.rak@medecine.univ-mrs.fr*

MIKROCHIMERYZM, PŁEĆ I CHOROBY AUTOIMMUNOLOGICZNE

EPIDEMIOLOGIA CHORÓB AUTOIMMUNOLOGICZNYCH

Większość chorób autoimmunologicznych pojawia się znacznie częściej u kobiet niż u mężczyzn, zwłaszcza w przypadku syndromu Sjörgena, toczenia rumieniowatego układowego, chorób autoimmunologicznych tarczycy (choroba Gravesa-Basedowa i choroba Hashimoto) oraz twardziny, wśród których ponad 80% chorych to kobiety. Pacjenci cier-

piący na reumatoidalne zapalenie stawów, nużliwość mięśni i stwardnienie rozsiane to w 60-75% kobiety, natomiast cukrzyca typu 1 pojawia się z podobną częstością u obydwu płci (WHITACRE 2001). W zależności od pochodzenia etnicznego badanej grupy chorych, zarówno proporcje, jak i objawy chorobowe u kobiet i mężczyzn mogą się różnić.

RÓŻNICE MIĘDZY KOBIECIAMI I MĘŻCZYZNAMAMI A UKŁAD IMMUNOLOGICZNY

CHROMOSOM X

Najbardziej oczywistą różnicę pomiędzy obiema płciami stanowi obecność dwóch chromosomów X u kobiet i jednego u mężczyzn. Rola chromosomu X w odporności nie jest jednoznacznie określona, niemniej jednak przewaga chorób autoimmunologicznych u kobiet i wysoka zapadalność na choroby autoimmunologiczne u osób z zaburzeniami liczby chromosomów X, takich jak zespół Turnera 45,XO i zespół Klinefeltera 47,XXY (SCHATTNER i BERREBI 1986), sugerują jego znaczenie. Gubienie wraz z wiekiem chromosomu X w komórkach immunologicznych krwi obwodowej, prowadzące do monosomii chromosomu X, obserwowane jest m.in. u kobiet z pierwotną marskością żółciową wątroby. Utrata chromosomu X, a wraz z tym ekspresji genów, jest kojarzona z wysoką aktywnością mitotyczną komórek limfocytarnych i nagromadzeniem błędów podczas kolejnych podziałów komórkowych.

U kobiet chorujących na twardzinę obserwuje się zaburzenia polegające na niejednakowej (nierównomiernej) inaktywacji chromosomów X w komórkach krwi, tzn. zamiast spodziewanej losowej inaktywacji chromosomów X pochodzenia matczynego i ojcowskiego, jeden z chromosomów jest inaktywowany częściej (OZBALKAN i współaut. 2005). W grasicy, różny poziom ekspresji genów z niejednakowo inaktywowanych chromosomów X pochodzenia matczynego i ojcowskiego, prowadzić może do zmniejszonej prezentacji określonych antygenów, przez co dojrzewające limfocyty T nie mają szansy wykształcić tolerancji wobec nich. Produkty genów mieszczących się na chromosomie X mogą edukować limfocyty T w grasicy, a także uczestniczą w prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego, jak na przykład czynnik transkrypcyjny foxp3 kluczowy dla komórek T regulatorowych (HORI i współaut. 2003, CHATILA 2005).

HORMONY

Niższa zapadalność na choroby autoimmunologiczne wśród mężczyzn wiązana jest m.in. z obecnością chromosomu Y. Poza potencjalnie istniejącymi, niepoznanyymi jednak jeszcze genami związanymi bezpośrednio z funkcją układu immunologicznego, chromosom Y zawiera geny kodujące hormony męskie.

Androgeny obecne u mężczyzn w stężeniach znacznie wyższych niż u kobiet, mają działanie immunosupresyjne. Terapia z wykorzystaniem testosteronu zmniejsza objawy chorobowe u mężczyzn z reumatoidalnym zapaleniem stawów (CUTOLO i współaut. 1991) i toczeniem rumieniowatym układowym (OLSEN i KOVACS 1995). Jako pomost łączący układ immunologiczny i płeć postuluje się czynnik transkrypcyjny NF- κ B (DALE i współaut. 2006). W zależności od typu komórek i bodźca zewnątrzkomórkowego, NF- κ B aktywuje transkrypcję genów związanych z odpowiedzią immunologiczną, taką jak produkcja cytokin czy prezentacja antygenów. Glikokortykoidy i progesteron produkowany w niższych ilościach także u mężczyzn, mają również własności immunosupresyjne. Natomiast żeńskie estrogeny podnoszą reaktywność układu immunologicznego (CUTOLO i współaut. 2006).

Zarówno odporność komórkowa, jak i humoralna, są silniejsze u kobiet niż u mężczyzn. Wskazują na to liczne badania dotyczące m.in. niższej ogólnej zapadalności kobiet na nowotwory, zakażenia wirusowe i pasożytnicze, jak również większa częstość odrzucenia przeszczepów. Nabyta odporność jest silniejsza u kobiet, w przeciwieństwie do odporności wrodzonej niespecyficznej, która działa szybciej i skuteczniej u mężczyzn i, jak się sugeruje, w ten sposób chroni układ odporności nabytej mężczyzn przed nadmierną stymulacją przez obce antygeny i tym samym przed rozwojem reakcji autoimmunologicznych (CARROLL 2001).

CIAŻA

Oprócz obecności dwóch chromosomów X u kobiet i wszelkich konsekwencji hormonalno-immunologicznych z tym związanych, jako istotną różnicę między płciami należy podkreślić ciążę. Łożyisko nie stanowi bariery nieprzepuszczalnej i począwszy od 5. tygodnia ciąży zachodzi transport komórek płodowych do krążenia matki (THOMAS i współaut. 1994), a od 13. tygodnia od matki do

płodu (LO i współaut. 1998). Jest to proces obserwowany powszechnie w prawidłowo przebiegających ciążach i w 36. tygodniu ciąży 100% ciężarnych posiada w swoim krążeniu komórki pochodzenia płodowego (ARIGA i współaut. 2001). Po porodzie, w czasie kilku godzin dochodzi do gwałtownego spadku ilości płodowego DNA w osoczu matki, ale komórki pochodzenia płodowego mogą być wykryte w organizmie matki nawet wiele lat po porodzie (BIANCHI i współaut. 1996).

