

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Monika Vondříčková

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví (B5345)

Monika Vondříčková

Studijní obor: Zdravotní laborant (5345R020)

**ODLIŠENÍ ČASNÉHO HYDROPICKÉHO ABORTU
OD PARCIÁLNÍ MOLY POMOCÍ HISTOCHEMICKÝCH
A IMUNOCHEMICKÝCH METOD**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Ondřej Ondič, Ph.D.

Plzeň 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 21. 3. 2022

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Vondříčková Monika

Katedra: záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Odlišení časného hydropického abortu od parciální moly pomocí histochemických a imunochemických metod

Vedoucí práce: MUDr. Ondrej Ondič, Ph.D.

Počet stran – číslované: 41

Počet stran – nečíslované: 28

Počet příloh: 9

Počet titulů použité literatury: 22

Klíčová slova: mola hydatidosa partialis, hydropický abortus, placenta, choriové klky, imunohistochemie, histochemie, mukopolysacharidy

Souhrn:

Tato práce se zabývá analýzou mukopolysacharidů v klcích placenty za pomoci histochemických a imunohistochemických metod. Potvrdila se přítomnost kyselých mukopolysacharidů v parafinových řezech. Některé metody se ukázaly pro řešení této problematiky jako nevhodné, zatímco jiné by se v budoucnu mohly stát předmětem dalšího zkoumání.

Abstract

Surname and name: Vondříčková Monika

Department: Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Distinction of early hydropic abortion from partial mole using histochemical and imunohistochemical methods

Consultant: MUDr. Ondřej Ondič, Ph.D.

Number of pages – numbered: 41

Number of pages – unnumbered: 28

Number of appendices: 9

Number of literature items used: 22

Keywords: partial mole, hydropic abortion, placenta, chorionic villi, immunohistochemistry, histochemistry, mucosubstances

Summary:

This thesis is about analysis mucosubstances in placental villi using histochemical and imunohistochemical methods. The presence of acidic mucopolysaccharides in paraffin sections was confirmed. Some of the methods proved inappropriate to solve this issue while other methods could be the subject of further research.

Předmluva

Touto prací jsem chtěla shrnout a co nejvíce přiblížit problematiku odlišení parciální moly a hydropického abortu. Zároveň jsem se chtěla pokusit nabídnout jiné analytické možnosti, které by mohly přispět k budoucí možné diagnostice.

Poděkování

Děkuji MUDr. Ondřeji Ondičovi, Ph.D. za odborné vedení práce, poskytování odborných rad a podkladů pro psaní této práce. Děkuji paní laborantce Gabriele Suché a panu laborantovi Petru Ferczadimu, Dis., za poskytování odborných rad a pomoc v laboratoři. Děkuji Fakultní nemocnici v Plzni za možnost provedení výzkumu. A v neposlední řadě děkuji své rodině.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	10
SEZNAM TABULEK	11
SEZNAM ZKRATEK	12
ÚVOD.....	13
TEORETICKÁ ČÁST	14
1 PLACENTA	14
1.1 Vznik a vývoj.....	14
1.2 Funkce.....	15
1.2.1 Hormonální funkce	15
1.2.2 Enzymatické funkce	16
1.2.3 Placentární transport.....	16
1.3 Stavba.....	16
1.3.1 Makroskopická stavba	16
1.3.2 Histologická stavba	16
2 ČASNÝ HYDROPICKÝ ABORTUS	18
2.1 Imunitní příčiny hydropsu plodu	19
2.2 Neimunitní příčiny hydropsu plodu	19
3 GESTAČNÍ TROFOBLASTICKÁ NEMOC.....	21
3.1 Mola hydatidosa.....	21
3.1.1 Mola hydatidosa partialis (MHP)	21
3.1.2 Mola hydatidosa completa (MHC).....	22
3.1.3 Mola invasiva (proliferanc, destruens)	23
3.2 Gestační trofoblastické neoplazie	23
3.2.1 Choriokarcinom	23
3.2.2 Placental site trophoblastic tumor (PSTT).....	24
3.2.3 Epithelioid trophoblastic tumor (ETT)	25
4 VYŠETŘOVACÍ METODY UŽÍVANÉ K DIAGNOSTICE MHP	26
4.1 Imunohistochemická analýza proteinu p57	26
4.2 Cytogenetické metody	26
PRAKTICKÁ ČÁST	27
5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE	27
6 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	28
7 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	29
8 METODIKA PRÁCE	30
8.1 Přikrojení	30

8.2	Odvodnění tkání a prosycení parafínem	30
8.3	Zalévání do parafínu	30
8.4	Krájení na sáňkovém mikrotomu.....	31
8.5	Histochemické barvení	31
8.5.1	Hematoxylin-eozin (HE)	31
8.5.2	Toluidinová modř (TM)	32
8.5.3	Alciánová modř (AM)	32
8.5.4	Alciánová modř + PAS (AMP)	33
8.6	Imunohistochemické zpracování	33
8.7	Odvodnění a montování (přípravkem Pertex)	34
8.8	Světelný mikroskop	35
9	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	36
9.1	Průkaz pozitivitu jednotlivých metod	36
9.1.1	Výsledek barvení hematoxylin-eosin	36
9.1.2	Výsledek barvení toluidinovou modří	37
9.1.3	Výsledek barvení alciánovou modří	38
9.1.4	Výsledek barvení PAS reakce + alciánová modř	39
9.1.5	Imunohistochemický výsledek pozitivní reakce.....	40
9.2	Analýza vzorků	40
	DISKUZE	52
	ZÁVĚR.....	53
	SEZNAM LITERATURY.....	54
	SEZNAM PŘÍLOH	57
	PŘÍLOHY	58
	Příloha A – Pracovní postup ŠÚP HE	58
	Příloha B – Pracovní postup TM	59
	Příloha C – Pracovní postup ŠÚP AM	61
	Příloha D – Pracovní postup ŠÚP AMP.....	62
	Příloha E – Datasheet k metodě MUC-1	63
	Příloha F – Datasheet k metodě MUC-2	65
	Příloha G – Datasheet k metodě MUC-4.....	66
	Příloha H – Datasheet k metodě MUC-6.....	67
	Příloha I – Povolení sběru informací ve FN Plzeň.....	69

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Placenta MHP makroskopicky.....	22
Obrázek 2: Příklad BenchMark Ultra – Ventana	34
Obrázek 3: Výsledek barvení HE	36
Obrázek 4: Výsledek barvení TM	37
Obrázek 5: Výsledek barvení AM	38
Obrázek 6: Výsledek barvení AMP	39
Obrázek 7: Výsledek imunohistochemického barvení MUC-4.....	40
Obrázek 8: Zvláštní typ pozitivita vzorku 189/R12 (MUC-4).....	51

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Vzorek č. 16706/R8 - Fyziologická placenta	41
Tabulka 2: Vzorek č. 9149 - Placenta časného hydropického abortu	42
Tabulka 3: Vzorek č. 9485 - Placenta časného hydropického abortu	43
Tabulka 4: Vzorek č. 9488/A - Placenta časného hydropického abortu	44
Tabulka 5: Vzorek č. 9488/B - Placenta časného hydropického abortu.....	45
Tabulka 6: Vzorek č. 9488/C - Placenta časného hydropického abortu.....	46
Tabulka 7: Vzorek č. 5585/R2 - Placenta časného hydropického abortu.....	47
Tabulka 8: Vzorek č. 5585/R7 - Placenta časného hydropického abortu.....	48
Tabulka 9: Vzorek č. 189/R2 - Placenta s prokázanou parciální molou	49
Tabulka 10: Vzorek č. 189/R12 - Placenta s prokázanou parciální molou	50

SEZNAM ZKRATEK

AM	alciánová modř
AMP	alciánová modř + PAS
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ETT	epitheloid trophoblastic tumor
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
GTN	gestační trofoblastická nemoc
hCG.....	lidský choriový gonadotropin
HE	hematoxylin-eosin
HON.....	hemolytické onemocnění novorozence
MHC	mola hydatidosa complenta
MHP.....	mola hydatidosa partialis
min	minuta
MP.....	mola proliferanc (invaziva)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PSTT	placental site trophoblastic tumor
PTI	perzistující trofoblastická invaze
STR	short tandem repeats
ŠÚP	Šiklův ústav patologie
TI	trofoblastická invaze
TM	toluidinová modř

ÚVOD

Histologické odlišení časného hydropického abortu a molární gravidity je obtížné a může vyžadovat použití metod molekulární genetiky. Nesprávná včasná diagnostika může vést k prodlevě umožňující rozvoj trofoblastové nemoci.

V minulosti proběhly studie zkoumající DNA, proteiny či se právě specializovaly na analýzu mukopolysacharidů nebo jejich částí. Část těchto výzkumů významně přispěla k diagnostice. Nepochybně však zůstává prostor pro další výzkum. Tato práce vznikla v návaznosti na práci z roku 1992 (pod vedením Saula Sustera), zkoumající sulfátové mukosubstance.

Teoretickou část tvoří stručné shrnutí a přiblížení problematiky. V praktické části se zaměřím na samotný proces analýzy v laboratoři, jednotlivé metody a následně na průkaz kyselých mukopolysacharidů a jejich případné charakteristiky pomocí imunohistochemických protilátek.

V případě pozitivních výsledků tento pilotní projekt může být podkladem pro větší studii v budoucnosti.

TEORETICKÁ ČÁST

1 PLACENTA

1.1 Vznik a vývoj

Ve vejcovodu se čerstvě oplozené vajíčko (vzniká nová diploidní zygota spojením dvou haploidních sad chromozomů) začne po několika hodinách mitoticky dělit (neboli rýhovat) díky dělicímu tělísku obsaženému v krčku spermie. Tímto procesem vzniká tzv. morula (asi 3 dny po oplození) putující následně do dělohy (kam doputuje kolem 4. – 6. dne po oplození). Během 6. dne vývoje zárodku dochází k nidaci (= uhníždění). V děloze se začíná *zona pellucida* na povrchu moruly stávat propustnější a dochází k nasávání vody za vzniku velkých mezibuněčných prostor, kdy se tímto jevem stává z moruly blastocysta (*zona pellucida* zaniká). Blastocysta je po obvodu ohraničena trofoblastem, na jehož části vnitřní stěny ulpívá embryoblast (složen z pluripotentních buněk) a zbytek dutiny je vyplněn tekutinou. Embryoblast tvoří základ embrya (zárodečné listy, ze kterých během organogeneze vznikají na konci 2. měsíce jednotlivé orgány) a amnionu (= blána; vak vyplněný plodovou vodou). Trofoblast tvoří zase základ chorionu (zárodečného obalu), ze kterého později vzniká placenta. Trofoblast proniká do *decidua basalis* (těhotensky přeměněná děložní sliznice), ničí endotel a mateřská krev se dostává do kontaktu s choriem. Buňky trofoblastu nejprve tvoří síť, později se prolifерují do sloupků dvou vrstev, a sice do cytotrofoblastu (později zaniká) krytým syncytiotrofoblastem. Do těchto sloupků vrůstá extraembryonální mezoderm, jehož vaskularizací krví plodu se tvoří choriové klky. Klky se rozvětvují, od velkých větví *aa. umbilicalis* (tepny pupečníku, obsahuje odkysličenou krev) až po kapiláry v terminálních klcích, kde se krev okysličuje a pokračuje do *v. umbilicalis* (žíla pupečníku). Krev plodu se s krví matky nemísí. Časem choriové klky atrofují a mizí tak z velké části povrchu choria, naopak směrem k *decidua basalis* hypertrofují a tvoří placentu. Ta prorůstá až do části myometria, čímž je zajištěno dostatečné zásobení mateřskou krví. Vývoj placenty končí ve 12. týdnu těhotenství, přesto roste až do 36. – 38. týdne těhotenství. (1) (2)

1.2 Funkce

Placenta plní hned několik funkcí. Zásobuje plod živinami a kyslíkem, naopak odvádí i metabolity plodu, dále funguje jako bariéra proti infekčním agens a tvoří se zde velké množství hormonů a enzymů nezbytných pro fyziologický průběh těhotenství. (2)

1.2.1 Hormonální funkce

1.2.1.1 Lidský choriový gonadotropin (hCG)

Biochemicky se jedná o glykoprotein složený ze dvou řetězců aminokyselin (podobná struktura jako luteinizační hormon). Je produkován trofoblastem, konkrétněji syncytiotrofoblastem, a má za úkol zabránit degradaci žlutého tělíska (lat. *corpus luteum*). Uplatňuje se při vývoji gonád, nadledvin a zevního genitálu plodu. Na základě detekce hCG v moči fungují běžně dostupné jednorázové těhotenské testy. Fyziologicky nabývá hCG nejvyšších koncentrací 8-11 týden těhotenství. (1)

1.2.1.2 Lidský placentární laktogen (hPL)

Peptid strukturou podobný růstovému hormonu. Vzniká v syncytiotrofoblastu a jeho role není zcela jasná. Pravděpodobně spouští proces lipolýzy tukových zásob matky za vzniku volných mastných kyselin a glycerolu. Glycerol se dále metabolizuje na glukózu, kterou plod může dobře využít jako zdroj energie. (1)

1.2.1.3 Progesteron

Steroidní hormon vznikající z cholesterolu. Koncentrace progesteronu během těhotenství stále stoupá a je nezbytný pro jeho udržení tím, že brání navození menstruačního cyklu a předčasným kontrakcím, které by mohly vést ke spontánnímu potratu, naopak dává impulz pro vývoj mléčné žlázy, zvyšuje tvorbu hlenu v děložním hrdle (též by kvůli jejich chybění mohlo dojít k potratu). Z počátku se jedná o produkt žlutého tělíska, kolem 12. týdne přebírá produkci progesteronu plně funkční placenta. (1)

1.2.1.4 Estrogeny

Jedná se o skupinu steroidních hormonů, mezi kterými jsou nejdůležitější: estron, estriol a 17-beta-estradiol. Dehydroepandrosteron vzniká v kůži nadledvin plodu (od 12. týdne). V podstatě se jedná o prekurzor, který je v játrech plodu následně hydroxylován a ve finále působením placentární sulfatázy přeměňován na estriol, který se uvolňuje do krve matky, proto se dříve stanovení estriolu v krvi/moči matky používalo jako ukazatel funkce placenty. (1)

1.2.2 Enzymatické funkce

Ze škály enzymů, které placenta produkuje, má poměrně zajímavý diagnostický význam průkaz histaminázy. Snížené hodnoty histaminázy prokazují potrat, naopak extrémně zvýšené hodnoty se objevují při tumorech trofoblastu. Histamináza společně s monoaminoxidázou a angiotonázou (jejichž substráty jsou aminy: histamin, adrenalin a angiotonin) mají pravděpodobně určitou ochrannou funkci v organismu matky. Z hlediska stanovení lze považovat za zajímavý enzym oxytocináza u kterého víme, že s délkou fyziologického těhotenství stoupá a těsně před porodem dosahuje nejvyšších hodnot. Při patologickém těhotenství slouží jeho stanovení spíše k určování prognózy. (1)

1.2.3 Placentární transport

Transport látek placentární bariérou ovlivňuje: průtok krve placentou, uspořádání maternofetální cirkulace aneb povrchová plocha dostupná pro transfer, rozdíl koncentrací v oběhu matky a plodu, tloušťka placentární membrány a hlavně fyzikálně-chemické vlastnosti konkrétní látky (prostorová konfigurace, molekulová hmotnost, stupeň ionizace, rozpustnost, elektrický náboj atd.). „*Pro některé látky existuje v placentě specifický, usnadněný transport, umožňující rychlejší vstřebávání než by to odpovídalo koncentračnímu gradientu.*“⁽³⁾ Mechanizmy transportu látek: prostá difúze (dýchací plyny, voda), facilitovaná difúze (glukóza, laktát), pinocytóza (imunoglobuliny, fosfolipidy, lipoproteiny), aktivní transport (aminokyseliny, některé ionty), průnik paracelulárními otvory, metabolická konverze (glukuronidizace, sulfurace, acetylace, konjugace glutathionu). (1)

1.3 Stavba

1.3.1 Makroskopická stavba

Makroskopicky se jedná o miskovitý, bohatě krevně zásobený orgán tmavé barvy, s houbovitou konzistencí. Nabývá hmotnosti asi 500 g, v průměru dosahuje délky 15 – 20 cm o tloušťce 3 cm. Orgán je krytý blánou (amniem) vybíhající v pupečník, který dosahuje délky zhruba 50 cm. (1) (4)

1.3.2 Histologická stavba.

Histologická stavba je rozdělena na tzv. fetální (plodovou) část a maternální (mateřskou) část:

- Maternální část (vzniklá z děložní sliznice) jsou v podstatě velké krevní prostory (intervilózní prostor) a deciduální sliznice endometria – objemné buňky se světlou cytoplazmou a velkými jádry (mohou být i dvoujaderné).