MIKROCHIMERYZM

Zjawisko współistnienia w jednym organizmie dwóch odmiennych genetycznie populacji komórek, z których jedna występuje w bardzo niskiej liczbie, nazywane jest mikrochimeryzmem. Możliwym źródłem chimeryzmu jest somatyczna mutacja, ale jako najczęstszą przyczynę wskazuje się mieszanie krwi dwóch osobników. Mężczyźni są gospodarzami mikrochimerycznych komórek macicznych pozostałych po okresie ich życia płodowego. Kobiety, obok mikrochimerycznych komórek macicznych, każdorazowo na skutek ich własnych ciąż, otrzymują nową dawkę komórek płodowych. W ten sposób pula komórek mikrochimerycznych w organizmach kobiet zostaje istotnie zwiększona. Transport komórek płodu do krążenia matki jest większy niż transport komórek matki do krążenia płodu (LO i współaut. 2000), co zwiększa zróżnicowanie między kobietami i mężczyznami pod względem obecności komórek mikrochimerycznych.

Momentem decydującym o ostatecznym poziomie transfuzji komórek między matką i dzieckiem jest poród. Poród drogą naturalną, zwłaszcza wydłużony, skutkuje zwiększonym transportem komórek macicznych do płodu, podczas gdy cięcie cesarskie, oszczędzając płód (LIN i współaut. 1996), nasila transport komórek płodowych do krążenia matki (KANEDA i współaut. 1997), zatem dziecko urodzone drogą naturalną ma wyższy poziom mikrochimeryzmu macicznego niż dziecko urodzone poprzez cesarskie cięcie. Jak wykazały badania, dzieci urodzone drogą naturalną, a więc mające wyższy poziom mikrochimeryzmu macicznego, częściej cierpią z powodu chorób autoimmunologicznych. Jednocześnie, matki które urodziły dziecko poprzez cięcie cesarskie mają wyższy poziom mikrochimeryzmu płodowego i tym samym wyższe prawdopodobieństwo rozwinięcia choroby autoimmunologicznej (GLEICHER i współaut. 2006).

MIKROCHIMERYZM W CHOROBYCH AUTOIMMUNOLOGICZNYCH

Większa częstość i większa liczba komórek mikrochimerycznych u kobiet cierpiących na twardzinę układową, w porównaniu z kobietami zdrowymi, skłoniły do przypuszczeń, że mikrochimeryzm może mieć udział w patogenezie tej choroby (NELSON i współaut. 1998). Twardzina układowa pojawia się najczęściej u kobiet w wieku przed- i okołomenopauzalnym, czyli po zakończeniu okresu reprodukcyjnego, co ma istotne znaczenie, gdyż ciąży to najczęstsze źródło mikrochimeryzmu. Ponadto, podobieństwo objawów chorobowych, takich jak: zwłóknienie w płucach, stwardnienie skóry, zmiany w układzie pokarmowym, między twardziną układową i przewlekłą postacią choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (ang. chronic Graft Versus Host Disease, cGVHD), stanem chimeryzmu po allogenicznej transplantacji komórek macierzystych krwi, popiera powyższą teorię. Model zwierzący Christnera, w którym działanie chlorkiem winylu na myszy prowadzi do wzrostu mikrochimeryzmu i jednocześnie do zmian chorobowych w skórze i organach wewnętrznych, popiera teorię o patogennym wpływie komórek mikrochimerycznych (CHRISTNER i współaut. 2000). W bioptach zmienionej chorobowo skóry kobiet z twardziną układową stwierdzono obecność komórek mikrochimerycznych o cechach komórek dendrytycznych, komórek Langerhansa, limfocytów T i B (MCNALLAN i współaut. 2007). Limfocytarne komórki mikrochimeryczne znajdowane są także w skórze bez zmian stwardnieniowych, co może stanowić stan poprzedzający rozwój twardziny (SAWAYA i współaut. 2004). Klony limfocytów T, uzyskane ze skóry i krwi kobiet z twardziną układową, wykazują proliferację w obecności autologicznych limfocytów T produkując zwiększone ilości profibrotycznej interleukiny 4 (IL-4), a co ważne, jedna piąta z tych autoreaktywnych klonów posiada chromosom Y. Wskazuje to na reaktywność płodowych męskich komórek mikrochimerycznych wobec matczynych antygenów zgodności tkankowej HLA (ang. histocompatibility leukocyte antigen, HLA) (SCALETTI i współaut. 2002).

Zespół Sjögrena, którego charakterystycznym objawem jest postępujący zanik i wysychanie błon śluzowych z naciekiem limfocytarnym, to inna choroba autoimmunologiczna pojawiająca się najczęściej u kobiet w wieku okołomenopauzalnym i wykazująca podo-

bieństwo do przewlekłej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi. W przeciwieństwie do twardziny układowej, nie znaleziono dowodu na wzrost mikrochimeryzmu płodowego w krążeniu kobiet z zespołem Sjögrena (TODA i współaut. 2001), ale obecność komórek mikrochimerycznych stwierdzono w zapalnych gruczołach ślinowych i wydzielinie oskrzeli, co sugerowałoby ich udział w procesie chorobowym (KUROKI i współaut. 2002).

Pierwotna marskość żółciowa wątroby (ang. primary biliary cirrhosis, PBC) jest jednym z klinicznych objawów cGVHD; samodzielnie natomiast, podobnie jak twardzina układowa i zespół Sjögrena, pojawia się głównie u kobiet w wieku okołomenopauzalnym. Pomimo wysokiej częstości mikrochimerycznych męskich komórek w bioptach tkanki wątrobowej sięgającej 36% (STEVENS i współaut. 2004), jak i we krwi obwodowej kobiet chorych na PBC dochodzącej do 30% (INVERNIZZI i współaut. 2000), nie wykazano wyraźnego związku między mikrochimeryzmem a procesem chorobowym, gdyż podobną częstość i liczbę komórek mikrochimerycznych znaleziono również w krążeniu i tkance wątrobowej kobiet zdrowych. Mikrochimeryzm może być związany jedynie z określonym typem PBC, wykazującym cechy syndromu CREST (ang. calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysfunction, sclerodactyly, telangiectasia), a przez to bliższym twardzinie układowej (CORPECHOT i współaut. 2000).

Podobnie, nie wykazano związku między rozwojem choroby a mikrochimeryzmem w obrębie zmian skórnych u pacjentów z toczniem rumieniowatym układowym (KHOSROTEHRANI i współaut. 2005b). Jedynie u chorych z towarzyszącym zapaleniem nerek komórki mikrochimeryczne były wykryte w większej liczbie niż u pozostałych chorych i u zdrowych osobników kontrolnych (MOSCA i współaut. 2003). Przytoczone powyżej przykłady wskazują na znaczenie dokładnej analizy stanu chorobowego jako kluczowej dla znalezienia właściwych zależności między mikrochimeryzmem a określonym stanem chorobowym.

Istotnie wyższą liczbę płodowych komórek mikrochimerycznych o charakterze limfocytarnym stwierdzono za pomocą metody FISH z sondą specyficzną dla chromosomu Y w próbkach pobranych z tarczyc kobiet z chorobą Gravesa-Basedowa (60%) i u kobiet z chorobą Hashimoto (40%) (RENNE i współaut. 2004).

MIKROCHIMERYZM POCHODZENIA MATCZYNEGO

Mikrochimeryzm ma znaczenie w chorobach autoimmunologicznych nie tylko u kobiet w wieku przedmenopauzalnym.

W przeciwieństwie do większości chorób autoimmunologicznych, cukrzyca typu 1 (ang. type 1 diabetes, T1D) rozwija się głównie u dzieci i młodzieży, nie wykazując przewagi u płci żeńskiej. Wyższą częstość i poziomy matczynek komórek mikrochimerycznych znaleziono we krwi obwodowej chorych cierpiących na T1D. Jednocześnie, podwyższony, w porównaniu ze zdrowymi osobnikami kontrolnymi, poziom matczyny mikrochimeryzmu znaleziono u zdrowego rodzeństwa cierpiących na T1D, co wskazywałoby na możliwy związek między mikrochimeryzmem i chorobą, tym bardziej, iż ryzyko jej wystąpienia u drugiego z rodzeństwa jest 10-krotnie zwiększone. Rodzeństwo nie dotknięte chorobą jest szczególnie dobrym obiektem badań ze względu na to samo podłoże genetyczne i wpływ środowiska.

W biopsjach trzustki pobranych od dzieci cierpiących na T1D stwierdzono obecność matczyny mikrochimerycznych komórek XX, i jak wykazało barwienie immunohistochemiczne, większość tych komórek produkowała insulinę. Jedynie znikoma część limfocytów (0,07%) znalezionych w trzustce okazała się być pochodzenia matczyny, co zaprzecza teorii sugerującej udział komórek mikrochimerycznych jako efektorów w inicjacji procesu chorobowego. Biorąc pod uwagę produkcję insuliny, sugeruje się raczej aktywny udział komórek mikrochimerycznych w przywróceniu funkcji uszkodzonych wysepek beta w trzustce. Przewaga komórek XXX i XXXX, w porównaniu z komórkami XXXY, wyklucza fuzję między komórkami męskimi i żeńskimi oraz następującą eliminację chromosomów prowadzącą do „powstania” żeńskich komórek z jądrami XX i dowodzi zdolności komórek mikrochimerycznych do aktywnych podziałów komórkowych w obrębie trzustki (NELSON i współaut. 2007).

Zróznicowane, tkankowo-specyficzne komórki pochodzenia matczyny zostały znalezione również w mięśniu serca i wątrobie, organach będących głównym celem ataku we wrodzonym toczniu noworodkowym (ang. neonatal lupus syndrome, NLS) chorobie autoimmunologicznej pojawiającej się u dziecka w trakcie życia płodowe-

go. Obecność takich komórek wykazano także w tkankach dzieci zdrowych, jednak znacznie rzadziej, co wskazuje, iż u chorych większa liczba matczyny komórek mikrochimerycznych ma znaczenie w procesie chorobowym. Porównanie poziomów mikrochimeryzmu pomiędzy dziećmi z ciąży mnogich, różniących się pod względem wrodzonego tocznia i związanego z nim bloku serca (ang. heart block disease), nie przynosi rozstrzygnięć na temat roli komórek mikrochimerycznych w rozwoju choroby (STEVENS i współaut. 2005). Mechanizm działania matczyny komórek mikrochimerycznych, negatywny w inicjacji choroby, bądź też pozytywny w regeneracji uszkodzonej tkanki, pozostaje nieznany (STEVENS i współaut. 2003).

Do autoimmunologicznych chorób dziecięcych należy także młodzieńcze zapalenie skórno-mięśniowe (ang. juvenile dermatomyositis, JDM), które ponadto może stanowić jeden ze stanów towarzyszących cGVHD. W tym przypadku matczyny komórki mikrochimeryczne ulegają *in vitro* aktywacji w obecności komórek chorego dziecka, co sugeruje, iż *in vivo* mogą one czynnie uczestniczyć w procesie chorobowym (REED i współaut. 2004).

W przypadku dzieci z młodzieńczym zapaleniem skórno-mięśniowym, jak i dzieci zdrowych posiadających mikrochimeryczne komórki matki, HLA-DQA1*0501 jest najczęstszym allelem komórek mikrochimerycznych. Podobnie, obecność allelu HLA-DQA1*0501 w komórkach płodu została wykazana jako istotnie zwiększająca prawdopodobieństwo mikrochimeryzmu płodowego u matki (LAMBERT i współaut. 2000). Nie zdefiniowano konkretnego genotypu HLA gospodarza stwarzającego predyspozycje do mikrochimeryzmu, niemniej jednak HLA gospodarza i ich relacja (HLA identyczne lub różne) wobec HLA komórek mikrochimerycznych może przyczyniać się do aktywacji komórek mikrochimerycznych i prowadzić do rozwoju choroby (REED i współaut. 2004).

Zakładając udział komórek mikrochimerycznych w rozwoju reakcji autoimmunologicznej, mikrochimeryzm pochodzenia matczyny może wyjaśniać występowanie u mężczyzn chorób autoimmunologicznych wykrywanych głównie u kobiet, takich jak na przykład twardzina układowa.

MIKROCHIMERYZM W CHOROBACH NIEAUTOIMMUNOLOGICZNYCH

Mikrochimeryzm obserwowany jest również w stanach chorobowych nie-autoimmunologicznych jak na przykład: wysypka ciążowa (ang. polymorphic eruptions of pregnancy (PEP), stan przedrzucawkowy (ang. pre-eclampsia), zakaźne zapalenie wątroby, nieautoimmunologiczne choroby tarczycy, nowotwory krwi i szyjki macicy.

PEP to zmiany skórne pojawiające się w trzecim trymestrze ciąży. U kobiet z PEP oczekujących syna, w przeciwieństwie do zdrowych ciężarnych, stwierdzono obecność męskiego DNA w biopsjach skóry, co wskazuje na migrację komórek płodowych do skóry i ich możliwy udział w stanie chorobowym (ARACTINGI i współaut. 1998).