- Fetální část se skládá z choriové plotny z níž vyrůstají klky. Syncytiotrofoblast představuje výrazné bazofilní (tmavé) buňky s velkým množstvím ribosomů a jader, na tuto vrstvu naléhá nesouvislá vrstva světlých kubických buněk s kulatým jádrem a chromofobní cytoplazmou, označujeme tuto vrstvu jako cytotrofoblast (též Langhansovy buňky). Pod těmito buňkami se nachází mezenchym obsahující primitivní makrofágy (Hofbauerovy buňky), v mikroskopu světlá část obsahující cévy.

(1) (4)

2 ČASNÝ HYDROPICKÝ ABORTUS

Dle zákona č. 372/2011 § 82 Sb., o zdravotnických službách, se plodem po potratu rozumí plod, který po úplném vypuzení nebo vynětí z těla matčina neprojevuje ani jednu ze známek života a současně jeho porodní hmotnost je nižší než 500 g, a pokud ji nelze zjistit, jestliže je těhotenství kratší než 22 týdnů. Biologickými zbytky potratu se především rozumí placenta a těhotenská sliznice.

Potrat (latinsky abortus) můžeme rozdělit podle různých hledisek. A to z hlediska trvání těhotenství na časný (tj. ukončení těhotenství do 12 týdne) a pozdní, dále z hlediska průběhu na spontánní (dochází k vypuzení z těla) a zamlklý (plod v těle zůstává, ale nejeví známky života) nebo dle příčiny na samovolný (není vyvolán žádným zevním zásahem) a indukovaný (= interrupce; umělé přerušování těhotenství). (5) (6)

Hydrops (neboli vodnatelnost) plodu je hromadění tekutiny v tělních dutinách plodu (ale z pravidla i placenty), které vzniká jako důsledek nejrůznějších onemocnění.

Edém vzniká na podkladě:

1. Zvýšeného hydrostatického tlaku v kapilárách:

- městnavé srdeční selhání při: těžké fetální anémii, strukturální srdeční vadě, arytmií
- obstrukce žilního návratu k srdci
- portální hypertenze při obstrukci jaterních sinusoid extramedulární hematopoezou

2. Sníženého onkotického tlaku plazmy:

- snížená syntéza albuminu fetálními játry může být důsledkem hypoperfuze jater, přetížení jater při zvýšené extramedulární hematopoeze, poškození infekcí

3. Zvýšené propustnosti kapilár:

- poškození endotelu při generalizovaných infekcích

4. Sníženého odtoku lymfy

Příčiny vzniku těchto změn můžeme klasifikovat jako imunitní a neimunitní. (7)

2.1 Imunitní příčiny hydropsu plodu

Příčinou imunitního hydropsu je hemolytické onemocnění novorozence (HON), kdy organismus matky po předchozí imunizaci vytváří Ig G protilátky pronikající přes placentu. Tyto protilátky napadají erytrocyty plodu a dochází tak k rozvoji hemolytické anémie plodu. S nedostatečnou oxygenací tkání plodu dochází k uplatňování kompenzatorních mechanismů. Dochází k vyplavování mladších vývojových forem erytrocytů (erytoblastóza), rozvoji extramedulární hematopoézy a zvýšení srdečního výdeje. Důsledkem je městnavé srdeční selhání s následným generalizovaným edémem. Příčinou imunizace matky je předešlé setkání s inkompatibilní krví. Nejčastěji dochází k imunizaci v Rh systému a jejich antigenům, ale mohou imunizovat i jiné erytrocytární antigeny např. Kell nebo Lewis (méně časté). Imunizace probíhá například při porodu/potrátu prvního dítěte za předpokladu, že matka je RhD-negativní a plod RhD-pozitivní (v tomto případě nastává riziko u dalších gravidit), dále při invazivních porodnických vyšetřovacích metodách, předešlých transfúzích matky (Kell) nebo při i.v narkomanii. Dnes se jako prevence aplikuje všem rodičkám Anti RhD imunoglobulin. (7)

2.2 Neimunitní příčiny hydropsu plodu

Příčiny neimunitního hydropsu jsou velice rozmanité a ne vždy lze příčina přesně stanovit (tzv. idiopatický hydrops). (7)

Mezi hematologické příčiny můžeme zařadit homozygotní α thalasemii, hemolytické anémie, syndrom fetu-fetální transfúze dvojčat (TTTS) – kdy z monochoriální placenty dochází k disbalanci krevní sítě mezi plody. (7)

Kardiovaskulární příčiny bývají strukturální srdeční vady (např. Ebsteinova malformace, předčasný uzávěr foramen ovale aj.), nestrukturální srdeční vady, cévní malformace s propojením žilního a arteriálního oběhu, supraventrikulární tachyarytmie plodu, nádory srdce (rhabdomyom), acardius (tj. parazitické samostatně neživotaschopné dvojče, žijící z oběhu životaschopného plodu) nebo bradykardie při komplexních srdečních malformacích (např. defekt AV septa). (7)

Další příčinou hydropsu plodu mohou být tzv. TORCH (intrauterinní) infekce. Mezi tyto infekce patří toxoplazmóza, rubeola, cytomegalovirová infekce, herpes simplex, ale také

např. pátá nemoc, za kterou je odpovědný lidský *parvovirus B19*. Virus prochází transplacentárně, napadá erytrocytární prekruzory plodu, což může vést až k potratu. Dalším infekčním onemocněním ohrožující plod je syfilis. *Treponema pallidum* má taktéž schopnost procházet placentou a poškozovat plod. V případě pozitivního screeningového vyšetření těhotné lékař indikuje léčbu penicilinem, aby předešel případnému přenosu spirochety na plod. (7)

Metabolických vad spojovaných s hydropsem existuje celá řada. Jednou z nich je například Gaucherova choroba. Jedná se o autosomálně recesivní onemocnění, která má za následek nedostatečnou aktivitou některého z lysosomálního enzymu a dále ukládání nede-gradovaného substrátu v lysozomech různých tkání a orgánů. (8)

Hydrops plodu mohou způsobit taktéž tumory a pseudotumory dutiny břišní a hrudní. Příkladem může být: brániční hernie (kýla), polycystické ledviny, kongenitální nádory (neuroblastom), aj. (7)

Chromozomální aberace a genetická onemocnění mohou mít též za následek hydrops. Mezi aberace patří trisomie nebo Turnerův syndrom. Do onemocnění bychom mohli zařadit tuberózní sklerózu (TSC) nebo například chondrodysplazii. (7)

3 GESTAČNÍ TROFOBLASTICKÁ NEMOC

Gestační trofoblastickou nemoc je stav, kdy se trofoblast vymyká normálnímu růstu bez reakce na kontrolní mechanismy. V těhotenství trofoblast fyziologicky (a kontrolovaně) velice rychle roste a proniká do deciduy, s možností infiltrace do plic a dalších orgánů. Po ukončení těhotenství (porod, potrat, gravidis extrauterina) trofoblastová invaze (TI) regreduje během několika dnů. Referenční mez pro fyziologický ústup invaze se považuje doba 30 dnů, kdy uplynutím této doby doprovázené pomalým poklesem hCG, hovoříme o perzistující (též přetrvávající) trofoblastické invazi (PTI). (9)

Gestační trofoblastickou nemoc klasifikujeme dle WHO od r. 1984 na 11 klinických jasně histopatologicky a cytogeneticky definovaných klinických jednotek. Těmito jednotkami jsou: trofoblastická invaze (TI), perzistující trofoblastická invaze (PTI), mola hydatidosa partialis (MHP), mola hydatidosa completa (MHC), mola proliferans (MP), choriokarcinom (CH), choriokarcinom syncytiotrofoblastický (CH-Syn), choriokarcinom cytotrofoblastický (CH-Cyt), choriokarcinom disociovaný (CH-Dis), choriokarcinom nediferencovaný (CH-Ned), perzistující trofoblastická nemoc (PTN). (10)

Perzistující trofoblastická nemoc (PTN) označuje stav, kdy po odsátí dutiny děložní neklesá nebo naopak stoupá hodnota hCG v organismu, což značí stálou přítomnost buněk trofoblastu v organismu. Může se jednat o rezidua moly v děloze (nedostatečné odstranění) nebo i o invazivní molu či choriokarcinom. (7)

3.1 Mola hydatidosa

Jednotlivé druhy se od sebe liší klinickými projevy, histologickými změnami, cytogeneticky i prognózou. (10)

Diagnostika hydatidózních mol může být prováděna pouze na základě morfologického zhodnocení za předpokladu, že jsou dobře patrné charakteristické změny. (11)

3.1.1 Mola hydatidosa partialis (MHP)

Parciální (též částečná či inkompletní) mola vzniká patologickou fertilizací vajíčka, kdy je jedno vajíčko oplodněno buď dvěma spermii, nebo jednou diploidní spermii. V obou případech vzniká triploidní mola hydatidosa partialis 69XXY nebo 69XXX, kdy poměr genetické informace matka a otec je 1 : 2. Příčina tohoto jevu zatím známá není. Naměřené hodnoty hCG nabývají z pravidla hodnot jako při fyziologickém těhotenství. Malformované embryo se zakládá, následně samovolně odumírá během prvního trimestru (KO:

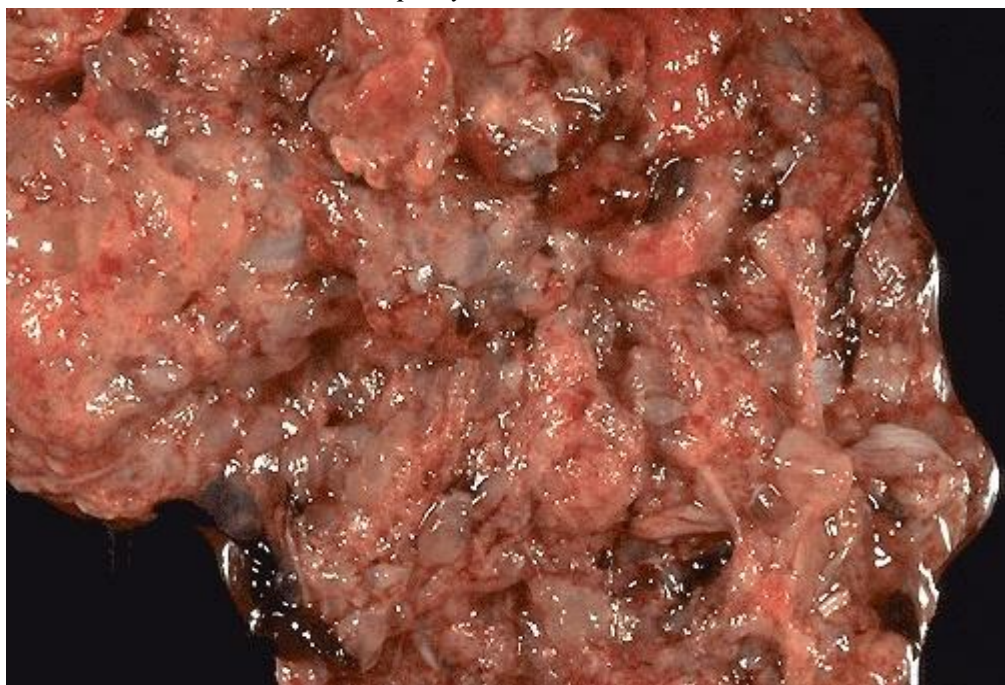
zamlklý potrat). Skutečný počet MHP dalece převyšuje počet diagnostikovaných. MHP po většinou končí jako potraty, které nejsou v histologické laboratoři vyšetřovány. (9)

Z histologického hlediska se trofoblast proliferuje fokálně, nenalzáme žádné buňčné atypie. Klky jsou vaskularizované, kdy část z nich je edematózně zvětšená a část je normálních (tedy výskyt dvou typů/populací). Diagnóza se stanovuje histopatologickým a cytogenetickým vyšetřením. Obecně triploidie jsou jednou z nejčastějších chromozomálních aberací, tudíž i nejčastější aberací vyšetřovanou u časných potratů. (7)

Terapie spočívá ve vyprázdnění děložní dutiny (vakuumexhauscí), revize dutiny děložní (kyretáž) a dále sledování poklesu hladiny hCG (každý týden) do negativity. (10)

Zhruba u 0,5 – 5% pacientek s parciální molou vzniká perzistující trofoblastická nemoc. MHP však prakticky nemalignizuje. (9)

Obrázek 1: Placenta MHP makroskopicky



Zdroj: <https://webpath.med.utah.edu/PLACHTML/PLAC066.html>

3.1.2 Mola hydatidosa completa (MHC)

Úplná hydatidózní mola vzniká patologickou fertilizací vajíčka, kdy všechny chromozomy pocházejí od otce. Existují dvě cesty vzniku tohoto onemocnění. Buď dochází k oplodnění tzv. prázdného vajíčka (empty egg) dvěma spermii nebo je prázdné vajíčko oplodněno haploidní spermii, která se endoreduplikuje. Ve výsledku vznikne diploidní sada chromozomů 46XX nebo 46XY (matka a otec je 0 : 2). Oproti parciální mole naměříme

hodnoty hCG extrémně zvýšené. Plod vždy chybí. K odhalení kompletní moly (při dnešní dostupnosti UZ vyšetření) dochází již v prvním trimestru, kdy nalézáme četné echogenní odrazy od hrozníčků moly (tzv. „sněžná bouře“). Klinické znaky se objevují až počátkem druhého trimestru, tudíž se dnes s nimi téměř nesetkáme. Histopatologická diagnostika se tímto časným záchytem lehce ztížila tím, že histologické znaky nejsou již v prvním trimestru tak zřetelné, jako by byly ve druhém trimestru. (9) (12)

U časně kompletní moly (diagnostika v prvním trimestru) nalézáme ve stromatu klků mírný edém (bez patrných prázdných prostor), stroma je hypercelulární s bazofilním nádechem a karyorhexí (tzn. rozpad jader). Trofoblast proliferuje fokálně nebo difúzně. Při pozdější diagnostice placenta vypadá jako trs hroznů. Nalézáme výrazně endematózní, avaskulární klky, kdy některé z nich v sobě ukrývají prázdné prostory. Trofoblast proliferuje difúzně po obvodu klků a lze pozorovat i buněčné atypie. (7)

Terapie je stejná jako u MHP. Komplikace perzistující trofoblastické nemoci se vyskytuje u 15 – 20% žen s MHC. Zhruba u 2% případů mola malignizuje. (7)

3.1.3 Mola invasiva (proliferanc, destruens)

Invazivní molou se může stát parciální i kompletní mola. Jde o agresivní nenádorové onemocnění s vlastnostmi jako maligní nádor. Vyznačuje se enormní proliferací buněk trofoblastu (vzestup hCG), které pronikají do myometria a cév. Mohou putovat do pochvy, plic či mozku, kde regredují. K malignizaci dojít může, avšak léčitelnost je stoprocentní. (7) (9)

Histologickou diagnózu lze stanovit pouze z resekátu postiženého orgánu (např. plic), což není běžný postup. Proto se zahajuje léčba chemoterapií i bez histologického potvrzení invazivní moly. (7)

3.2 Gestační trofoblastické neoplazie

3.2.1 Choriokarcinom

Jde o maligní epitelový nádor vycházející z buněk trofoblastu. (13)

„Historicky byl prvním solidním nádorem s metastázami, který byl vyléčen chemoterapií.“⁽¹³⁾ Jednalo se o výzkum z roku 1956, kdy byl na tomto druhu nádoru zkoumán účinek metothrexátové terapie. (14)

U zhruba 50 % případů předchází choriokarcinomu MHC, u 25 % předchází fyziologické těhotenství zakončené porodem a ve 25 % předchází těhotenství zakončené potratem. Vzácně choriokarcinomu předchází mimoděložní těhotenství. Choriokarcinom metastazuje nejčastěji do plic, pochvy a mozku za pomoci hematogenní cesty. Příznaky mohou být různorodé, podle místa výskytu metastáz (např. dušnost, nepravidelné krvácení z děložní dutiny či krvácení do mozku). Vzniká s odstupem jednoho měsíce, až dvou let od ukončení předešlého těhotenství. Hladiny hCG jsou vždy extrémně zvýšené. (10) (9)

Makroskopicky nalézáme v děloze ložisko připomínající uzel, avšak u 20 % případů lze nalézt pouze metastázy, z důvodu nekrotického rozpadu ložiska. (7)