Zwiększona, w porównaniu z prawidłowymi ciążami, wymiana komórek przez łożysko obserwowana jest w ciążach zagrożonych. W stanie przedrzucawkowym (ang. pre-eclampsia), jednym z powikłań ciąży objawiającym się proteinurią (białkomocz) i nadciśnieniem, groźnym dla zdrowia i życia zarówno matki i dziecka, zachodzi zwiększona, w porównaniu z ciążami prawidłowymi, wymiana komórek przez łożysko. Podwyższone ilości płodowych erytroblastów, jak również płodowego

pozakomórkowego DNA obserwowane u matek w stanie przedrzucawkowym, pojawiają się w zagrożonych ciążach jeszcze przed wystąpieniem objawów, co stwarza możliwość diagnostyki (LEVINE i współaut. 2004), chociaż pojawiają się na ten temat sprzeczne doniesienia podważające słuszność tej strategii (BYRNE i współaut. 2003).

Mikrochimeryzm wiązany jest również ze zmianami nowotworowymi. Przykładowo, męskie komórki mikrochimeryczne występują w zmienionej nowotworowo szyjce macicy. Nie wyklucza się, że ich obecność jest pozostałością po współżyciu i następującym procesie integracji komórek męskich z nasienia lub po urodzeniu syna, niemniej jednak nabłonkowy charakter części mikrochimerycznych komórek znalezionych w warstwach nabłonkowych szyjki sugeruje raczej płodowy mikrochimeryzm. Biorąc pod uwagę fenotyp komórek mikrochimerycznych znalezionych w zmienionej nowotworowo szyjce macicy (leukocytarny bądź nabłonkowy), powraca pytanie dotyczące określenia roli komórek mikrochimerycznych w reakcji immunologicznej lub regeneracji uszkodzonej tkanki (CHA i współaut. 2003).

MECHANIZM DZIAŁANIA KOMÓREK MIKROCHIMERYCZNYCH

Wstępne badania i hipotezy kojarzyły mikrochimeryzm raczej z negatywnym niż pozytywnym wpływem na organizm gospodarza. Mikrochimeryzm jest zjawiskiem fizjologicznym wykrywany często u zdrowych kobiet i, jak przypuszcza się, jedynie w określonych warunkach środowiskowych i genetycznych może dochodzić do zaburzenia regulacji ich współistnienia w organizmie gospodarza i zapoczątkowania reakcji autoimmunologicznej.

Nie wiadomo dokładnie, w jaki sposób komórki mikrochimeryczne uczestniczą w zachwianiu równowagi immunologicznej. Wśród możliwych mechanizmów proponuje się, podobnie jak w przypadku reakcji odrzucania przeszczepu (GOULD i AUCHINCLOSS 1999), prezentację antygenów komórek mikrochimerycznych, zarówno pośrednią, jak i bezpośrednią (NELSON 2002). Przez analogię do choroby przeszczep przeciw gospodarzowi, sugeruje się udział donorowych komórek T i uszkodzenie grasicy, w wyniku czego dojrzewające w niej limfocyty T stają się reaktywne wobec własnych antygenów.

Tworzenie bezpośrednich analogii z chorobą przeszczep przeciw gospodarzowi jest jednak dużym przybliżeniem ze względu na istotne różnice w proporcjach komórek mikrochimerycznych wobec komórek gospodarza. Chimeryzm po transplantacji komórek macierzystych jest stanem zastąpienia krążących komórek gospodarza, podczas gdy w przykładowej twardzinie układowej, szacuje się obecność jednej komórki mikrochimerycznej w jednym milionie leukocytów (NELSON 1998a). Mikrochimeryczne komórki posiadają fenotyp komórek macierzystych (BIANCHI i współaut. 1996), co pozwala im na długoletnie przetrwanie w organizmie gospodarza, jak również różnicowanie w tkanki. Komórki mikrochimeryczne, które uległy różnicowaniu przybierając fenotyp określonej tkanki, prezentują jednak w połowie obce antygeny zgodności tkankowej HLA, przez co mogą stać się obiektem ataku systemu immunologicznego gospodarza. Niewielkie rozchwianie wywołane przez znikomą liczbę komórek mikrochimerycznych następnie może ulegać

zwielokrotnieniu z udziałem komórek gospodarza m.in. poprzez zmiany środowiska cytokinowego.

Coraz częściej mówi się o pozytywnym znaczeniu komórek mikrochimerycznych (KHOSROTEHRANI i współaut. 2005a, NELSON i współaut. 2007). Jak już wcześniej wspomniano, zróżnicowane tkankowo mikrochimeryczne komórki znajdują się w wielu organach gospodarza takich jak trzustka, wątroba, serce czy skóra. Ich pierwotna obecność i prezentacja obcych dla gospodarza antygenów może wywoływać reakcje zapalną

ze strony układu immunologicznego. Alternatywnie, stan zapalny, poprzez miejscowo zmienioną produkcję cytokin czy cząsteczek adhezyjnych, może wzbudzać rekrutację komórek mikrochimerycznych i wprowadzać je na drogę różnicowania zgodną z lokalnym środowiskiem. Przykładowo, matczyne komórki mikrochimeryczne zróżnicowane w keratynocyty, znajdujące w zmienionej chorobowo skórze chłopców z liszajem płaskim, mogą uczestniczyć w próbie przywrócenia funkcji uszkodzonej skóry (KHOSROTEHRANI i BIANCHI 2005).