Histologicky choriokarcinom netvoří choriové klky, ložiska bývají prokrváčená a provází je značná nekróza. V mikroskopu můžeme nalézt dva druhy atypických nádorových buněk syncytiotrofoblastu a cytotrofoblastu. Jelikož se jedná o epitelový karcinom, lze ho prokázat imunohistochemickým stanovením na cytokeratiny (pozitivní reakce) (7)

Léčí se chemoterapií, u rezistence na chemoterapii případně jiných komplikací se indikuje chirurgická léčba. Chemoterapie je individualizována podle WHO skóre do čtyř tříd podle: věku, ukončení předcházejícího těhotenství, intervalu od ukončení předchozího těhotenství, předléčebné hladiny hCG, počtu metastáz, lokalizace metastáz, rozměru největšího nádoru včetně dělohy a předchozí terapie. (10)

3.2.2 Placental site trophoblastic tumor (PSTT)

Vzácný typ nádorového onemocnění (patřící do skupiny gestační trofoblastické neoplazie) vycházející z intermediálního trofoblastu infiltrující myometrium. Nejčastěji postihuje ženy starší 35 let. Na rozdíl od choriokarcinomu měříme nízké hladiny hCG, což není charakteristické pro malignitu. Tento typ nádoru bývá povětšinou benigního charakteru, ale může vykazovat i agresivně maligní chování se zakládáním metastáz. Roste velmi pomalu. Nejčastějším výskytem metastáz jsou plíce a jako u jediného nádorového onemocnění z této skupiny metastazuje do lymfatických uzlin. Diagnostika je prováděna za pomoci imunohistochemických metod, kdy buňky vykazují pozitivitu na humání placentární laktogen a ostatní extravilózní trofoblastické markery. Tento typ nádoru bývá indikací k chirurgické léčbě. Pokud se metastatická ložiska nachází v přístupné lokalitě, indikuje se extirpace. I tak je po operaci indikována kombinovaná chemoterapeutická léčba, z důvodu poměrně vysoké chemorezistence této maligní varianty. (9) (15)

3.2.3 Epithelioid trophoblastic tumor (ETT)

Raritně se vyskytující nádor. Klinické znaky se shodují s PSTT, avšak z hlediska histopatologie se liší. Metastazuje zhruba ve třetině případů. (9)

Mikroskopicky bývá nádor složen z relativně jednotné populace mononukleárních intermediárních trofoblastických buněk tvořících hnízda obklopená rozsáhlou nekrózou. Růstový vzorec ETT připomíná trofoblastický tumor v místě placenty v mnohem větší míře než choriokarcinom, který je charakterizován dimorfní populací trofoblastu. (16)

4 VYŠETŘOVACÍ METODY UŽÍVANÉ K DIAGNOSTICE MHP

4.1 Imunohistochemická analýza proteinu p57

Jaderný protein p57kip2 patří do skupiny inhibitorů kináz buněčného cyklu. Přesněji se jedná o produkt otcovsky otištěného, mateřsky exprimovaného genu CDKN1C, cyklin-dependentní inhibitor kinázy lokalizovaný na chromozomu 11p15.5. Při interpretaci výsledků imunohistologického vyšetření proteinu p57, se posuzuje exprese jaderné positivity v cytotrofoblastu, ve stromálních buňkách, ale i v intermediálním trofoblastu i v mateřské decidue. Pozitivita jader intermediálního trofoblastu a decidui slouží jako vnitřní pozitivní kontrola. Ukázalo se, že kvůli absenci maternálního podílu genetické informace u MHC, je exprese p57 v buňkách stromatu a cytotrofoblastu velmi omezená nebo se vůbec nenachází. Naproti tomu u MHP a nemolárních abortů je maternální část přítomna a expresi p57 v těchto typech buněk nalézáme. Pro odlišení MHP a nemolární gravidity je zapotřebí užití jiných metod. (11) (17) (18)

4.2 Cytogenetické metody

Metody mají za úkol odhalit triploidii a zároveň určit, zda převažuje genetická informace matky či otce. „*Nevýhodou těchto vyšetření jsou jejich nároky na kvalitu dodaného vzorku. Ne vždy se ze zaslaného materiálu podaří DNA izolovat. K izolaci DNA se nejlépe hodí čerstvá tkáň, tedy taková, která nebyla fixována v médiu.*“⁽¹⁹⁾ Převažuje-li otcovská část, jedná se o MHP. Pokud převažuje mateřská genetická informace, jde o nemolární graviditu.

Nejlepší diagnostiku poskytuje STR genotypizace DNA metodou PCR. Díky krátkým tandemovým repetitívám (neboli mikrosatelitům) nacházejících se podél celého genomu, lze odlišit podíl maternální a paternální sady chromozomů. U metod FISH (fluorescenční in situ hybridizace), průtokové cytometrie či vyšetření karyotypu odlišit maternální a paternální část genetické informace nelze. U nespecifických diploidních vzorků nelze odlišit ranou formu MHC od nemolárních gravidit (morfologicky mohou být v rané fázi prakticky neodlišitelné) a stejně tak u triploidních vzorků nelze odlišit, zda se jedná o MHP či nemolární triploidii. Z tohoto důvodu tyto metody nejsou pro diagnostiku vhodné. (11) (20) (21)

PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

Zjistit, zda lze využít k odlišení molární a ne-molární gravidity některé histochemické metody a dosud za tímto účelem nestudované imunohistochemické protilátky na základě analýzy mukopolysacharidů v tkáňových řezech.

6 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

- 1) Je složení popřípadě množství mukopolysacharidů v choriových klcích placenty časného hydropického abortu a placenty parciální moly skutečně odlišné?
- 2) Dokáží vybrané metody tuto případnou odlišnost interpretovat?

7 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Z archivovaných parafinových tkáňových bločků Šiklova ústavu patologie bylo vybráno 7 bločků placent časného hydropického abortu, 2 bločky placent abortu s prokázanou parciální molou. Poslední bloček byl námi zhotoven též parafinovou technikou z fyziologické placenty (kontrolní vzorek). Z každého bločku vzniklo osm sklíček zpracovaných osmi různými metodami.

8 METODIKA PRÁCE

8.1 Přikrojení

Probíhá po přijetí nativního nebo fixovaného materiálu do histologické laboratoře na přikrajovacím stole opatřeným: digestoří, umyvadlem, diktafonem (případně fotoaparát) a potřebným vybavením typu skalpel, tuž, tkáňové bločky apod.

Lékař nadiktuje číslo vzoru, identifikaci pacienta a typ materiálu. Nejprve si orgán zorientuje a provede (makro)popis, tzn. rozměry, zbarvení, viditelné změny, konzistence apod. Následně se vyberou místa pro přikrojení. Řez by měl být veden tak, aby vzorek obsahoval všechny přítomné vrstvy tkáně. Takto zhotovený vzorek laborant uzavírá do příslušných biokazet, obsahující číslo biopsie a číslo pacienta. Počet kazet, jejich označení a počet vzorků v kazetě musí odpovídat údajům zapsaných laborantem na zadní straně žádanky. Tyto biokazety putují k dalšímu zpracování do autotechnikonu.

Zbytek materiálu se v laboratoři uchovává ve fixační tekutině do doby stanovení finální diagnózy.

8.2 Odvodnění tkání a prosycení parafínem

Probíhá v autotechnikonu, kdy se biokazety vkládají do kovového košíku, ve kterém přístrojem putují. Příklad přístroje košík přemísťuje v určitých časových intervalech do alkoholových lázní. Lázně jsou seřazené vzestupně dle koncentrace alkoholu, aby došlo k řádnému odvodnění tkání a možnosti tak prosycení tkáně parafínem, který je s vodou nemísitelný. Začíná v 60 % ethanolu, dále jde do 70 %, 80 % a 96 % ethanolu, pokračuje lázněmi s acetonem, s acetonem smíchaným s xylenem, xylenem a v závěru rozehrátým parafínem. Po tomto procesu se košík s kazetami vyjme z přístroje ven, kazety se vyskládají na teplou desku a otevřou.

8.3 Zalévání do parafínu

K zalévání se používá zalévací parafínová linka („zalévadlo“). Zde jsou k dispozici kovové „formičky“ na jejíž dno se nalije pomocí „zalévadla“ malé množství parafínu (aby nedošlo k přilepení tkáně ke dnu této formičky). Na tuto vrstvu se pokládá pomocí zahřáté pinzety vzorek tkáně z kazety a celá „formička“ se přesune na chladicí desku k utužení. Následně se na „formičku“ nasadí původní označená plastová biokazeta a celé se to zalije až po okraj biokazety. Nechá se to celé opět zatuhnout na chladicí podložce, načež se

pak odloupne kovová „formička“ a vzniklý bloček se uchovává v chladu do dalšího zpracování.

8.4 Krájení na sáňkovém mikrotomu

Sáňkový mikrotom slouží ke krájení tenkých řezů, které se ihned po ukrojení ukotvují na podložní sklíčka. Pro většinu histochemických barvení se krájí řezy o tloušťce 2 – 4 μm a nanáší se na klasická podložní sklíčka. Co se imunohistochemických metod týče, krájí se řezy tlusté 1 μm a řezy se nanášejí na speciální podložní sklíčka značky TOMO. Postupuje se tak, že se do přístroje vloží žiletka a do neapolské svorky bloček, dále se pomocí šroubu nastaví požadovaná tloušťka řezu. Za pomoci makrošroubu se svorka se stolkem posune pod žiletku a okrají horní část parafínu bez tkáně. Následně se pohybuje pouze mikrošroubem posouvající stolek o vzdálenost, jež se na začátku nastavila. Řezy se opatrně sjímají ze žiletky a pokládají se na studenou vodní hladinu. Na té se pomocí preparačních jehel řezy rovnají, orientují a natahují. Za pomoci podložního skla se řezy přenesou do teplé vody (o teplotě asi 48 °C), nechají se finálně napnout, pomocí preparačních jehel se řez uchytí k podložnímu sklíčku a tahem sklíčka z vodní hladiny řez ke sklíčku přilne.

U imunohistochemických metod se nesmí zapomenout na TOMO sklíčka přikrojit a natáhnout pozitivní tkáňová kontrola (definovaná pro příslušnou metodu), aby bylo patrné, zda reakce opravdu proběhla správně (popřípadě, jak se má pozitivita projevat).

8.5 Histochemické barvení

Barvení, použita za účelem této práce jsou vodné roztoky (tudíž s parafínem nemísitelná), sklíčka proto musí být před zahájením jakéhokoliv z následujících barvení odvodněna do destilované vody, což znamená, že sklíčka putují (buď manuálně v kyvetách, nebo lázních v tzv. barvicím automatu, který po nastavených časech automaticky přesouvá sklíčka z jedné lázně do druhé) do systému lázní obsahující sestupnou řadu alkoholů, kde musí strávit definovaný čas. Začíná se v xylenových lázních, dále v acetonových lázních, následně v řadě lázní počínajících 96 % ethanolem, pokračujíc 80 % a 70% ethanolem, konče destilovanou vodou.

8.5.1 Hematoxylin-eozin (HE)

Jedná se o základní přehledné barvení používané v každé laboratoři. V provozu jej provádí barvicí automat.

8.5.1.1 Příprava roztoků

Na 2 litry roztoku Gillova hematoxylinu se naváží: 8 g hematoxylinu, 0,8 g jodičnanu sodného a 70,4 g síranu hlinitého. Každá navážka se rozpustí v destilované vodě (celkový objem činí 1420 ml destilované vody) zvlášť a jednotlivé roztoky se smíchají v jeden. Následně se přidá 500 ml ethylenglykolu. Roztok se promíchá a nakonec se přidá 80 ml ledové kyseliny octové.

Pro přípravu roztoku Eosinu se naváží 10 g Eosinu - žlutavého rozpustného ve vodě a 5 g dvojchromanu draselného. Navážky rozpustíme v 800 ml destilované vody. Po rozpuštění se přidá 100 ml nasyceného roztoku kyseliny pikrové a 100 ml čistého/absolutního alkoholu.

8.5.1.2 Postup samotného barvení HE

Odparafinovaná sklíčka se vnoří na 7 min do roztoku Gillova hematoxylinu. Dále se sklíčka nechají diferencovat v kyselém alkoholu. Sklíčka v kyvetě se vloží pod slabý proud vody a nechají se pár minut proprat („modrat“). Sklíčka přemístíme na 1 min do roztoku Eosinu a nakonec opláchneme destilovanou vodou.

8.5.2 Toluidinová modř (TM)

8.5.2.1 Příprava roztoku toluidinové modři

Pro přípravu 200 ml toluidinové modři se naváží 0,2 g toluidinové modři, která se rozpustí ve 200 ml destilované vody. Vzniklý roztok se přefiltruje do zásobní lahve.

8.5.2.2 Postup samotného barvení TM

Odparafinovaná sklíčka se pokapají 0,1 % roztokem toluidinové modři, který se nechá působit 20 min. Po uplynutí této doby se sklíčka opláchnou v destilované vodě.

8.5.3 Alciánová modř (AM)

Použité roztoky jsou náročné na přípravu, proto si jej laboratoř objednává hotové.

Odparafinovaná sklíčka se pokapají roztokem alciánové modři (pH = 2,5), který se nechá působit po dobu 45 min. Následuje oplach v kyvetě obsahující destilovanou vodu. Sklíčka se pokapou jádrovou červení, která se nechá působit asi 2 min. Sklíčka se opět opláchnou v destilované vodě.

8.5.4 Alciánová modř + PAS (AMP)

8.5.4.1 Příprava roztoků

Roztok kyseliny jodisté se připraví navážením 0,5 g kyseliny jodisté. Navážka se rozpustí ve 100 ml destilované vody.

Schiffovo činidlo a alciánová modř jsou roztoky dodávané již připravené k přímému použití. Příprava Gillova hematoxylinu viz. výše.

8.5.4.2 Postup samotného barvení AMP

Odparafinovaná sklička se pokapou roztokem alciánové modři, která se nechá 30 min působit. Následuje oplach v destilované vodě. Dále se nakape připravený roztok kyseliny jodisté a nechá se 5 min účinkovat. Po té opět opláchneme v destilované vodě a nakapeme na 5 min Schiffovo činidlo. Sklička se naskládají do kyvety a nechají se prát 15 min pod tekoucí vodou. Nakonec se jádra dobarvují Gillovým hematoxylinem (působí 7 min), nakape se na sklička diferenciační roztok a opět se nechají prát pod tekoucí vodou.

8.6 Imunohistochemické zpracování

Obecným postup zpracování začíná odparafinováním skliček a následně k tzv. optimalizaci prezentace antigenu (děj, při kterém dojde k obnažení vyhledávaného antigenu ve tkáni) – ne všechny protilátky tento proces vyžadují. Dalším krokem je blokace aktivity endogenních enzymů, která nám zajistí, že s naší enzymatickou značkou (nejčastěji se používá enzym peroxidáza, která se nachází i běžně ve tkáních) nebude falešně pozitivně sledovaná tkáň reagovat. Ve třetím kroku blokujeme pozadí (avidin a biotin), kdy vysycením tkáně bílkovinami předcházíme nespecifickému vychytávání specifické protilátky (bez tohoto kroku nám po obarvení na skličku zůstává nespecifická pozitivní reakce pozadí). Následně se dle pokynů výrobce naředí příslušná primární protilátka, která se na skličku nechá inkubovat. Pak dochází k promytí fosfátovým pufrům. Následně se přikape sekundární protilátka a po uplynutí inkubační doby opět dochází k oplachu roztokem fosfátového pufru. Pak už zbývá komplex detekovat a vizualizovat, což se provádí substrátem z peroxidu vodíku a 3,3-diaminobenzidin tetrachlorid (= DAB) chromogenu, což se projeví vznikem hnědého zbarvení. Zbytek tkáně se tzv. kontrastuje. K tomu se používá 5% roztok modré skalice na 10 min a jádra buněk se dobarvují Gillovým hematoxylinem v barvicím automatu.

Imunohistochemické zpracování probíhalo v přístroji BenchMark Ultra – Ventana, který pracoval s příslušnými sety od výrobce. V termostatu vytemperovaná sklička na 60°C

se vkládají do horní části přístroje, kde se nachází šuplíky pro vkládání skel. Nad skly se pohybuje otočný karusel s detekčním a vyvolávacím systémem, proteáza, ampifikační set a dispenzery s protilátkami. Veškeré procesy přístroje jsou viditelné v PC. Přístroj si řezy odparafinuje. Vše si dávkuje sám dle nastaveného protokolu. V dolní části přístroje se nachází zásobní roztoky pufrů, promývacích roztoků a oleje.