RELACJE HLA MIĘDZY DAWCĄ I BIORCĄ MIKROCHIMERYZMU

W transplantacji zgodność grup krwi ABO między dawcą i biorcą ma znaczenie w ustaleniu się chimeryzmu i pojawieniu się choroby przeszczep przeciw gospodarzowi, a w szczególności jej ostrej postaci (BOGUNIA-KUBIK i współaut. 2003). W przypadku mikrochimeryzmu nie znaleziono takiej zależności (KLINTSCHAR i współaut. 2006). Podobnie jednak jak w transplantacji, gdzie pokrewieństwo antygenów zgodności tkankowej HLA między dawcą i biorcą przeszczepu ma kluczowe znaczenie dla przyjęcia przeszczepu, mikrochimeryzm jako rodzaj przeszczepu prezentującego w połowie obce antygeny, zależy od pokrewieństwa antygenów HLA komórek mikrochimerycznych i gospodarza mikrochimeryzmu. Jedną z pierwszych wskazówek o znaczeniu relacji HLA między donorem i gospodarzem mikrochimeryzmu jest wysoka częstość remisji choroby u pacjentek z reu-

matoidalnym zapaleniem stawów w trakcie ciąży w przypadku, gdy dziecko odziedziczyło od ojca geny *HLA* różne od genów *HLA* matki tzn. płód jest w połowie obcy dla matczyne układu odpornościowego (NELSON i współaut. 1993). Natomiast kobiety cierpiące na twardzinę układową, w której rozwój choroby wiązany jest ze zwiększonym mikrochimeryzmem, są 9 razy częściej zgodne pod względem HLA ze swoimi dziećmi, a ryzyko choroby wzrasta, gdy dziecko jest homozygotyczne pod względem HLA (NELSON i współaut. 1998). Im większe podobieństwo pod względem HLA między biorcą i dawcą mikrochimeryzmu, tym dłużej komórki mikrochimeryczne mogą pozostawać niewykryte i nieeliminowane przez biorcę, ukryte w niszy w szpiku kostnym i gotowe do reakcji (ARLETT i współaut. 1997).

METODY ANALIZY MIKROCHIMERYZMU

Pierwsze dowody na transport komórek z organizmu matki do dziecka w trakcie ciąży opierały się na analizie kariotypu noworodków męskich, w których wykazano obecność mozaicyzmu męskiego (TURNER i współaut. 1966) Ponadto, znakowanie komórek krwi ciężarnej tuż przed planowanym porodem, wykazało obecność limfocytów i erytrocytów matczynych w krwi pępowinowej. Później, dzięki metodzie PCR, wykazano, iż w około 50% przebadanych próbek, komórki krwi pępowinowej zawierają DNA matki.

Wykrycie mikrochimeryzmu jest możliwe dzięki różnicom między genami matki

a genami dziecka odziedziczonymi od ojca. W reakcjach PCR, gdzie startery są specyficzne wobec sekwencji mikrosatelitarnych (SOCIE i współaut. 1994), krótkich tandemowych powtórzeń (ang. short tandem repeats, STR) (BAUER i współaut. 2002), czy też sekwencji genów *HLA* dawcy mikrochimeryzmu, różnych od sekwencji genów biorcy (SCARADAVOU i współaut. 1996), jedynie mikrochimeryczny DNA będzie ulegać amplifikacji. Następnie, w zależności od metody wizualizacji produktów PCR, można z różnym stopniem dokładności określić obecność mikrochimeryzmu w sposób jakościowy, półilościowy bądź ilościowy.

W przypadku, gdy biorca i dawca są różnej płci, najłatwiejszym sposobem wykrywania chimeryzmu jest wykorzystanie chromosomów Y i X jako znaczników komórek dawcy i biorcy, co stanowi podstawę w metodach opartych na FISH (ang. fluorescence *in situ* hybridisation). Metoda PCR wykorzystuje także sekwencje specyficzne dla chromosomu Y. Początkowo, w PCR gniazdowym (ang. nested PCR), wykorzystywano sekwencje SRY (ang. Y-linked testis-determinant gene) i DYZ1, niemniej jednak, metodom tym zarzuca się wysokie ryzyko wyników fałszywie pozytywnych. W przypadku SRY przyczyną fałszywie pozytywnego wyniku może być podobieństwo sekwencji genu SRY i sekwencji autosomalnych, które może prowadzić do reakcji krzyżowej (ang. cross-reactivity) i w konsekwencji, do powstania produktu PCR mimo braku męskiego DNA w reakcji. Natomiast, w przypadku DYZ1, ilość powtórzeń genu jest różna pomiędzy poszczególnymi osobnikami męskimi (PATHAK i współaut. 2006), co prowadzić może do błędnego szacowania ilościowego. PCR w czasie rzeczywistym, opierający się na amplifikacji genu *DYS14*, zlokalizowanego na chromosomie Y, i o stałej liczbie powtórzeń pomiędzy różnymi osobnikami, pozwala na wykrycie 1 komórki męskiej wśród 100 tysięcy komórek żeńskich (LAMBERT i współaut. 2002).

Możliwość wykrywania jedynie męskiego DNA stanowi jednak duże ograniczenie analizy mikrochimeryzmu, ograniczając ją do par, gdzie dawcą jest mężczyzna, a kobietą biorcą. Rozwiązanie tego problemu stanowi PCR w czasie rzeczywistym wykorzystujący nieidentyczne sekwencje genów *HLA* biorcy i dawcy. Geny antygenów zgodności tkankowej *HLA* klasy II wykazują wyższy polimorfizm w porównaniu z genami *HLA* klasy I, przez co większość starterów i sond PCR jest projektowana w rejonie *HLA* klasy II. Reakcje PCR w czasie rzeczywistym z użyciem starterów i sond specyficznych wobec sekwencji genów *HLA* dawcy pozwalają na wykrycie mikrochimeryzmu bez względu na płęć, jak na przy-

kład mikrochimeryzmu płodowego żeńskiego oraz matczynego. Niemniej jednak, możliwość analizy jedynie par o nieidentycznych *HLA* może ograniczać obiektywizm w wynikach (LAMBERT i współaut. 2004).

Różnorodność metod wykorzystywanych w wykrywaniu mikrochimeryzmu stanowi jeden z powodów rozbieżności wyników przedstawianych w literaturze.

Drugim istotnym czynnikiem w analizie mikrochimeryzmu jest kompletna informacja o chorobach i leczeniu. Przykładowo, początkowe wyniki wskazujące na podwyższony poziom mikrochimeryzmu w grupie amerykańskich kobiet z twardziną układową nie zostały potwierdzone w badaniach grup japońskich i hiszpańskich. Rozbieżność powyższych wyników może wynikać z braku analizy stanu klinicznego chorych. Badania amerykańskie (NELSON 1998b) zostały przeprowadzone w przeważającej części na grupie chorych z twardziną rozlaną (ang. diffuse scleroderma), podczas gdy pozostałe opierały się w dużej części na chorych z postacią ograniczonej twardziny (ang. limited scleroderma) (SELVA-O'CALLAGHAN i współaut. 2003) lub też nie podano informacji na temat stanu klinicznego badanych (MURATA i współaut. 1999).

Ponadto, szczegółowa historia ciąży jest kluczowa w analizie mikrochimeryzmu płodowego. W zależności od momentu (poronienie lub ciąża terminowa) i sposobu zakończenia ciąży (poronienie wywołane bądź samoistne, poród droga naturalna lub poprzez ciecie cesarskie) poziom mikrochimeryzmu płodowego jest różny. Źródłem mikrochimeryzmu, obok transplantacji, transfuzji krwi i ciąży, może być także mieszanie krwi między bliźniętami w trakcie życia płodowego. Wymiana krwi między bliźniętami dizygotycznymi, z których jedno może obumrzeć i ulec resorpcji zanim jeszcze jego obecność została stwierdzona, może tłumaczyć istnienie mikrochimeryzmu w przypadkach, gdy wszystkie pozostałe wspomniane wyżej źródła są wykluczone (YAN i współaut. 2005).

PODSUMOWANIE

Większość chorób autoimmunologicznych pojawia się znacznie częściej u kobiet niż u mężczyzn. Wśród możliwych przyczyn tej dysproporcji wymienia się wpływ hormonów płciowych na funkcje układu immunologicznego, co skutkuje m.in. wyższym stopniem pobudzenia

układu odporności nabytej u kobiet. Obecność na dwóch żeńskich chromosomach X podwójnej liczby genów, które pierwotnie lub wtórnie nie są kompensowane i ulegają ekspresji, może mieć również istotne znaczenie dla regulacji układu immunologicznego u kobiet.

Ciąża stanowi istotną różnicę w fizjologii mężczyzn i kobiet. Nieodłącznym elementem ciąży jest dwukierunkowy transport komórek przez łożysko, co powoduje ustalenie się u dziecka i matki stanu współlistnienia dwóch genetycznie odmiennych populacji komórek płodowych i macicznych. Znikoma ilość komórek płodowych w organizmie matki nazywana jest mikrochimeryzmem płodowym. Mikrochimeryzm, zarówno płodowy, jak i maciczny, jest zjawiskiem fizjologicznym i występuje często u zdrowych osobników, niemniej jednak, w obecności określonych czynników środowiskowych i genetycznych, komórki mikrochimeryczne mogą przyczyniać się do rozchwiania równowagi układu immunologicznego gospodarza. Istotnie większa liczba komórek mikrochimerycznych u kobiet cierpiących na twardzię układową sugeruje ich udział w rozwoju tej choroby, a także w patogenezie innych chorób autoimmunologicznych. Ostatnio stwierdzono obecność komórek

mikrochimerycznych zróżnicowanych tkankowo i podejmujących tkankowo specyficzne funkcje (wydzielanie insuliny w wysepkach beta w trzustce), co skłania do przypuszczeń o korzystnym działaniu komórek mikrochimerycznych w regeneracji tkanek. Rola mikrochimeryzmu nie jest znana. W literaturze można znaleźć liczne dowody na zarówno negatywne, jak i pozytywne jego znaczenie. Często spotyka się wyniki przeciwnostawne, nawet w odniesieniu do jednej jednostki chorobowej, co w znacznym stopniu utrudnia konstruktywne wnioskowanie. Kluczowe znaczenie dla lepszego poznania mikrochimeryzmu ma ujednoczenie metod badawczych i uwzględnianie szczegółowej historii ciąży i chorób podczas analizy wyników.

Serdecznie dziękuję Pani Doktor Nathalie Lambert za uwagi merytoryczne oraz Pani Doktor Justynie Drukale za życzliwą pomoc w przygotowaniu niniejszego tekstu.

MICROCHIMERISM, GENDER AND AUTOIMMUNE DISEASES

Summary

In general, autoimmune diseases affect women more often than men. Sex hormones and X chromosome genes are hypothesized to underlie this disproportion. Moreover, women are exposed to fetal cells trafficking from fetus to maternal circulation during pregnancy. These cells persisting in mother's organism for years are defined as fetal microchimerism. Paralelly, fetus receives maternal cells which can persist into adult life as maternal microchimerism. Although mechanism of this phenomena is still

not known, it is considered to be common among healthy people. Higher levels of microchimerism among women with scleroderma led to a hypothesis postulating its contribution to disease development. Furthermore, microchimerism was explored in other autoimmune diseases. More recent reports on capacity of microchimeric cells to differentiate and regenerate damaged tissue necessitate reconsideration of the first theories and give hope for new treatment strategies.

LITERATURA

- ARACTINGI S., BERKANE N., BERTHEAU P., LE GOUE C., DAUSSET J., UZAN S., CAROSELLA E. D., 1998. *Fetal DNA in skin of polymorphic eruptions of pregnancy*. Lancet 352, 1898-1901.
- ARIGA H., OHTO H., BUSCH M. P., IMAMURA S., WATSON R., REED W., LEE T. H., 2001. *Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis*. Transfusion 41, 1524-1530.
- ARTLETT C. M., WELSH K. I., BLACK C. M., JIMENEZ S. A., 1997. *Fetal-maternal HLA compatibility confers susceptibility to systemic sclerosis*. Immunogenetics 47, 17-22.
- BAUER M., ORESCOVIC I., SCHOELL W. M., BIANCHI D. W., PERTL B., 2002. *Detection of maternal deoxyribonucleic acid in umbilical cord plasma by using fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeat sequences*. Am. J. Obstet. Gynecol. 186, 117-120.
- BIANCHI D. W., ZICKWOLF G. K., WEIL G. J., SYLVESTER S., DEMARIA M. A., 1996. *Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 705-708.
- BOGUNIAKUBIK K., SUCHNICKI K., LANGE A., 2003. *HLA-DR11 in addition to donor age, gender, and major blood group incompatibility influence the incidence of acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Transplant. Proc. 35, 1556-1558.
- BYRNE B. M., CROWLEY A., TAULO F., ANTHONY J., O'LEARY J. J., O'HERLIHY C., 2003. *Fetal DNA Quantitation in Peripheral Blood Is Not Useful as a Marker of Disease Severity in Women with Preeclampsia*. Hypertens. Pregnancy 22, 157-164.
- CARROLL M., 2001. *Innate immunity in the etiology of autoimmunity*. Nat. Immunol. 2, 1089-1090.
- CHA D., KHOSROTEHRANI K., KIM Y., STROH H., BIANCHI D. W., JOHNSON K. L., 2003. *Cervical cancer and microchimerism*. Obstet. Gynecol 102, 774-781.