Obrázek 2: Přístroj BenchMark Ultra – Ventana



Zdroj: vlastní – ŠÚP Lochotín

8.7 Odvodnění a montování (přípravkem Pertex)

Odvodnění a montování je závěrem procesu zpracování histologického preparátu (ať už zhotoveného histochemickou nebo imunohistochemickou cestou), který dává za vznik sklíčko předkládané lékaři pro určení diagnózy.

Odvodnění probíhá opět putováním sklíček v systému alkoholových lázní. Provádí se buď manuálně, nebo přístrojově v barvicím automatu. Opět se začíná v 70% ethanolu, pokračuje se v 80% a 96% ethanolu, následují lázně s acetonem a nakonec s xylenem.

Pro montáž sklíček při naší práci byl využit komerčně dodávaný přípravek Pertex (s vodou nemísitelné médium – proto se sklíčka musela odvodnit). Montáž se opět provádí buď

manuálně, nebo jej vykonává montovací automat. Na podložní sklíčko s odvodněným preparátem se nanese montovací médium (Pertex) a přiloží se krycí sklíčko tak, aby nevznikly bubliny mezi krycím sklíčkem a preparátem.

8.8 Světelný mikroskop

Samotná analýza vzorku se provádí pozorováním preparátu ve světelném mikroskopu a provádí jej lékař. Mikroskop je opatřený světelným zdrojem, stolečkem s úchyty na preparát, revolverovou hlavicí s objektivy a v horní části okulárem (zvětšení x10).

Na výběr máme několik typů objektivů lišících se zvětšením. Maximální zvětšení je až tisícinásobné a docílíme jej pomocí imerzního objektivu (zvětšení x100). Chceme-li použít imerzní objektiv, je třeba pokapat preparát imerzním olejem, který má za úkol zabránit rozptylu paprsků světla.

9 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

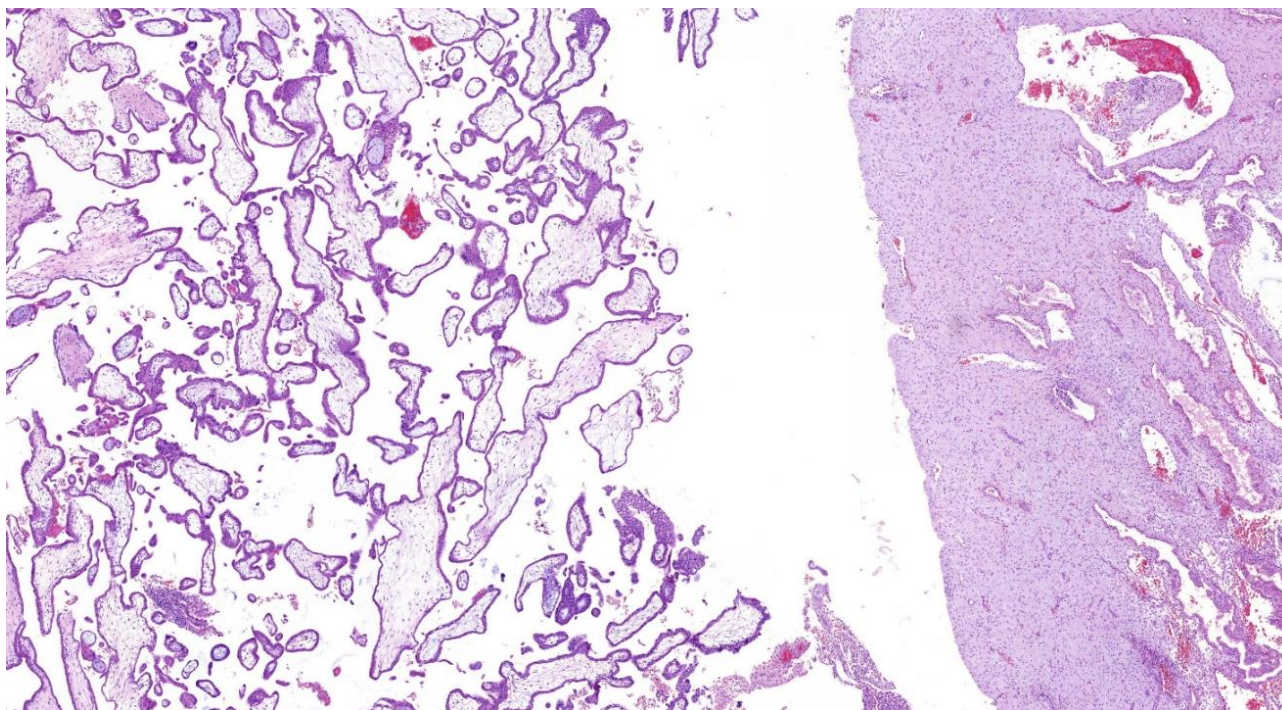
Analýza vzorků byla provedena pomocí světelného mikroskopu, kdy se na jednotlivých sklíčkách prokazovala pozitivita kyselých mukopolysacharidů v choriových klcích placenty. V případě positivity se hodnotila intenzita zbarvení (pro histochemické metody)/exprese (pro imunohistochemické metody) a pozitivní část (= kolik procent z choriových klků vykazují pozitivitu na kyselé mukopolysacharidy z celkového počtu sledovaných klků). Hodnocení míry a intenzity zbarvení/exprese skel je subjektivní, z toho důvodu hodnocení prováděli 3 lidé nezávisle na sobě.

9.1 Průkaz positivity jednotlivých metod

9.1.1 Výsledek barvení hematoxylin-eosin

Jedná se o základní přehledné barvení, které spíše než k průkazu slouží k vizualizaci tkáně. Kyselé mukopolysacharidy zde prokázat nelze.

Obrázek 3: Výsledek barvení HE

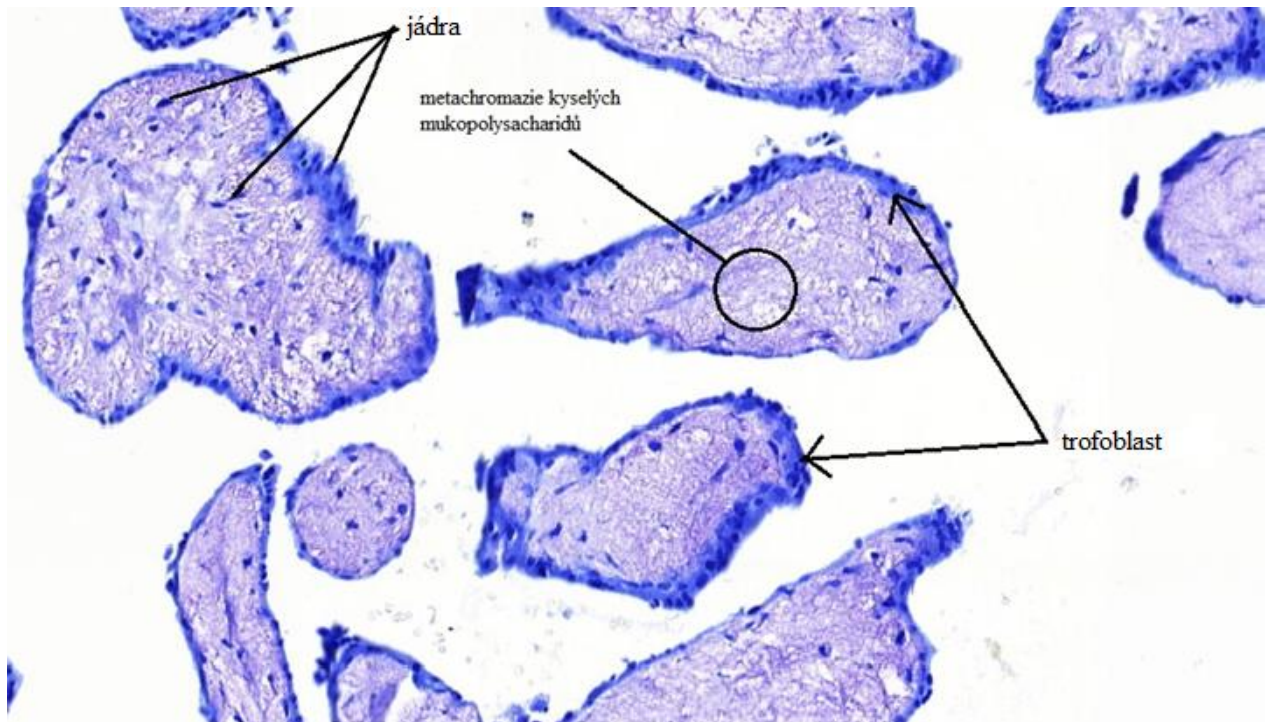


Zdroj vlastní - ŠÚP

Jádra - modrá, kolagen - třešňově červený, hyalin - růžový, fibrin - červený, svalovina - růžovo-červená, chrupavka - modrá.

9.1.2 Výsledek barvení toluidinovou modří

Obrázek 4: Výsledek barvení TM

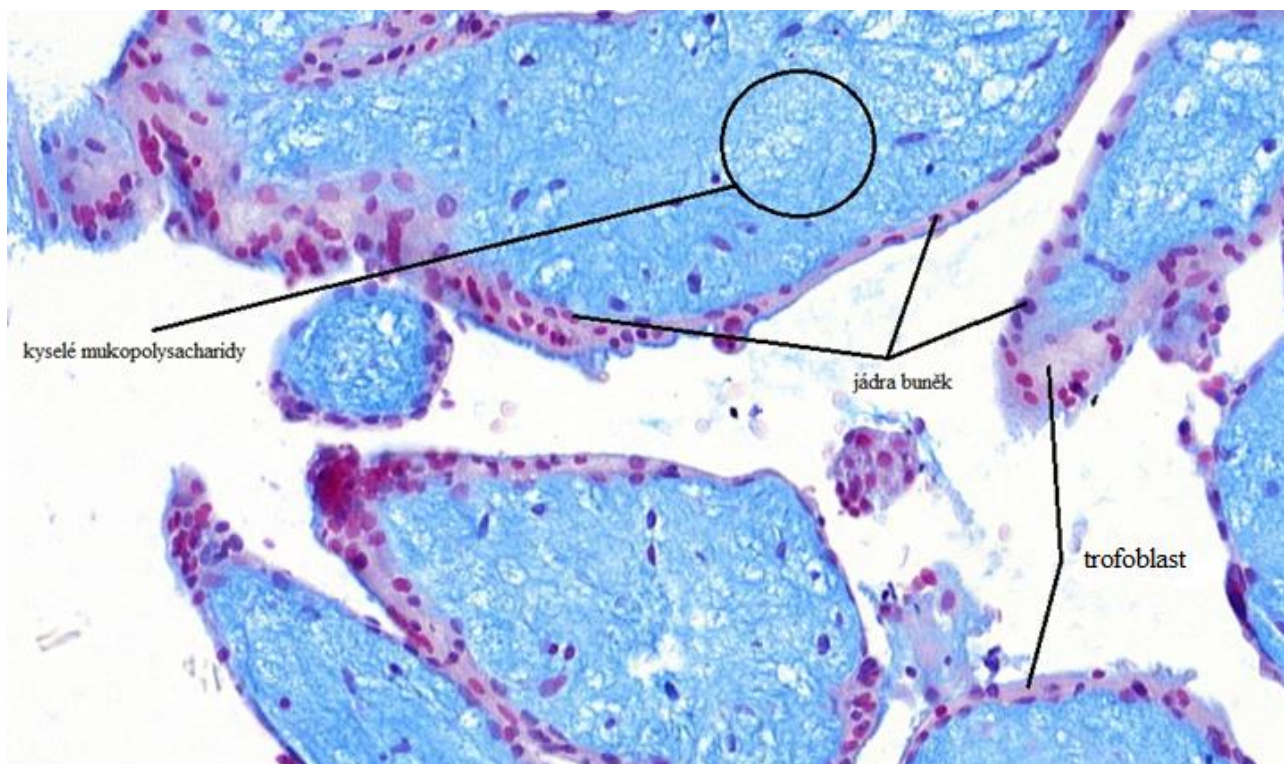


Zdroj vlastní - ŠÚP

Buněčná jádra a cytoplazma - tmavomodře (ortochromaticky), kyselé mukopolysacharidy - metachromaticky, tzn. rozdílný odstín modré oproti odstínu použitého barviva

9.1.3 Výsledek barvení alciánovou modří

Obrázek 5: Výsledek barvení AM

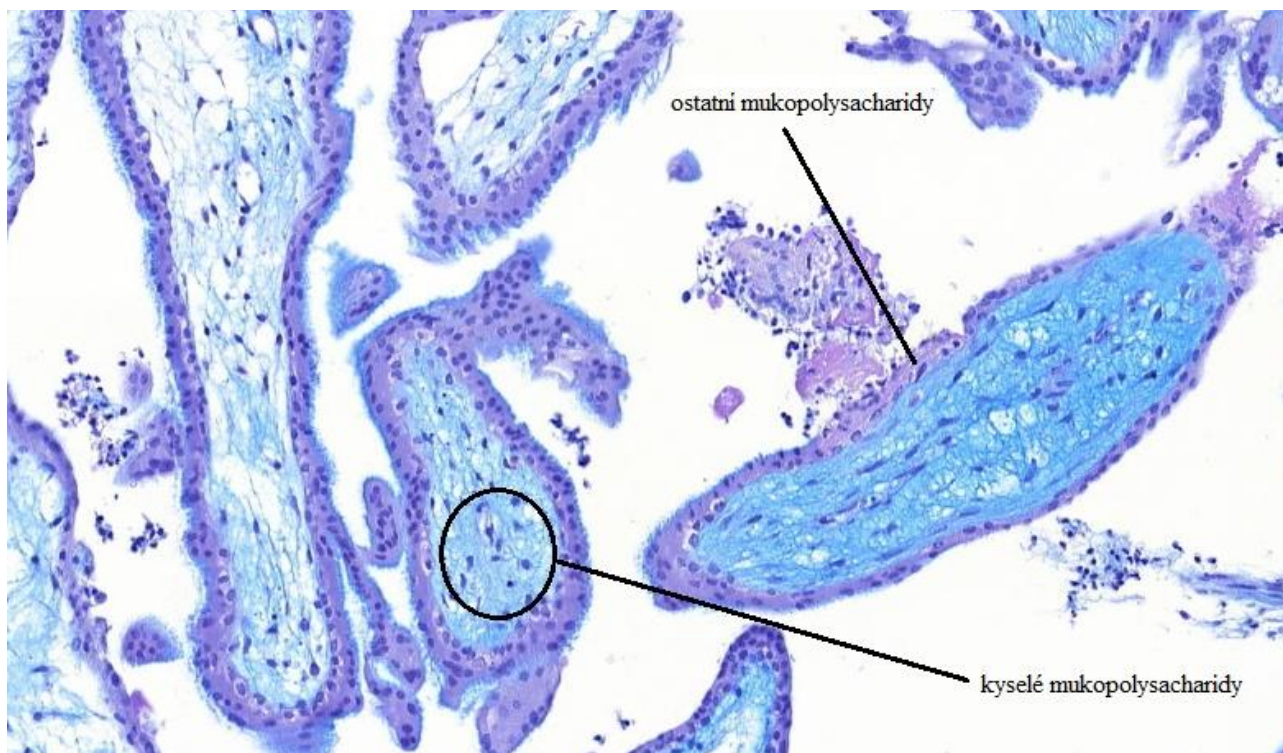


Zdroj vlastní - ŠÚP

Kyselé mukopolysachridy - modře, jádra buněk – červeně

9.1.4 Výsledek barvení PAS reakce + alciánová modř

Obrázek 6: Výsledek barvení AMP

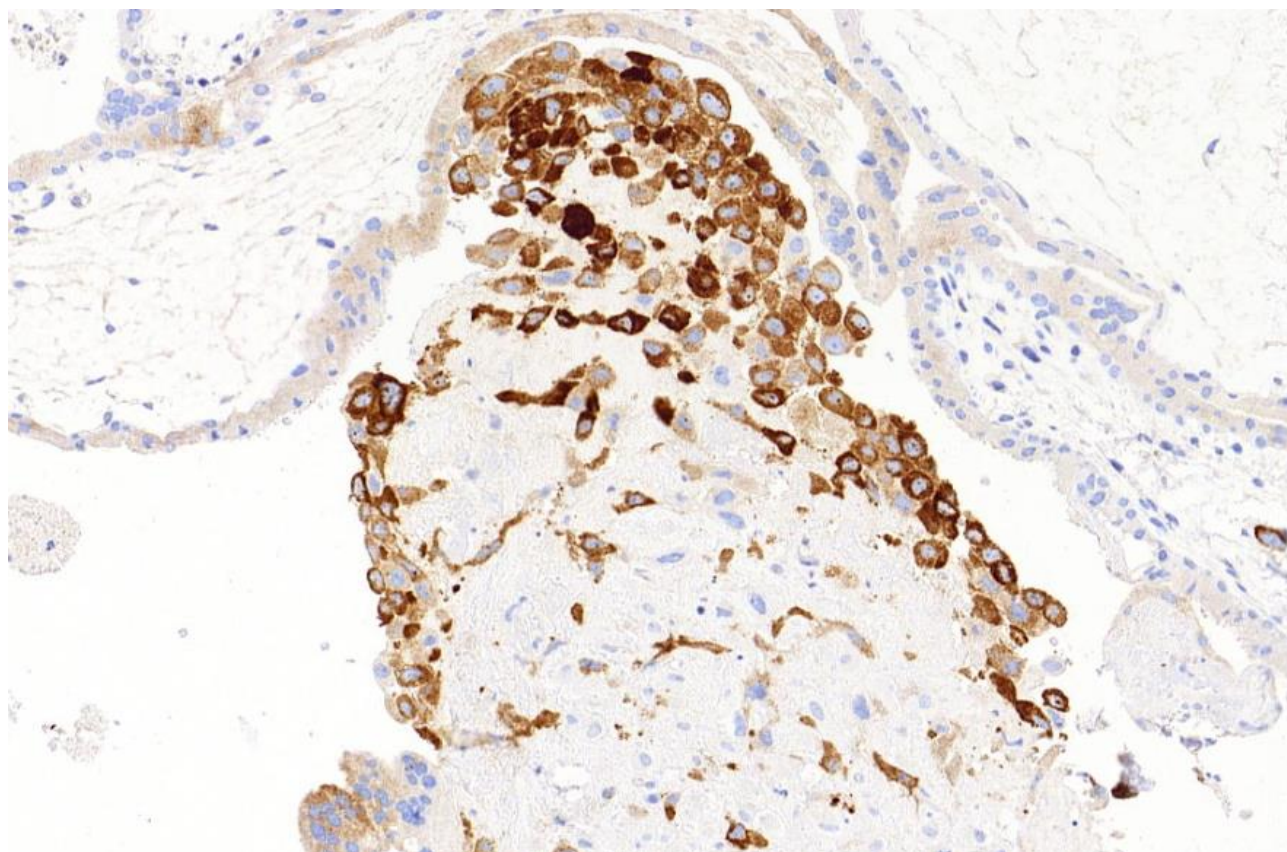


Zdroj vlastní - ŠÚP

Kyselé mukopolysacharidy – modře, ostatní polysacharidy růžovočerveně

9.1.5 Imunohistochemický výsledek pozitivní reakce

Obrázek 7: Výsledek imunohistochemického barvení MUC-4



Zdroj vlastní - ŠÚP

Příklad pozitivní exprese. Hnědá sraženina v místě vazby antigenu s protilátkou v cytoplazmě buněk. Tento mechanismus využívají všechny imunohistochemické metody, bez ohledu na antigen, či detekční systém.

9.2 Analýza vzorků

Výsledky jsou zpracovány v následujících tabulkách. Každá tabulka odpovídá jednomu vzorku. Tabulka je členěna do více částí, a to dle odvětví metod (histochemie/imunohistochemie) a dle hodnotícího (MUDr. Ondřej Ondič PhD.[1] /Monika Vondříčková [2] /Denisa Bošková [3]). Každý hodnotící hodnotí intenzitu/expresi a zastoupení pozitivních choriových klků.

Tabulka 1: Vzorek č. 16706/R8 - Fyziologická placenta

HISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]
HE	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
TM	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
AM	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
AMP	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
IMUNOHISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]
MUC-1	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-4	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-6	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0

Tabulka 2: Vzorek č. 9149 - Placenta časného hydropického abortu

HISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]
HE	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
TM	+	80	++	70	++	70
AM	+++	100	+++	95	+++	80
AMP	++	90	++	90	++	95
IMUNOHISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]
MUC-1	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-4	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-6	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0

Tabulka 3: Vzorek č. 9485 - Placenta časného hydropického abortu

HISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]
HE	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
TM	+	10	+	15	+	30
AM	+	90	++	75	++	70
AMP	+	90	++	75	++	70
IMUNOHISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]
MUC-1	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-4	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-6	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0

Tabulka 4: Vzorek č. 9488/A - Placenta časného hydropického abortu

HISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]
HE	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
TM	+	5	+	20	++	30
AM	+	70	++	65	++	60
AMP	+	70	++	70	++	75
IMUNOHISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]
MUC-1	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-4	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-6	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0

Tabulka 5: Vzorek č. 9488/B - Placenta časného hydropického abortu

HISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]
HE	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
TM	+	1	+	10	++	5
AM	+	70	++	65	++	60
AMP	+	70	+	75	+	70
IMUNOHISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]
MUC-1	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-4	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-6	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0

Tabulka 6: Vzorek č. 9488/C - Placenta časného hydropického abortu

HISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]
HE	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
TM	Neg.	0	+	3	++	1
AM	+	50	+	60	++	50
AMP	+	30	+	25	+	20
IMUNOHISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]
MUC-1	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-4	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-6	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0

Tabulka 7: Vzorek č. 5585/R2 - Placenta časného hydropického abortu

HISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]
HE	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
TM	+	10	+	5	+	3
AM	+	30	++	40	++	50
AMP	+	40	+	60	+	60
IMUNOHISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]
MUC-1	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-4	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-6	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0

Tabulka 8: Vzorek č. 5585/R7 - Placenta časného hydropického abortu

HISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]
HE	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
TM	+	30	++	25	+++	15
AM	++	70	++	60	++	55
AMP	+	40	++	40	++	35
IMUNOHISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]
MUC-1	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-4	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-6	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0

Tabulka 9: Vzorek č. 189/R2 - Placenta s prokázanou parciální molou

HISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]
HE	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
TM	+	50	++	70	++	55
AM	+	80	++	75	+	70
AMP	+	80	++	60	++	80
IMUNOHISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]
MUC-1	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-4	+	3	+	3	+	3
MUC-6	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0

Komentář k tabulce č. 9:

Po společné konzultaci jsme vyhodnotili velice slabou pozitivitu MUC-4.

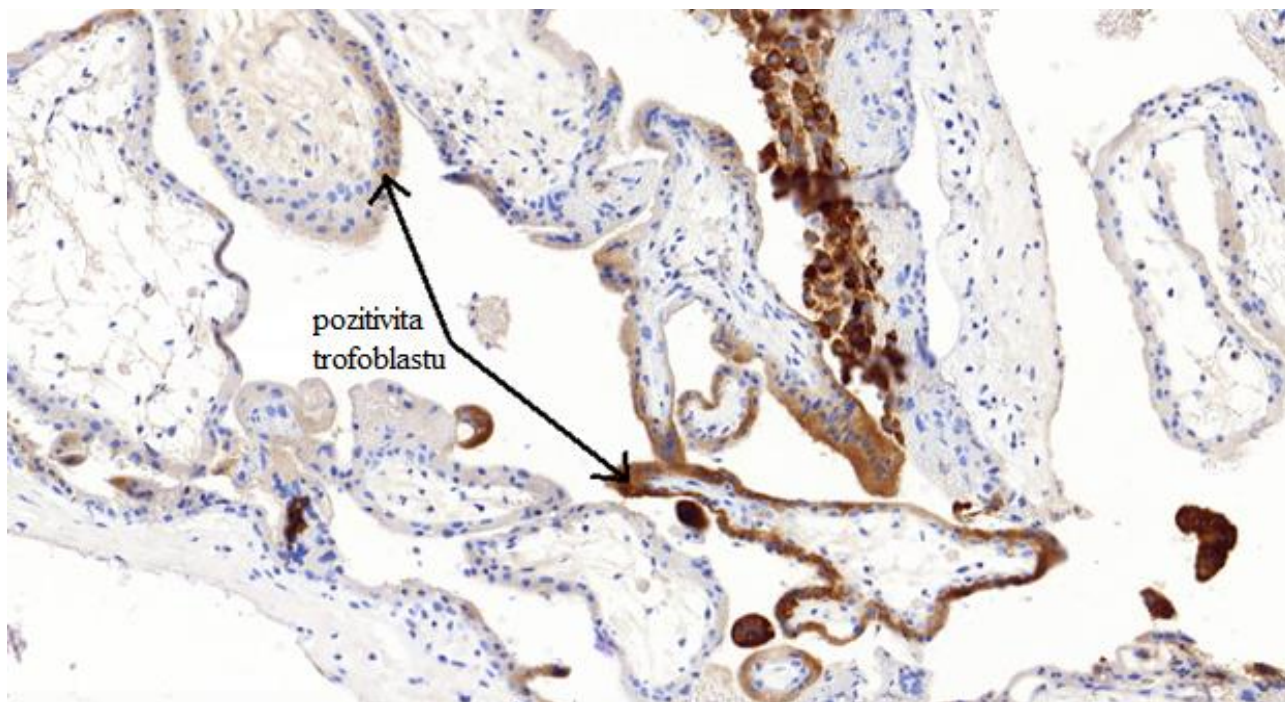
Tabulka 10: Vzorek č. 189/R12 - Placenta s prokázanou parciální molou

HISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]	Intenzita	Pozitivní část [%]
HE	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
TM	+	15	+	10	+	15
AM	+	30	+	45	++	40
AMP	+	30	+	45	+	25
IMUNOHISTOCHEMIE						
	Hodnotící 1		Hodnotící 2		Hodnotící 3	
Metoda	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]	Expres	Pozitivní část [%]
MUC-1	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-4	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
MUC-6	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0

Komentář k tabulce č. 10:

U metody MUC-4 se vyskytovala značná pozitivita v oblasti syntitiotrofoblastu. Uvnitř choriových klků však nikoliv (viz. následující obrázek č. 8)

Obrázek 8: Zvláštní typ pozitivity vzorku 189/R12 (MUC-4)



Zdroj vlastní - ŠÚP

DISKUZE

Výzkum byl inspirován prací SAUL SUSTER, M.D. and MORTON J. ROBINSON, M.D. z roku 1992, kdy byla prováděna analýza mukopolysacharidů v parafinových řezech pro odlišení těchto dvou stavů. Pokusila jsem se na jejich práci podobným duchem navázat. Ve svém výzkumu používají metody hematoxylin-eosin, PAS s použitím diastázy i bez ní a barvení alcianovou modří při pH 1,2 a 2,5 s použitím hyaluronidázy i bez ní.

Práce začala studiem různých metod, pomocí kterých by bylo možné kyselé mukopolysacharidy v parafinových řezech prokázat. Po konzultaci jsme vybrali právě tyto použité metody. Vyzkoušeli jsme k průkazu mukopolysacharidů i metodu methylenové modří, ale bohužel se ukázala jako nevhodná. Pro průkaz kyselých mukopolysacharidů se z hlediska histochemie ukázala jako nejvhodnější metoda s alcianovou modří.

Výsledky barvení AMP potvrdily, že mukosubstance uvnitř choriových klků hydropického abortu a parciální moly, mají skutečně kyselou povahu. Vyjma fyziologické placenty, která v našem případě posloužila jako negativní kontrola, se nám podařilo odhalit vysoký výskyt mukopolysacharidů uvnitř choriových klků.

Z důvodu malého počtu použitých parafinových bločků placent s prokázanou parciální molou, výsledky nejsou vhodné k dalšímu statistickému zpracování.

U jednoho ze dvou vzorků parciální moly jsme zachytili velice slabou expresi MUC-4 v buňkách trofoblastu. U druhého vzorku parciální moly jsme pozorovali zvláštní typ pozitivitu v oblasti syntitiotrofoblastu. Lze tedy říci, že je možné v některých případech parciální moly tento mukopolysacharid detekovat. Pro praktickou diagnostickou aplikaci by bylo potřeba tuto skutečnost ještě více prozkoumat.

U vzorků hydropických abortů se nám přesnou charakteristiku mukopolysacharidů uvnitř choriových klků placenty, pomocí vybraných imunohistochemických protilátek, prokázat nepodařilo. Z výsledků je patrné, že z analyzovaných mukopolysacharidů se uvnitř choriových klků nevyskytuje ani jeden.

Nepodařilo se nám ani prokázat, že by použité metody dokázaly odhalit nějaký rozdíl v intenzitě/expresi pozitivitu, množstvím zastoupení nebo v odlišném složení kyselých mukopolysacharidů ve tkáni parciální moly a časného hydropického abortu.

ZÁVĚR

Žádná z použitých metod není vhodná k odlišení parciální moly a hydropického abortu.

Potvrdili jsme přítomnost kyselých mukopolysacharidů v klcích placenty.

Histochemické barvení nejvhodnější k detekci mukopolysacharidů je barvení alciánovou modří.

Nečekaná pozitivní exprese MUC-4 v buňkách trofoblastu placenty s parciální moulou by mohla být předmětem dalšího cíleného zkoumání.

SEZNAM LITERATURY

1. **HÁJEK, Zdeněk, ČECH, Evžen a MARŠÁL, Karel.** *Porodnictví 3. zcela přepracované a doplněné vydání.* Praha : Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4529-9.
2. **DYLEVSKÝ, Ivan a TROJAN, Stanislav.** *Somatologie (2).* Praha : Avicentrum, 1990. ISBN 80-201-0039-3.
3. **VESELÁ, Jana.** *Histologické vyšetření placenty.* [Online] České Budějovice, 2009. [Citace: 21. leden 2022.] <https://theses.cz/id/qnoftx/>. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
4. **DVOŘÁK, Karel.** *Obecná a speciální histologie.* Brno : Ústav pro další vzdělávání středních zdravotnických pracovníků, 1978.
5. **MAČÁK, Jiří, MAČÁKOVÁ, Jana a DVOŘÁČKOVÁ, Jana.** *Patologie. 2., doplněné vydání.* Praha : Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3530-6.
6. **PODHORNÁ, Aneta.** *Indikátory prenatálního stresu.* [Online] Brno, 2019. [Citace: 21. Leden 2022.] https://is.muni.cz/th/mhy4m/Podhorna_Aneta_Bakalarska_Prace.pdf. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
7. **JEŽKOVÁ, Marta a FEIT, Josef, et al.** *Atlases MUNI. Fetopatologie a vývojová patologie embrya a plodu.* [Online] [Citace: 1. listopad 2021.] https://atlases.muni.cz/atlases/feto/atl_cz/hydropsfetalis.html.
8. **MALINOVÁ, Věra, MAZUROVÁ, Stella a DVOŘÁKOVÁ, Lenka.** Gaucherova nemoc a lysosomální onemocnění – současné možnosti diagnostiky a léčby. *Remedia.* [Online] Červen 2016. [Citace: 2. Listopad 2021.] <http://www.remédia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Gaucherova-nemoc-a-lysosomalni-onemocneni-soucasne-moznosti-diagnostiky-a-lecby/6-F-25A.magarticle.aspx>. ISSN 0862-8947.
9. **ROB, Lukáš, MARTAN, Alois a VENTRUBA, Pavel.** *Gynekologie. Třetí, doplněné a přepracované vydání.* Praha : Galén, 2019. ISBN 978-80-7492-426-2.
10. **ZAVADIL, Miloš, FEYEREISL, Jaroslav a ŠAFÁŘ, Petr.** Postgraduální medicína. *Trofoblastická nemoc.* [Online] zdravi.euro.cz, 17. září 2001. [Citace: 2. listopad 2021.] <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/trofoblasticka-nemoc-138943>.