- CHATILA T., 2005. *Role of T cells in human diseases*. J. Allergy Clin. Immunol. 116, 949-959.
- CHRISTNER P. J., ARLETT C. M., CONWAY R. F., JIMENEZ S. A., 2000. *Increased numbers of microchimeric cells of fetal origin are associated with dermal fibrosis in mice following injection of vinyl chloride*. Arthritis Rheum. 43, 2598-2605.
- CORPECHOT C., BARBU V., CHAZOULLERES O., POUPON R., 2000. *Fetal microchimerism in primary biliary cirrhosis*. J. Hepatol. 33, 696-700.
- CUTOLO M., BALLEARI E., GIUSTI M., INTRA E., ACCARDO S., 1991. *Androgen replacement therapy in male patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 34, 1-5.
- CUTOLO M., CAPELLINO S., SULLI A., SERIOLI B., SECCHI M. E., VILLAGGIO B., STRAUB R. H., 2006. *Estrogens and autoimmune diseases*. Ann. NY Acad. Sci. 1089, 538-547.
- DALE E., DAVIS M., FAUSTMAN D. L., 2006. *A role for transcription factor NF-kappaB in autoimmunity: possible interactions of genes, sex, and the immune response*. Adv. Physiol. Educ. 30, 152-158.
- GLEICHER N., WEINER R., VIETZKE M., 2006. *The impact of abnormal autoimmune function on reproduction: Maternal and fetal consequences*. J. Autoimmun. 27, 161-165.
- GOULD D. S., AUCHINCLOSS Jr H., 1999. *Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection*. Immunol. Today 20, 77-82.
- HORI S., NOMURA T., SAKAGUCHI S., 2003. *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science 306, 1057-1061.
- INVERNIZZI P., DE ANDREIS C., SIRCHIA S. M., BATTEZZATI P. M., ZUIN M., ROSSELLA F., PEREGO F., BIGNOTTO M., SIMONI G., PODDA M., 2000. *Blood fetal microchimerism in primary biliary cirrhosis*. Clin. Exp. Immunol. 122, 418-422.
- KANEDA T., SHIRAKI K., HIRANO K., NAGATA I., 1997. *Detection of maternofetal transfusion by placental alkaline phosphatase levels*. J. Pediatr. 130, 730-735.
- KHOSROTEHRANI K., BIANCHI D. W., 2005. *Multi-lineage potential of fetal cells in maternal tissue: a legacy in reverse*. J. Cell Sci. 118, 1559-1563.
- KHOSROTEHRANI K., GUEGAN S., FRAITAG S., OSTER M., DE PROST Y., BODEMER C., ARACTINGI S., 2005a. *Presence of Chimeric Maternally Derived Keratinocytes in Cutaneous Inflammatory Diseases of Children: The Example of Pityriasis Lichenoides*. J. Invest. Dermatol. 126, 345-348.
- KHOSROTEHRANI K., MERY L., ARACTINGI S., BIANCHI D. W., JOHNSON K. L., 2005b. *Absence of fetal cell microchimerism in cutaneous lesions of lupus erythematosus*. Ann. Rheum. Dis. 64, 159-160.
- KLINTSCHAR M., IMMEL U. D., KEHLEN A., SCHWAIGER P., MUSTAFA T., MANNWEILER S., REGAUER S., KLEIBER M., HOANG-VU C., 2006. *Fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis: a quantitative approach*. Eur. J. Endocrinol. 154, 237-241.
- KUROKI M., OKAYAMA A., NAKAMURA S., SASAKI T., MURAI K., SHIBA R., SHINOHARA M., TSUBOUCHI H., 2002. *Detection of maternal-fetal microchimerism in the inflammatory lesions of patients with Sjogren's syndrome*. Ann. Rheum. Dis. 61, 1041-1046. Arthritis Rheumat. 50, 906-914.
- LAMBERT N. C., EVANS P. C., HASHIZUMI T. L., MALONEY S., GOOLEY T., FURST D. E., NELSON J. L., 2000. *Cutting Edge: Persistent Fetal Microchimerism in T Lymphocytes Is Associated with HLA-DQA1*0501: Implications in Autoimmunity*. J. Immunol. 164, 5545-5548.
- LAMBERT N. C., LO Y. M., ERICKSON T. D., TYLEE T. S., GUTHRIE K. A., FURST D. E., NELSON J. L., 2002. *Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulating DNA? A quantitative answer*. Blood 100, 2845-2851.
- LAMBERT N. C., ERICKSON T. D., ZHEN Y., PANG J. M., GUTHRIE K. A., FURST D. E., NELSON J. L., 2004. *Quantification of maternal microchimerism by HLA-specific real-time polymerase chain reaction: Studies of healthy women and women with scleroderma*.
- LEVINE R. J., QIAN C., LESHANE E. S., YU K. F., ENGLAND L. J., SCHISTERMAN E. F., WATAGANARA T., ROMERO R., BIANCHI D. W., 2004. *Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia*. Am. J. Obstet. Gynecol. 190, 707-713.
- LIN H., KAO J., HSU H., MIZOKAMI M., HIRANO K., CHEN D., 1996. *Least microtransfusion from mother to fetus in elective cesarean delivery*. Obstet. Gynecol. 87, 244-248.
- LO E. S., LO Y. M., HJELM N. M., THILAGANATHAN B., 1998. *Transfer of nucleated maternal cells into fetal circulation during the second trimester of pregnancy*. Br. J. Haematol. 100, 605-606.
- LO Y. M., LAU T. K., CHAN L. Y., LEUNG T. N., CHANG A. M., 2000. *Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA*. Clin. Chem. 46, 1301-1309.
- MCNALLAN K. T., APONTE C., EL-AZHARY R., MASON T., NELSON A. M., PAAT J. J., CROWSON C. S., REED A. M., 2007. *Immunophenotyping of chimeric cells in localized scleroderma*. Rheumatology (Oxford) 46, 398-402.
- MOSCA M., CURCIO M., LAPI S., VALENTINI G., D'ANGELO S., RIZZO G., BOMBARDIERI S., 2003. *Correlations of Y chromosome microchimerism with disease activity in patients with SLE: analysis of preliminary data*. Ann. Rheum. Dis. 62, 651-654.
- MURATA H., NAKAUCHI H., SUMIDA T., 1999. *Microchimerism in Japanese women patients with systemic sclerosis*. Lancet 354, 220.
- NELSON J. L., 1998a. *Microchimerism and autoimmune disease*. N. Engl. J. Med. 338, 1224-1225.
- NELSON J. L., 1998b. *Microchimerism and the causation of scleroderma*. Scand. J. Rheumatol. Suppl. 107, 10-13.
- NELSON J. L., 2002. *Microchimerism: incidental by-product of pregnancy or active participant in human health?* Trends Mol. Med. 8, 109-113.
- NELSON J. L., HUGHES K. A., SMITH A. G., NISPEROS B. B., BRANCHAUD A. M., HANSEN J. A., 1993. *Maternal-fetal disparity in HLA class II alloantigens and the pregnancy-induced amelioration of rheumatoid arthritis*. N. Engl. J. Med. 329, 466-471.
- NELSON J. L., FURST D. E., MALONEY S., GOOLEY T., EVANS P. C., SMITH A., BEAN M. A., OBER C., BIANCHI D. W., 1998. *Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma*. Lancet 351, 559-562.
- NELSON J. L., GILLESPIE K. M., LAMBERT N. C., STEVENS A. M., LOUBIERE L. S., RUTLEDGE J. C., LEISENRING W. M., ERICKSON T. D., YAN Z., MULLARKEY M. E., BOESPFLUG N. D., BINGLEY P. J., GALE E. A., 2007. *Maternal microchimerism in peripheral blood in type 1 diabetes and pancreatic islet beta cell microchimerism*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 1637-1642.
- OLSEN N. J., KOVACS W. J., 1995. *Case report: testosterone treatment of systemic lupus erythematosus in a patient with Klinefelter's syndrome*. Am. J. Med. Sci. 310, 158-160.
- OZBALKAN Z., BAGISLAR S., KIRAZ S., AKYERLI C. B., OZER H. T., YAVUZ S., BIRLIK A. M., CALGUNERI M., OZCELIK T., 2005. *Skewed X chromosome inactivation in blood cells of women with scleroderma*. Arthritis Rheum. 52, 1564-1570.

- PATHAK D., PREMI S., SRIVASTAVA J., CHANDY S. P., ALI S., 2006. *Genomic instability of the DYZ1 repeat in patients with Y chromosome anomalies and males exposed to natural background radiation.* DNA Res. 13, 103–109.
- REED A. M., MCNALLAN K., WETTSTEIN P., VEHE R., OBER C., 2004. *Does HLA-Dependent Chimerism Underlie the Pathogenesis of Juvenile Dermatomyositis?* J. Immunol. 172, 5041–5046.
- RENNE C., RAMOS LOPEZ E., STEIMLE-GRAUER S. A., ZIOLKOWSKI P., PANI M. A., LUTHER C., HOLZER K., ENCKE A., WAHL R. A., BECHSTEIN W. O., USADEL K. H., HANSMANN M. L., BADENHOOP K., 2004. *Thyroid fetal male microchimerisms in mothers with thyroid disorders: presence of Y-chromosomal immunofluorescence in thyroid-infiltrating lymphocytes is more prevalent in Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease than in follicular adenomas.* J. Clin. Endocrinol. Metab. 89, 5810–5814.
- SAWAYA H. H., JIMENEZ S. A., ARTLETT C. M., 2004. *Quantification of fetal microchimeric cells in clinically affected and unaffected skin of patients with systemic sclerosis.* Rheumatology (Oxford) 43, 965–968.
- SCALETTI C., VULTAGGIO A., BONIFACIO S., EMMI L., TORRICELLI F., MAGGI E., ROMAGNANI S., PICCINNI M. P., 2002. *Th2-oriented profile of male offspring T cells present in women with systemic sclerosis and reactive with maternal major histocompatibility complex antigens.* Arthritis Rheum. 46, 445–450.
- SCARADAVOU A., CARRIER C., MOLLEN N., STEVENS C., RUBINSTEIN P., 1996. *Detection of maternal DNA in placental/umbilical cord blood by locus-specific amplification of the noninherited maternal HLA gene.* Blood 88, 1494–1500.
- SCHATTNER A., BERREBI A., 1986. *Klinefelter's syndrome associated with autoimmune disease.* J. R. Soc. Med. 40, 560.
- SELVA-O'CALLAGHAN A., MIJARES-BOECKH-BEHRENS T., PRADES E. B., SOLANS-LAQUE R., SIMEON-AZNAR C. P., FONOLLOSA-PLA V., VILARDELL-TARRES M., 2003. *Lack of evidence of foetal microchimerism in female Spanish patients with systemic sclerosis.* Lupus 12, 15–20.
- SOCIE G., GLUCKMAN E., CAROSELLA E., BROSSARD Y., LAFON C., BRISON O., 1994. *Search for maternal cells in human umbilical cord blood by polymerase chain reaction amplification of two minisatellite sequences.* Blood 83, 340–344.
- STEVENS A. M., HERMES H. M., RUTLEDGE J. C., BUYON J. P., NELSON J. L., 2003. *Myocardial-tissue-specific phenotype of maternal microchimerism in neonatal lupus congenital heart block.* Lancet 362, 1617–1623.
- STEVENS A. M., MCDONNELL M. W., MULLARKEY M. E., PANG J. M., LEISENRING W., NELSON J. L., 2004. *Liver biopsies from human females contain male hepatocytes in the absence of transplantation.* Lab. Investigat. 84, 1603–1609.
- STEVENS A. M., HERMES H. M., LAMBERT N. C., NELSON J. L., MERONI P. L., CIMAZ R., 2005. *Maternal and sibling microchimerism in twins and triplets discordant for neonatal lupus syndrome-congenital heart block.* Rheumatology (Oxford) 44, 187–191.
- THOMAS M. R., WILLIAMSON R., CRAFT I., YAZDANI N., RODECK C. H., 1994. *Y chromosome sequence DNA amplified from peripheral blood of women in early pregnancy.* Lancet 343, 413–414.
- TODA I., KUWANA M., TSUBOTA K., KAWAKAMI Y., 2001. *Lack of evidence for an increased microchimerism in the circulation of patients with Sjogren's syndrome.* Ann. Rheum. Dis. 60, 248–253.
- TURNER J. H., WALD N., QUINLIVAN W. L., 1966. *Cytogenetic evidence concerning possible transplacental transfer of leukocytes in pregnant women.* Am. J. Obstet. Gynecol. 95, 831–833.
- WHITACRE C. C., 2001. *Sex differences in autoimmune disease.* Nature Immunol. 2, 777–780.
- YAN Z., LAMBERT N. C., GUTHRIE K. A., PORTER A. J., LOUBIERE L. S., MADELEINE M. M., STEVENS A. M., HERMES H. M., NELSON J. L., 2005. *Male microchimerism in women without sons: Quantitative assessment and correlation with pregnancy history.* Am. J. Med. 118, 899–906.