11. **RONNET, Brigitte M.** Ancillary Techniques to Refine Diagnosis. *Diagnosis of Hydatidiform Moles*. [Online] prosinec 2018. [Citace: 17. listopad 2021.] https://www.email.cz/download/k/M9E8oLIhK6ORaYeq7Zu1xyrL7MLCh41k4A5MAPzKXGuY_A4XkNcVe31QhxoJXBMmpGifMhA/uterus%20mole%20partial%20ARPA%202018.pdf.
12. **VINKLEROVÁ, P., a další.** Kompletní mola hydatidosa u perimenopauzální pacientky imitující zhoubný nádor dělohy. *Česká gynekologie*. 2020, č. 5.
13. **ROB, Lukáš.** Gestační trofoblastická nemoc. *Linkos*. [Online] 1. Říjen 2017. [Citace: 28. Prosinec 2021.] <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/gynekologicke-nadory-c51-54-c56-57/gestacni-trofoblasticka-nemoc/>.
14. **HERTZ, Roy, SPENCER, Donald B. a LI, Min Chiu.** Effect of Methotrexate Therapy upon Choriocarcinoma and Chorioadenoma. *SAGE Journals*. [Online] 1. Listopad 1956. [Citace: 30. Prosinec 2021.] <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-93-22757>.
15. **ALEXANDER, Amy L., a další.** Placental site trophoblastic tumor: Successful treatment of 13 cases. *Gynecologic Oncology Reports*. Květen 2020, 32.
16. **SHIH, Ie-Ming a KURMAN, Robert J.** Epithelioid Trophoblastic Tumor: A Neoplasm Distinct From Choriocarcinoma and Placental Site Trophoblastic Tumor Simulating Carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*. 1998, Sv. 22, 11.
17. **VANG, Russell a GUPTA, Mamta, et al.** Diagnostic Reproducibility of Hydatidiform Moles: Ancillary Techniques (p57 Immunohistochemistry and Molecular Genotyping) Improve Morphologic Diagnosis. *National Center for Biotechnology Information*. [Online] Březen 2012. [Citace: 12. Prosinec 2021.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4562215/>.
18. **SAMADDER, Abhimanyu a KAR, Rakhee.** Utility of p57 immunohistochemistry in differentiating between complete mole, partial mole & non-molar or hydropic abortus. *Indian Journal of Medical Research*. [Online] Leden 2017. [Citace: 12. Prosinec 2021.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5460560/>.


19. **HORN, F., a další.** Současné trendy v diagnostice a léčbě trofoblastické nemoci. *Aktuální gynekologie a porodnictví*. [Online] 25. Červenec 2014. [Citace: 19. Prosinec 2021.] https://www.actualgyn.com/pdf/cz_2014_135.pdf. ISSN 1803-9588.
20. **KOTLABOVÁ, Kateřina.** *Současný stav v diagnostice nádorových markerů*. [Online] Květen 2006. [Citace: 18. Leden 2022.] https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/5872/BPTX_2004_1_11160_GB162_54404_0_17261.pdf?sequence=1. Bakalářská práce. Univerzita Karlova.
21. **HUI, Pei, a další.** Hydatidiform Moles: Genetic Basis and Precision Diagnosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. Leden 2017, Sv. 12.
22. **SUSTER, Saul a ROBINSON, Morton J.** Placental intravillous accumulation of sulfated mucosubstances. *Annals of clinical and laboratory science*. 1992, Sv. 22, 3.

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Pracovní postup ŠÚP HE
- Příloha B – Pracovní postup TM
- Příloha C – Pracovní postup ŠÚP AMP
- Příloha D – Pracovní postup ŠÚP AM
- Příloha E – Datasheet k metodě MUC-1
- Příloha F – Datasheet k metodě MUC-2
- Příloha G – Datasheet k metodě MUC-4
- Příloha H – Datasheet k metodě MUC-6
- Příloha I – Povolení sběru informací ve FN Plzeň

PŘÍLOHY

Příloha A – Pracovní postup ŠÚP HE

 FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ	PPZ SUP/003/VERZE 06		
Pracovní postup zkrácený SUP/003/06			
Barvení Hematoxylin – Eosin			
Účinnost od:	15. 4. 2019	Revize:	1x za 2 roky
Kontaktní osoba:	<i>Petra Vopelková Načeradská</i>	Garant:	Doc. MUDr. Ondřej Daum, PhD.
Rozsah působnosti:	ŠÚP FN Plzeň/Zdravotní laboranti		

Po vytištění je dokument platný jen po označení razítkem správce dokumentů „Kopie platná do:“, jinak se jedná o neřízený dokument.

Účel:
Přehledné barvení pro parafinové řezy

Postup:

1. odparafinovat do 70% alkoholu
2. Gillův hematoxylin – 7 min
3. diferencovat v diferenciačním roztoku
4. prát pod tekoucí vodou (zmodrání jader)
5. roztok Eosinu – 1 min
6. opláchnout v deionizované vodě
7. odvodnit, projasnit, montovat

Celý postup barvení se provede v barvicím automatu – program č. 1 na Borech, program č. 7 na Lochotíně

Výsledek barvení:

Jádra buněk modře, kolagen růžově, hyalin růžově, fibrin červeně, svalovina růžovočerveně, chrupavka modře

Příprava roztoků:

Gillův hematoxylin (na 2 l roztoku):

Hematoxylin	8 g
jodičnan sodný	0,8 g
síran hlinitý	70,4 g
deionizovaná voda	1420 ml
etylenglykol	500 ml
kyselina octová (ledová)	80 ml

Rozpustit hematoxylin, jodičnan sodný a síran hlinitý v destilované vodě (rozpustit každé zvlášť a pak teprve smíchat). Přidat ethylenglykol, promíchat. Naposledy přidat kyselinu octovou ledovou. Hematoxylin možno ihned použít. Někdy však vzhledem k tomu, že může být nedostatečně oxidován, první 4 dny může barvit slabě. Pak se může dooxidovat přidáním jodičnanu sodného v množství 10-20 mg/l.

V současné době odebíráme již hotový Gillův hematoxylin od firmy Merck.

Ověřil: <i>Petra Vopelková Načeradská</i>	Správce dokumentů: <i>Eva Kaslová kl. 2740</i>	Vedoucí ZT/datum: Doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D./ 12. 4. 2019	Schválil/datum: Prim. MUDr. Petr Mukenšnabl, Ph.D./ 12. 4. 2019
--	---	--	---

Strana 1 (celkem 2)

Zdroj: PPZ/SUP/Hematoxylin-eosin

Příloha B – Pracovní postup TM

Sigma-Aldrich

1.15930.0025

Mikroskopie

Toluidinová modř O (C.I. 52040)

pro mikroskopii Certistain®

IVD Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro



pro barvení jader a vizualizaci metachromasie v histologických řezech
Toto barvivo „Toluidinová modř O (C.I. 52040) - pro mikroskopii Certistain®“ se používá k buněčné diagnostice v oblasti humánní medicíny a slouží k účelům histologického vyšetření materiálu vzorků lidského původu. Jedná se o suché barvivo používané k přípravě barvicího roztoku, který v případě použití společně s jinými výrobky pro diagnostiku in vitro z našeho portfolia (fixace nebo v případě potřeby zalití, barvení výše uvedeným roztokem toluidinové modři O, kontrastního barvení, montování) umožňuje vyhodnocení cílových struktur v materiálech histologických vzorků pro diagnostické účely.

Princip

Toluidinová modř O patří mezi thiazinová barviva, která jsou zvláště vhodná pro barvení jader v histologickém materiálu.

Toluidinovou modř O lze použít k průkazu metachromasie, typické pro hustě uspořádané struktury (s mezerami méně než 0,4 nm) negativních valencí ve tkáni.

Průkaz lze provádět se zředěným barvicím roztokem obsahujícím pouze monomery barviva, které se váže na jednoduché vazby negativních valencí. Metachromatické barvení je typické pro mukosubstancie, zejména sulfonované mukopolysacharidy, chrupavky, cylindrické buňky a granule mastocytů

Materiál vzorku

Jako výchozí materiál se používají řezy tkáně zalité v parafínu (parafinové řezy o tloušťce 3–5 µm).

Činidla

Kat. č. Toluidinová modř O (C.I. 52040) 25 g
1.15930.0025 pro mikroskopii Certistain®
Č. kódu barvy (C.I.): 52040
Název kódu barvy: Bazická modř 17

Příprava vzorků

Odběr vzorku musí provést kvalifikovaný personál.

Se všemi vzorky je nutné nakládat za použití nejmodernější technologie.

Všechny vzorky musejí být jasně označené.

K odběru vzorků a jejich přípravě je nutné použít vhodné nástroje.

Dodržujte pokyny výrobce týkající se aplikace/použití.

Řezy zbarvte parafínem a rehydratujte obvyklým způsobem.

Příprava činidla

Toluidinová modř O roztok 0,1 %

Na přípravu přibližně 100 ml směsného roztoku:

Toluidinová modř O (C.I. 52040) Certistain®	0,1 g
Destilovaná voda	100 ml
rozpusťte a přefiltrujte	

Čerstvě připravený barvicí roztok by se před použitím měl přefiltrovat.

Postup – barvení jader / přehledné barvení

Barvení v barvicí komůrce

Histologická sklíčka zbarvte obvyklým způsobem parafínem a rehydratujte je sestupnou alkoholovou řadou.

Sklíčka je třeba po jednotlivých krocích barvení nechat dobře okapat; tímto opatřením se zabrání jakékoli zbytečné zkřížené kontaminaci roztoků.

Uvedené časy by měly být dodrženy, aby byl zaručen optimální výsledek barvení.

Sklíčko s parafinovým řezem	
Destilovaná voda	1 min
Toluidinová modř O roztok 0,1 %	10 - 20 min
Destilovaná voda	1 min
Montování pomocí glycerolu	
nebo pro trvalé preparáty:	
Ethanol 95 %	1 min
Ethanol 95 %	1 min
Ethanol 100 %	1 min
Ethanol 100 %	1 min
Xylen	1 min
Xylen	1 min
Namontujte na xylenem zvlhčená sklíčka např. pomocí roztoku Entellan® nový a nasadte krycí sklíčko.	

Po dehydrataci (vzestupnou alkoholovou řadou) a pročištění xylenem lze histologické vzorky montovat za použití bezvodých montovacích přípravků (např. DPX nové nebo Entellan® nový) a krycího sklíčka a poté uskladnit. Při analýze obarvených preparátů pod mikroskopem při více než 40násobném zvětšení se doporučuje používat imerzní olej.

Výsledek

Buněčná jádra tmavomodrá
Tkáň modrá

Postup – metachromasie

Barvení v barvicí komůrce

Histologická sklíčka zbarvte obvyklým způsobem parafínem a rehydratujte je sestupnou alkoholovou řadou.

Sklíčka je třeba po jednotlivých krocích barvení nechat dobře okapat; tímto opatřením se zabrání jakékoli zbytečné zkřížené kontaminaci roztoků.

Uvedené časy by měly být dodrženy, aby byl zaručen optimální výsledek barvení.

Sklíčko s parafinovým řezem	
Destilovaná voda	1 min
Toluidinová modř O roztok 0,1% ¹⁾	1–2 min
Destilovaná voda	1 min
Montujte s glycerolem a krycím sklíčkem (utěsněte bezbarvým lakem na nehty)	
nebo pro trvalé preparáty:	
Ethanol 95 %	1 min
Ethanol 95 %	1 min
Ethanol 100 %	1 min
Ethanol 100 %	1 min
Xylen	1 min
Xylen	1 min
Namontujte na xylenem zvlhčená sklíčka např. pomocí roztoku Entellan® nový a nasadte krycí sklíčko.	

¹⁾ nebo: Toluidinová modř O roztok **0,01 %** 5–10 min

Po dehydrataci (vzestupnou alkoholovou řadou) a pročištění xylenem lze histologické vzorky montovat za použití bezvodých montovacích přípravků (např. DPX nové nebo Entellan® nový) a krycího sklíčka a poté uskladnit. Při analýze obarvených preparátů pod mikroskopem při více než 40násobném zvětšení se doporučuje používat imerzní olej.

Výsledek

Buněčná jádra a cytoplazma ortochromatická modrá
Různé kyselé uhlohydráty* metachromatická růžová až červená nebo fialová

* Metachromatické jsou pojivové tkáně, muciny, bazické látky chrupavky, granule mastocytů, mnohé epiteliální muciny.

Technické poznámky

Použitý mikroskop by měl splňovat požadavky zdravotnické diagnostické laboratoře.
Při používání histoprocessorů a automatizovaných barvicích systémů dodržujte prosím návod k použití poskytnutý dodavatelem systému a softwaru. Čerstvě připravený barvicí roztok by se před použitím měl přefiltrovat. Před uložením odstraňte přebytek imerzního oleje.

Diagnostika

Stanovení diagnóz může provádět pouze oprávněný a zaškolený personál. Je nutné používat platné nomenklatury. Další testy je nutné vybírat a používat na základě uznaných metod. Pro zamezení nesprávným výsledkům by se u každé aplikace měly provádět vhodné kontroly.

Skladování

Toluidinovou modř O (C.I. 52040) - pro mikroskopii Certistain® skladujte při teplotě +5 až +30 °C.

Doba použitelnosti

Toluidinovou modř O (C.I. 52040) - pro mikroskopii Certistain® lze používat až do uplynutí uvedené doby použitelnosti.
Po prvním otevření lahvičky lze obsah používat až do uplynutí uvedené doby použitelnosti, je-li skladován při teplotě +5 až +30 °C.
Lahvičky musejí být vždy těsně uzavřené.

Další pokyny

Pouze pro profesionální použití.

Aby nedocházelo k chybám, smí aplikaci provádět pouze kvalifikovaný personál.
Je nutno dodržovat vnitrostátní směrnice týkající se bezpečnosti práce a zajištění kvality.
Je nutno používat standardně vybavené mikroskopy.

Ochrana před infekcí

Je nutno přijmout účinná opatření na ochranu před infekcí v souladu s laboratorními směrnice.

Pokyny ohledně likvidace

Balení musí být zlikvidováno v souladu se stávajícími směrnice týkajícími se likvidace.
Použité roztoky a roztoky po uplynutí doby použitelnosti je nutno likvidovat jako zvláštní odpad v souladu s místními směrnice. Informace ohledně likvidace lze získat pod rychlým odkazem „Hints for Disposal of Microscopy Products“ (Tipy pro likvidaci výrobků pro mikroskopii) na adrese www.microscopy-products.com. V rámci EU platí stávající příslušné NARIŽENÍ (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, měnící a rušící směrnice 67/548/EHS a 1999/45/ES a měnící nařízení (ES) č. 1907/2006.

Pomocná činidla

Kat. č. 100974	Ethanol denaturovaný cca 1 % methylethylketonem pro analýzu EMSURE®	1 l, 2,5 l
Kat. č. 103699	Imerzní olej podle ISO 8036 pro mikroskopii	100 ml kapací lahvička
Kat. č. 104095	Glycerol pro fluorescenční mikroskopii	250 ml
Kat. č. 104699	Imerzní olej pro mikroskopii	100ml kapací lahvička, 100 ml, 500 ml
Kat. č. 107161	Entellan® nový rychlé zalévací médium pro mikroskopii	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat. č. 108298	Xylen (isomerická směs) pro histologii	4 l

Klasifikace rizik

Kat. č. 1.15930.0025

Řiďte se prosím klasifikací rizik vytisknutými na štítku a informacími uvedenými v bezpečnostním listě. Bezpečnostní list je dostupný na Internetových stránkách a na požádání.

Hlavní složky výrobku

Kat. č. 1.15930.0025

C.I. 52040

C₁₅H₁₆ClN₃S

M = 305,84 g/mol

Jiné výrobky pro IVD

Kat. č. 100362	Souprava pro stříbření podle von Kossa pro detekci mikrokalciфикации	1 sada
Kat. č. 100496	Formaldehydový roztok 4 %, pufrovaný, pH 6,9 (cca 10 % roztok formalínu) pro histologii	350 ml a 700 ml (v lahvičce s širokým hrdlem), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Kat. č. 105175	Roztok hematoxylinu, modifikován podle Gilla II pro mikroskopii	500 ml, 2,5 l
Kat. č. 115161	Histosec® pastilky (bez DMSO) bod tuhnutí 56-58 °C, zalévací médium pro histologii	10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Kat. č. 117081	Roztok eosinu Y 1 %, alkoholový pro mikroskopii	1 l

Bibliografie

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mullsch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kieman, J.A). Bios, 2002



Viz návod k použití



Výrobce



Katalogové číslo



Kód šarže



Pozor, přečtěte si
příložené dokumenty



Spotřebujte do
RRRR-MM-DD



Teplotní
omezení

Stav: 2019-08-12

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Německo
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.microscopy-products.com

EMD Millipore Corporation, 400 Summit Drive
Burlington MA 01803, USA, Tel. +1-978-715-4321
Sigma-Aldrich Canada Co. or Millipore (Canada) Ltd.
2149 Winston Park, Dr. Oakville, Ontario, L6H 6J8
Phone: +1 800-565-1400



Zdroj vlastní

Příloha C – Pracovní postup ŠÚP AM

Pracovní postup zkrácený SUP/023/04

Barvení alcianovou modří

Dnem 1.6.2014 vstoupil v platnost nový název KL „Šiklův ústav patologie“, zkratkou „ŠÚP“, ve formě bez diakritiky (užívané v kódování RD) „SUP“. Tyto názvy a zkratky nahrazují dřívější „Šiklův patologicko-anatomický ústav“, „ŠPAÚ“ a „SPAU“. Je pokračováno v dosavadním číslování verzí dokumentů, první položka kódu se však mění ze „SPAU“ na „SUP“. Verze dokumentů vydané před 1.6.2014 jsou tedy označeny lokalizací „SPAU“, verze vydané po tomto datu lokalizací „SUP“.

Účinnost od:	16. 9. 2016	Revize:	1x za 2 roky
Kontaktní osoba:	Doc. MUDr. Ondřej Daum, PhD.	Garant:	Doc. MUDr. Ondřej Daum, PhD.
Rozsah působnosti:	ŠÚP FN Plzeň/Zdravotní laboranti		

Po vytištění je dokument platný jen po označení razítkem správce dokumentů „Kopie platná do:“, jinak se jedná o neřízený dokument.

Účel:

Průkaz kyselých mukopolysacharidů v parafinových řezech

Postup:

1. odparafinovat do deionizované vody
2. roztok alcianové modří pH=2,5 na 45 min
3. opláchnout v deionizované vodě
4. dobarvit jádra 2 min jádrovou červení
5. opláchnout v deionizované vodě
6. odvodnit, projasnit
7. montovat

Body č. 1-3 a 6 lze provést v barvicím automatu

Výsledek barvení:

kyselé mukopolysacharidy – modře
jádra buněk – červeně

Příprava roztoků:

Alcianová modř pH = 2,5:

Používáme hotový roztok od firmy Merck

Jádrová červen:

viz PPZ Průkaz buněčných jader jádrovou červení

Všechny časy a teploty uváděné v PPZ jsou pouze orientační a důležitá je kontrola pod mikroskopem, neboť barvení každé tkáně je individuální.

Ověřil: Miloslava Mráčková	Správce dokumentů: Miloslava Mráčková, kl.2740	Vedoucí ZT/datum: Doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D./9.9. 2016	Schválil/datum: Prim. MUDr. Petr Mukensnabl, Ph.D./9.9.2016
-------------------------------	---	---	---

Příloha D – Pracovní postup ŠÚP AMP

Pracovní postup zkrácený SUP/020/04

PAS reakce + alciánová modř

Dnem 1.6.2014 vstoupil v platnost nový název KL „Šiklův ústav patologie“, zkratkou „ŠÚP“, ve formě bez diakritiky (užívané v kódování RD) „SUP“. Tyto názvy a zkratky nahrazují dřívější „Šiklův patologicko-anatomický ústav“, „ŠPAÚ“ a „SPAÚ“. Je pokračováno v dosavadním číslování verzí dokumentů, první položka kódu se však mění ze „SPAÚ“ na „SUP“. Verze dokumentů vydané před 1.6.2014 jsou tedy označeny lokalizací „SPAÚ“, verze vydané po tomto datu lokalizací „SUP“.

Účinnost od:	16. 9. 2016	Revize:	1x za 2 roky
Kontaktní osoba:	Doc. MUDr. Ondřej Daum, PhD.	Garant:	Doc. MUDr. Ondřej Daum, PhD.
Rozsah působnosti:	ŠÚP FN Plzeň/Zdravotní laboranti		

Po vytištění je dokument platný jen po označení razítkem správce dokumentů „Kopie platná do:“, jinak se jedná o neřízený dokument.

Účel:

Průkaz mukopolysacharidů v parafinových řezech

Postup:

1. odparafinovat do deionizované vody
2. roztok alciánové modři na 30 min
3. opláchnout v deionizované vodě
4. 0,5% roztok kyseliny jodisté na 5 min
5. opláchnout v deionizované vodě
6. Schiffovo činidlo na 5 min
7. vyprat pod tekoucí vodou 15 min
8. dobarvit jádra Gillovým hematoxylinem (7 min), oddiferencovat, vyprat ve vodě
9. odvodnit, projasnit
10. montovat

Celý postup barvení se provede v barvicím automatu – program č. 9

Výsledek barvení:

kyselé mukopolysacharidy modře, ostatní polysacharidy růžověčerveně

Příprava roztoků:

0,5% roztok kyseliny jodisté:

0,5 g kyseliny jodisté na 100 ml deionizované vody

Schiffovo činidlo:

Kupujeme od firmy Merck

Gillův hematoxylin:

viz PPZ Barvení Hematoxylin – Eosin

Alciánová modř pH 2,5:

Kupujeme od firmy Merck

Všechny časy a teploty uváděné v PPZ jsou pouze orientační a důležitá je kontrola pod mikroskopem, neboť barvení každé tkáně je individuální.

Ověřil: Miloslava Mráčková	Správce dokumentů: Miloslava Mráčková, kl.2740	Vedoucí ZT/datum: Doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D./9.9. 2016	Schválil/datum: Prim. MUDr. Petr Mukenšnabl, Ph.D./9.9.2016
-------------------------------	---	---	---

Zdroj: PPZ/SUP/PAS reakce + alciánová modř

Příloha E – Datasheet k metodě MUC-1

MUC-1

Koncentrovaná a předředěná monoklonální protilátka 901-319-111318

BIOCARE
MEDICAL

Katalogové číslo:	CM 319 B	PM 319 AA
Popis:	0,5 mL, konc.	6,0 mL, RTU
Ředění:	1:100	Ready-to-use
Ředidlo:	Renoirova červeň	N/A

Zamýšlené použití

Pro diagnostické použití in vitro

MUC-1 [695] je myší monoklonální protilátka, která je určena pro laboratorní použití při kvalitativní identifikaci proteinu MUC-1 imunohistochemií (IHC) v lidských tkáních fixovaných ve formalínu (FFPE). Klinická interpretace jakéhokoliv zbarvení nebo jeho nepřítomnosti by měla být doplněna morfologickými studii s použitím vhodných kontrol a měla by být vyhodnocena v kontextu klinické anamnézy pacienta a dalších diagnostických testů kvalifikovaným patologem.

Souhrn a vysvětlení:

MUC-1 je mucinový glykoprotein s velkým buněčným povrchem exprimovaný většinou glandulárních a duktálních epitelálních buněk a některých linií hematopoetických buněk. MUC-1 mucin (Cancer Antigen 15-3) je vylučován z nádorových buněk. Apoprotein mucinu MUC-1 obsahuje transmembránovou doménu, cytoplazmatickou doménu a doménu bohatou na extracelulární sacharidy. Předpokládá se, že abnormální nadměrná exprese MUC-1 v rakovinových buňkách přispívá k jejich agresivnímu růstu, ale molekulární mechanismy spojené s tímto účinkem jsou stále nejasné. MUC-1 barví buněčné membrány, ale také cytoplazmu většiny typů epitelových buněk. Je exprimován na většině sekrečního epitelu, včetně mléčné žlázy a některých hematopoetických buněk. Je hojně exprimován v laktujících mléčných žlázách a nadměrně exprimován v > 90% karcinomech prsu a metastázách. Výjimkou je, že mucinózní karcinomy jsou významně méně reaktivní s MUC-1. Aberantní cytoplazmatická a membránová lokalizace exprese MUC-1 byla spojena se špatným výsledkem pacienta. Adenokarcinomy jsou obecně pozitivní a spinocelulární karcinomy a neepitelální malignity negativní. Vysoké karcinomy prostaty byly negativní, na rozdíl od těch s nízkým stupněm. Rakovina močového měchýře a ledvin byla buď silně pozitivní, nebo negativní. Hepatocelulární karcinomy jsou negativní, ale cholangiogenní karcinomy jsou pozitivní.

Princip procedury:

Detekce antigenu v tkáních a buňkách je vícestupňový imunohistochemický proces. Počáteční krok váže primární protilátku na její specifický epitop. Po označení antigenu primární protilátkou se přidá enzymem značený polymer, který se váže na primární protilátku. Tato detekce navázané protilátky je doložena kolorimetrickou reakcí.

Zdroj: Myší monoklonála

Druhová reaktivita: Člověk; jiné nebyly testovány

Klon: 695

Isotyp: IgG1

Koncentrace proteinu: Koncentraci IgG specifickou pro šarži si vyžádejte u výrobce.

Epitop/Antigen: MUC-1

Buněčná lokalizace: Cytoplazmatická/buněčná membrána

Pozitivní kontrola tkáně: Plíce

Známe aplikace:

Imunohistochemie (tkáně fixované formalínem a zalité do parafínu)

Dodáno jako: Pufr s nosičem proteinu a konzervačním činidlem

Skladování a stabilita:

Skladujte při 2°C až 8°C. Produkt je stabilní do doby expirace vytištěné na obale, pokud je skladován podle předepsaných podmínek. Nepoužívejte po datu expirace. Ředění činidla okamžitě spotřebujte; jakékoli zbývající činidlo by mělo být skladováno při 2°C až 8°C.

Doporučení protokolu (intelliPATH FLX® a manuální použití):

Biokování peroxidázy: Blokujte po dobu 5 minut s Peroxidazed 1.

Predošetření: Odmaskujte antigen pomocí Diva Decloaker dle návodu k použití

Blokování proteinů (volitelné): Inkubujte po dobu 5-10 minut při RT s Background Punisher.

Primární protilátka: Inkubujte po dobu 30-60 minut při RT.

Sonda: N/A

Polymer: Inkubujte po dobu 30 minut při RT s polymerem konjugovaným se sekundární protilátkou.

Chromogen: Inkubujte 5 minut při RT pomocí Biocare's DAB – nebo – Inkubujte 5-7 minut při RT pomocí Warp Red.

Kontrastní barvení

Kontrastní barvení hematoxylinem. Opláchněte deionizovanou vodou.

Aplikujte Tacha's Bluing Solution 1 minutu. Opláchněte deionizovanou vodou.

Technická poznámka:

Tato protilátka určená pro intelliPATH FLX a manuální použití byla standardizována pomocí MACH 2 detection system. Pro omývací kroky použijte TBS.

Limitace:

Optimální ředění protilátky a protokoly pro konkrétní aplikaci se mohou lišit. Tyto zahrnují, ale nejsou omezeny na fixaci, metodu tepelného odmaskování, inkubační časy, tloušťku tkáňového řezu a použitou detekční soupravu. Vzhledem k vynikající citlivosti těchto jedinečných reagentů nejsou doporučeny inkubační časy a titry uvedené v jiných detekčních systémech použitelné, protože výsledky se mohou lišit. Doporučení a protokoly jsou založeny na výhradním použití produktů Biocare. V konečném důsledku je odpovědností zkoušejícího určit optimální podmínky.

Kontrola kvality:

Nahlédněte do CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011

Opatření:

1. Tato protilátka obsahuje méně než 0,1% azidu sodného. Koncentrace nižší než 0,1% nepředstavují nebezpečné množství podle US 29 CFR 1910.1200, OSHA Hazard communication a EC Directive 91/155 / EC. Azid sodný (NaN₃), který se používá jako konzervační látka, je toxický při požití. Azid sodný může reagovat s olověným a měděným potrubím za vzniku vysoce výbušných azidů kovů. Při likvidaci propláchněte velkým množstvím vody, abyste zabránili usazování azidu v potrubí. (Centrum pro kontrolu nemocí, 1976, Národní institut bezpečnosti a ochrany zdraví při práci, 1976) (7)
2. Vzorky, před fixací a po fixaci, a všechny materiály, které jsou jim vystaveny, by měly být zpracovány tak, jako potenciálně infekční a likvidovat s náležitými opatřeními. Nepipetujte reagentie ústy a zamezte kontaktu kůže a sliznic s reagentem a vzorky. Pokud reagenty nebo vzorky přijdou do styku s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody. (8)
3. Mikrobiální kontaminace činidel může vést ke zvýšení nespecifického barvení.
4. Inkubační doby nebo teploty jiné než uvedené mohou způsobit chybné výsledky. Tuto změnu musí uživatel ověřit.
5. Nepoužívejte činidlo po uplynutí doby použitelnosti vyznačené na lahvičce.
6. Karta SDS je k dispozici na vyžádání a je umístěna na adrese <http://biocare.net>.


 Biocare Medical

60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA



Rev: 062117

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

MUC-1

Koncentrovaná a předředěná monoklonální
protilátka 901-319-111318

BIOCARE
M E D I C A L

Odstaňování problémů:

Dodržujte doporučení protokolu specifického pro protilátky podle
dodaného listu. Pokud dojde k atypickým výsledkům, obraťte se na
technickou podporu společnosti Biocare na čísle 1-800-542-2002.

Reference:


1. Rakha EA, *et al.* Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer. *Mod Pathol.* 2005 Oct; 18(10):1295-304.
2. Chauhan SC, *et al.* Aberrant expression of MUC4 in ovarian carcinoma: diagnostic significance alone and in combination with MUC1 and MUC16 (CA125). *Mod Pathol.* 2006 Oct; 19(10):1386-94.
3. Nassar H, *et al.* Pathogenesis of invasive micropapillary carcinoma: role of MUC1 glycoprotein. *Mod Pathol.* 2004 Sep; 17(9):1045-50.
4. Langner C, *et al.* Expression of MUC1 (EMA) and E-cadherin in renal cell carcinoma: a systematic immunohistochemical analysis of 188 cases. *Mod Pathol.* 2004 Feb; 17(2):180-8.
5. Khoury T, *et al.* Inclusion of MUC1 (Ma695) in a panel of immunohistochemical markers is useful for distinguishing between endocervical and endometrial mucinous adenocarcinoma. *BMC Clin Pathol.* 2006 Jan 12; 6(1):1.
6. Ohno T, *et al.* Prognostic significance of combined expression of MUC1 and adhesion molecules in advanced gastric cancer. *Eur J Cancer.* 2006 Jan; 42(2):256-63.
7. Center for Disease Control Manual. Guide: Safety Management, NO. CDC-22, Atlanta, GA. April 30, 1976 "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts."
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.

 Biocare Medical
60 Berry Drive
Facheco, CA 94553
USA



Ref: 062117

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE
Prinsesgracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

Zdroj vlastní

Příloha F – Datasheet k metodě MUC-2

ZETA Corporation

IVD Datový list (Rev 122017)

MUC-2 (klon Ccp58) Myší Monoklonální protilátka

Specifická: člověk, jiná není známa

Imunogen: Syntetický peptid reprezentující oblast na Muc-2 glykoproteinu

Třída Ig: IgG1

Skladování: Vialku skladujte při 4°C. Při skladování mezi 2-8°C, je protilátka stabilní 24 měsíců

Barvicí postupy: Použijte řezy fixované formalinem a zalité do parafinu. Podmínky odmaskování: Doporučuje se předběžné ošetření deparafinované tkáně tepelně indukovaným odmaskováním epitopu. Metody detekce: Polymerní anti-myší / králíčí Ig detekční systém. Pracovní ředění: 1: 100; Pozitivní kontrola: karcinom tlustého střeva. Buněčná lokalizace: buněčná membrána. Účel použití: Diagnostika in vitro (IVD).

Popis: Sekretované epiteliální muciny jsou velké makromolekuly, které vykazují extrémní polydisperzitu. Mucin 2 je hlavní střevní mucin. O-glykany jsou připojeny k MUC2 v potenciálně různorodém uspořádání, což je zásadní pro jejich interakci s endogenními a exogenními lektiny.

Dodané jako: Purifikovaná protilátka s 0,2% BSA a 15mM azidem sodným.



Lidský adenokarcinom tlustého střeva fixovaný ve formalinu barvený anti-MUC-2 protilátkou za použití peroxidázového konjugátu a DAB chromogenu. Všimněte si cytoplazmatického barvení nádorových buněk

Kat. #Z2151 (1.0 ml)

ZETA Corporation
65 N 1st Ave, Ste 202C
Arcadia, CA 91006, USA
Tel: (626) 355-2053
<http://www.zeta-corp.com>



Zeta Corporation

Emergo Europe B.V.
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands
Tel: +31 70 345 8570

Zdroj vlastní

Příloha G – Datasheet k metodě MUC-4

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

Mucin 4 (8G7): sc-53945



ÚVOD

Muciny jsou skupinou glykoproteinů s vysokou molekulovou hmotností, které se skládají z mucinového jádrového proteinu a O-vázaných sacharidů. Mucin 4, mucin vázaný na membránu, je lidský homolog potkaního sialomucinového komplexu (SMC). Protein mucinu 4 sestává z Mucinu 4, velké podjednotky typu amino mucinu a Mucin 4, transmembránové podjednotky obsahující tři domény podobné EGF. Gen Mucin 4 je převažujícím mucinovým genem exprimovaným v normálním urotheliu a je také exprimován v několika normálních tkáních, jako je průdušnice, plíce a varlata. Dysregulace Mucinu 4 vede k vysokým hladinám exprese v nádorech pankreatu a nádorových buněčných liniích. Indukce Mucinu 4 v karcinomu pankreatu kyselinou all-trans-retinovou je zprostředkována prostřednictvím signální dráhy receptoru kyseliny retinové. TGF-2 slouží jako prozatímní mediátor této regulované exprese. Alternativní sestřih na 3'-konci genu pro Mucin 4 generuje alespoň 12 sestřihových variant, které jsou charakterizovány jako dva odlišné typy, sekreční typ a typ spojený s membránou. Protein mucinu 4 působí jako heterodimerní bifunkční povrchový glykoprotein a vytváří tlusté sliznice v nemocném středním uchu.

LOKALIZACE CHROMOSOMŮ

Genetický lokus: MUC4 (lidský) mapování k 3q29.

ZDROJ

Mucin 4 (8G7) je myší monoklonální protilátka proti syntetickému peptidu (STGDTPLPVTDTSSV) proti tandemovým repetitím mucinu 4 lidského původu.

PRODUKT

Každá vialka obsahuje 100 µg IgG₁ v 1,0 ml PBS s <0,1% azidu sodného a 0,1% gelatinu.

APLIKACE

Mucin 4 (8G7) se doporučuje pro detekci mucinu 4 lidského původu pomocí Western blotování (počáteční ředění 1: 200, rozsah ředění 1: 100-1: 1000), imunoprecipitace [1-2 µg na 100-500 µg celkového proteinu (1 ml buněčného lysátu)], imunofluorescence (výchozí ředění 1:50, rozsah ředění 1: 50-1: 500) a imunohistochemie (včetně částí zapuštěných do parafinu) (výchozí ředění 1:50, rozsah ředění 1: 50-1) : 500).

Vhodné pro použití jako kontrolní protilátka pro siRNA mucin 4 (h): sc-43163, mRNA pro shRNA Plasmid (h): sc-43163-SH a mucin 4 shRNA (h) Lentivirové částice: sc-43163-V.

Molekulová hmotnost glykosylovaného mucinu 4: 980 kDa.
Molekulová hmotnost Mucinu 4 850 kDa.

Molekulová hmotnost mucinu 4 až 80 kDa.
Pozitivní kontroly: lysát MCF7 celých buněk: sc-2206 nebo lysát celých buněk HUV-EC-C: sc-364180.

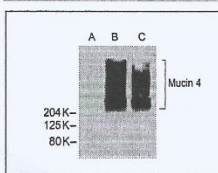
SKLADOVÁNÍ

Skladujte při 4 °C, **NEZMRAZUJTE**. Stabilní po dobu jednoho roku od zaslání. Není nebezpečný. MSDS není vyžadován.

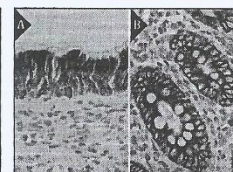
VÝZKUMNÉ POUŽITÍ

Pouze pro výzkumné účely, není vhodný pro diagnostické postupy

DATA



Mucin 4 (8G7): sc-53945. Western blot analýza exprese Mucinu 4 v PANC-1 (A), CD-18/HPAF (B) a Colo357 (C) buňky ukazují glykosylaci. Obrázek poskytl Dr. Surinder Batra, University of Nebraska Medical Center.



Mucin 4 (8G7): sc-53945. Imunoperoxidázové barvení formálního fixovaného, parafinem zalitého lidského nosohltanu s cytoplazmatickým barvením dýchacích epitelálních buněk (A). Imunoperoxidázové barvení lidského slepého střeva fixovaného formálním, zalitého do parafinu, znázorňující membránové a cytoplazmatické barvení žlázových buněk (B).

VYBRANÉ CITACE

1. Chaturvedi, P., et al. 2008. MUC4 Mucin interacts with and stabilizes the HER2 oncoprotein in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 68: 2065-2070.
2. Jonckheere, N., et al. 2012. The Mucin MUC4 and its membrane partner ErbB2 regulate biological properties of human CAPAN-2 pancreatic cancer cells via different signalling pathways. *PLoS ONE* 7: e32232.
3. Skrypek, N., et al. 2013. The MUC4 mucin mediates gemcitabine resistance of human pancreatic cancer cells via the concentrative nucleoside transporter family. *Oncogene* 32: 1714-1723.
4. Sopha, S.C., et al. 2013. Diagnostic and therapeutic implications of a novel immunohistochemical panel detecting duodenal mucosal invasion by pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 6: 2476-2486.
5. Kurisaki-Arakawa, A., et al. 2014. Deeply located low-grade fibromyxoid sarcoma with FUS-CREB3L2 gene fusion in a 5-year-old boy with review of literature. *Diagn. Pathol.* 9: 163.
6. Vasseur, R., et al. 2015. The Mucin MUC4 is a transcriptional and post-transcriptional target of K-Ras oncogene in pancreatic cancer. Implication of MAPK/AP-1, NFκB and RalB signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1849: 1375-1384.
7. Righi, A., et al. 2015. Sclerosing epithelioid fibrosarcoma of the thigh: report of 2 cases with synchronous bone metastases. *Virchows Arch.* 467: 339-344.
8. Taniguchi, T., et al. 2017. N-glycosylation affects the stability and barrier function of the MUC16 mucin. *J. Biol. Chem.* 292: 11079-11090.



Podívejte se také na: Mucin 4 (1G8): sc-33654 pro konjugáty protilátky mucin 4, zahrnující AG, HRP, FITC, PE, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 680 and Alexa Fluor® 790.

Santa Cruz Biotechnology, Inc. 1.800.457.3801 831.457.3800 fax 831.457.3801 Europe +00800 4573 8000 49 6221 4503 0 www.scbt.com

Zdroj vlastní

Příloha H – Datasheet k metodě MUC-6

Primární protilátka připravená k použití Bond™ Muc-6 Glycoprotein (CLH5)

Kat. č.: PA0053

Určené použití

Tato reagentie je určena k diagnostickému použití *in vitro*.

Monoklonální protilátka Muc-6 Glycoprotein (CLH5) je určena k použití při kvalitativním stanovení glykoproteinu Muc-6 světelnou mikroskopií ve tkáni fixované formalinem a zalité do paraformu imunohistochemickým barvením pomocí automatického systému BOND system (zahrnujícího systémy Leica BOND-MAX system a Leica BOND-III system).

Klinickou interpretaci jakéhokoli barvení nebo jeho nepřítomnosti je nutné doplnit morfologickým vyšetřením s použitím správných kontrol a zhodnotit je musí kvalifikovaný patolog v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a jinými diagnostickými testy.

Souhrn a vysvětlení

Imunohistochemické techniky lze použít k průkazu přítomnosti antigenů ve tkáni a v buňkách (viz „Použití reagentů BOND“ v uživatelské dokumentaci BOND). Primární protilátka Muc-6 Glycoprotein (CLH5) je produkt připravený k použití, který byl specificky optimalizován pro použití se soupravou Bond Polymer Refine Detection. Průkazu glykoproteinu Muc-6 se dosáhne tím, že se nejprve umožní vazba protilátky Muc-6 Glycoprotein (CLH5) na řezu, a poté se tato vazba vizualizuje pomocí reagentů dodaných v detekčním systému. Použití těchto produktů v kombinaci s automatickým systémem BOND system (zahrnujícím systémy Leica BOND-MAX system a Leica BOND-III system) snižuje možnost lidské chyby a inherentní variability v důsledku ředění jednotlivých reagentů, manuálního pipetování a použití reagentů.

Dodávané reagentie

Muc-6 Glycoprotein (CLH5) je myší monoklonální protilátka proti lidským antigenům vyráběná jako supernatant z tkáňové kultury a dodávaná ve fyziologickém roztoku pufovaném Tris s přenášejícím proteinem, obsahující jako konzervační prostředek 0,35% ProClin™ 950.

Celkový objem = 7 ml.

Klon

CLH5.

Imunogen

Syntetický peptid v tandemu opakované sekvence Muc-6 purifikovaný HPLC (vysokotlaká kapalinová chromatografie).

Specifita

Lidský glykoprotein Muc-6.

Třída Ig

IgG1.

Koncentrace celkového proteinu

Přibližně 10 mg/ml.

Koncentrace protilátek

0,75 mg/l nebo vyšší, stanovená metodou ELISA.

Ředění a míchání

Primární protilátka Muc-6 Glycoprotein (CLH5) je optimálně naředěná k použití v systému BOND system (zahrnujícím systémy Leica BOND-MAX system a Leica BOND-III system). Rekonstituce, míchání, ředění ani titrace této reagentie nejsou nutné.

Potřebný materiál, který není součástí dodávky

Úplný seznam materiálů potřebných ke zpracování vzorku a k imunohistochemickému barvení pomocí systému BOND system (zahrnujícího systémy Leica BOND-MAX system a Leica BOND-III system) je uveden v bodě „Použití reagentů BOND“ v uživatelské dokumentaci BOND.

Uchovávání a stabilita

Uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Nepoužívejte po uplynutí data použitelnosti uvedeného na štítku obalu.

Známky signalizující kontaminaci a/nebo nestabilitu protilátky Muc-6 Glycoprotein (CLH5) jsou: zkalení roztoku, vznik západu a přítomnost precipitátu.

Okamžitě po použití vraťte do prostředí s teplotou 2–8 °C.

Podmínky uchovávání jiné než výše uvedené musí uživatel ověřit¹.

Bezpečnostní opatření

- Tento produkt je určen pro diagnostické použití *in vitro*.
- Koncentrace přípravku ProClin™ 950 je 0,35 %. Obsahuje aktivní složku 2-methyl-4-isothiazolin-3-one a může způsobit podráždění kůže, očí, sliznic a horních cest dýchacích. Při manipulaci s reagentiemi používejte rukavice k jednorázovému použití.
- Výřisek bezpečnostního materiálového listu získáte od místního distributora nebo oblastní kanceláře společnosti Leica Biosystems, nebo můžete navštívit webovou stránku Leica Biosystems: www.LeicaBiosystems.com
- Se vzorky, před fixací i po fixaci, a se všemi materiály, které s nimi přišly do kontaktu, je nutno zacházet jako by mohly přenášet infekci, a zlikvidovat je s použitím příslušných bezpečnostních opatření². Nikdy reagentie nepipetujte ústy a zabraňte kontaktu reagentů a vzorků s kůží a sliznicemi. Pokud se reagentie nebo vzorky dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody. Vyhledejte lékařskou pomoc.

- Údeje o likvidaci jakýchkoli potenciálně toxických komponent prostudujte ve federálních, státních nebo místních nařízeních.
- Minimalizujte mikrobiální kontaminaci reagensů, mohlo by dojít ke zvýšení výskytu nespecifického barvení.
- Získávání, inkubační doby nebo teploty jiné než specifikované mohou vést k chybným výsledkům. Všechny takové změny musí být uživatelem validovány.

Návod k použití

Primární protilátka Muc-6 Glycoprotein (CLH5) byla vyvinuta k použití v automatickém systému BOND system (zahrnujícím systémy Leica BOND-MAX system a Leica BOND-III system) v kombinaci se soupravou Bond Polymer Refine Detection. Protokol doporučeného barvení primární protilátky Muc-6 Glycoprotein (CLH5) je imunohistochemický protokol F. Teplem indukované získání epitopu se doporučuje s použitím roztoku Bond Epitope Retrieval Solution 2 po dobu 20 minut. **Vezměte na vědomí, že primární protilátka Muc-6 Glycoprotein (CLH5) (PA0053) může poskytnout suboptimální výsledky, pokud se cykly provádějí s použitím jiných protokolů, než je specifikovaný imunohistochemický protokol F, obzvláště u protokolů, kde se peroxidový krok provádí po přidání primární protilátky. Uživatelé musí plně validovat všechny protokoly podle postupů dané laboratoře.**

Očekávané výsledky

Normální tkáně

Klon CLH5 detekoval Muc-6 glykoprotein v cytoplasmě bazálních žaludečních žláz a v epitelu žlučníku. (Celkový počet vyšetřených normálních tkání = 122.)

Nádorové tkáně

Klon CLH5 obarvil 23/24 chronických povrchových gastritid, 3/27 nádorů žaludku (včetně 2/6 tubulárních adenokarcinomů, 1/6 mucinózních adenokarcinomů, 0/6 karcinomů buněk typu pečetního prstenu, 0/6 nediferencovaných karcinomů a 0/3 adenokarcinomů), 1/4 hepatocelulárních karcinomů, 1/2 karcinomů endometria a 1/1 střevní metapláze. Barvení nebylo zjištěno v různých dalších vyšetřovaných abnormálních tkáních včetně nádorů střev (0/9), nádorů štítné žlázy (0/5), nádorů prsu (0/5), metastázujících nádorů (0/5), nádorů mozku (0/4), nádorů plic (0/4), nádorů jícnu (0/3), lymfomů (0/3), nádorů ovaria (0/3), nádorů nadledvinek (0/2), nádorů močového měchýře (0/2), nádorů kostí (0/2), nádorů ledvin (0/2), nádorů hlavy a krku (0/2), nádorů prostaty (0/2), nádorů slinné žlázy (0/2), seminomů (0/2), nádorů děložního hrdla (0/2), nádorů pankreatu (0/1), hyperplazie prostaty (0/1), nádoru jazyka (0/1) a melanomu (0/1). (Celkový počet vyšetřených abnormálních tkání = 121.)

Muc-6 Glycoprotein (CLH5) se doporučuje k detekci glykoproteinu Muc-6 v normálních a neoplastických tkáních, jako doplněk ke konvenční histopatologii s použitím neimunologických histochemických nátěrů.

Omezení specifická pro tento produkt

Protilátka Muc-6 Glycoprotein (CLH5) byla společností Leica Biosystems optimalizována pro použití se soupravou Bond Polymer Refine Detection a s pomocnými reagensy BOND. Uživatelé, kteří se při vyšetření odchýlí od doporučeného postupu, musí za těchto okolností přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků u pacienta. Doby uvedené v protokolu se mohou lišit v důsledku odchylek při fixaci tkání a účinnosti při zvýraznění antigenu a musí být stanoveny empiricky. Při optimalizaci podmínek při získávání a dob v protokolu musí být použity reagenty pro negativní kontrolu.

Řešení problémů

Nápravná opatření jsou uvedena v odkaze 3.

S hlášením neobvyklého barvení kontaktujte místního distributora nebo oblastní kancelář společnosti Leica Biosystems.

Další informace

Další informace o imunobarvení reagensy BOND naleznete pod názvy Princip testu, Potřebné materiály, Příprava vzorku, Kontrola kvality, Ověření testů, Interpretace barvení, Vysvětlení symbolů na štítcích a Obecná omezení v uživatelské dokumentaci BOND, v bodě „Použití reagensů BOND“.

Literatura

1. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
2. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
3. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
4. Honjo K, Hiraki T, Higashi M, et al. Immunohistochemical expression profiles of mucin antigens in salivary gland mucocutaneous carcinoma: MUC4- and MUC6-negative expression predicts a shortened survival in the early postoperative phase. *Histology and Histopathology*. 2017; 11913.
5. Walsh MD, Clendenning M, Williamson E et al. Expression of MUC2, MUC5AC, MUC5B and MUC6 mucins in colorectal cancers and their association with the CpG island methylator phenotype. *Modern Pathology*. 2013; 26:1642-1656.
6. Vernygorodskiy S. Immunohistochemical evaluation of mucin expression in precancerous tissue of stomach. *Experimental Oncology*. 2013; 35(2): 114-117.
7. Rakha EA, Boyce RWG, Abd El-Rehim D et al. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer. *Modern Pathology*. 2005; 18:1295-1304.
8. Pinto-de-Sousa J, Reis CA, David L, Pimenta A, et al. MUC5B expression in gastric carcinoma: relationship with clinico-pathological parameters and with expression of mucins MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6. *Virchows Archive: International Journal of Pathology*. 2004; 444(3): 224-230.
9. Matsukita S, Nomoto M, Kitajima S, et al. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in mucinous carcinoma of the breast: comparison with invasive ductal carcinoma. *Histopathology*. 2003; 42(1):26–36.

Datum vydání

20 listopad 2017

Příloha I – Povolení sběru informací ve FN Plzeň



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

Monika Hřebcová

Studentka oboru Zdravotní laborant

Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních vyšetření, používaných v Šiklově ústavu patologie (ŠÚP) FN Plzeň. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracování Vaší bakalářské práce s názvem „Odlíšení parciální moly od časného hydropického abortu pomocí histochemických a imunohistochemických metod“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní zdravotní laborantka ŠÚP souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, pokud budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- **Sběr informací budete provádět v době své, školou schválené, odborné praxe na ŠÚP, pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je pan MUDr. Ondřej Ondřej, Ph.D., lékař ŠÚP FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.: 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovas@fnplzen.cz

18. 2. 2020