

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2022**

**Denisa Bošková**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

**Denisa Bošková**

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**CHARAKTERIZACE HLENOVÝCH SUBSTANCÍ  
PŘÍTOMNÝCH V CHORIOVÝCH KLCÍCH PLACENTY**

**Bakalářská práce**

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

PLZEŇ 2022



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31. 03. 2022

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Bošková Denisa

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Charakterizace hlenových substancí přítomných v choriových klcích placenty

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

Počet stran – číslované: 48

Počet stran – nečíslované: 32

Počet příloh: 9

Počet titulů použité literatury: 36

Klíčová slova: choriové klky, muciny, placenta, hydropické, kyselé mukopolysacharidy

### **Souhrn:**

Tato bakalářská práce je zaměřena na charakterizaci hlenových substancí v choriových klcích placenty. Z archivního materiálu Šiklova ústavu patologie v Plzni bylo vybráno 9 parafinových bločků placent s onemocněním choriových klků. Desátý parafinový bloček byl zhotoven z fyziologické placenty. Z bločků byly vytvořeny parafinové řezy, které byly zpracovány čtyřmi histochemickými metodami. Tři z těchto metod potvrdily přítomnost kyselých mukopolysacharidů uvnitř choriových klků sledovaného souboru. Metoda Hematoxylin–Eosin umožnila vzorky přehledně obarvit. Imunohistochemickými metodami byla sledována přítomnost glykoproteinů MUC–1, MUC–2, MUC–4 a MUC–6. Výskyt sekretovaných (gelotvorných) mucinů MUC–2 a MUC–6 nebyl prokázán u žádného ze zpracovaných vzorků. Membránově vázaný mucin MUC–1 také nevykazoval pozitivitu. U mucinu MUC–4, jako jediného z vyšetřovaných mucinů byla prokázána velice slabá exprese uvnitř choriových klků.

## **Abstract**

Surname and name: Bošková Denisa

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Characterization of mucus substances present in the chorionic villi of the placenta

Consultant: MUDr. Ondrej Ondič, Ph.D.

Number of pages – numbered: 48

Number of pages – unnumbered: 32

Number of appendices: 9

Number of literature items used: 36

Keywords: chorionic villi, mucins, placenta, hydropic, acidic mucopolysaccharides

### Summary:

This bachelor thesis is focused on the characterization of mucus substances in the chorionic villi of the placenta. 9 paraffin blocks of placenta with chorionic villi disease were selected from the archival material of the Šikl's Institute of Pathology in Pilsen. The tenth paraffin block was made of physiological placenta. Paraffin sections were made from the blocks and processed by four histochemical methods. Three of these methods confirmed the presence of acidic mucopolysaccharides within the chorionic villi of the study group. The Hematoxylin–Eosin method made it possible to stain the samples clearly. The presence of glycoproteins MUC–1, MUC–2, MUC–4 and MUC–6 were monitored by immunohistochemical methods. The presence of secreted (gelling) mucins MUC–2 and MUC–6 were not detected in any of the processed samples. Membrane-bound mucin MUC-1 also did not show positivity. MUC–4 mucin, as the only mucin investigated, showed very weak expression within the chorionic villi.

## **Předmluva**

Toto téma bakalářské práce jsem si vybrala, protože mě obor histologie zajímá. Chtěla jsem se dozvědět více informací o placentě a o hlenových substancích obsažených v choriových klcích hydropicky změněných placent, které byly naposledy zkoumány před 28 lety. Proto cílem bylo využít histochemické metody k potvrzení přítomnosti kyselých mukopolysacharidů uvnitř choriových klků a imunohistochemické metody k zpřesnění histologického popisu klků v rámci obecné patologie.

## **Poděkování**

Děkuji MUDr. Ondreji Ondíčovi, Ph.D. za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálních podkladů. Dále děkuji paní Gabriele Suché za sjednání spolupráce s panem doktorem Ondíčem. Také bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za obrovskou podporu.

# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ .....	11
SEZNAM TABULEK .....	12
SEZNAM ZKRATEK .....	13
ÚVOD.....	15
TEORETICKÁ ČÁST .....	16
1 PLACENTA .....	16
1.1 Vývoj placenty .....	16
1.1.1 Změny v trofoblastu .....	16
1.1.2 Vývoj choriových klků .....	17
1.1.3 Dozrávání a diferenciacie choriových klků .....	18
1.2 Stavba placenty .....	19
1.3 Oběh krve v placentě .....	20
1.4 Funkce placenty .....	21
1.4.1 Placentární transport .....	21
1.4.2 Placentární bariéra .....	22
1.4.3 Přenos mateřských protilátek .....	23
1.4.4 Produkce hormonů.....	24
2 ONEMOCNĚNÍ CHORIOVÝCH KLKŮ .....	27
2.1 Gestační trofoblastická nemoc .....	27
2.1.1 Hydatidózní mola .....	27
2.1.2 Gestační trofoblastická neoplazie.....	29
3 PUPEČNÍK.....	31
3.1.1 Stavba pupečníku.....	31
3.1.2 Funkce pupeční šnůry .....	32
3.1.3 Inervace pupečníku.....	32
4 MUKOSUBSTANCE.....	33
4.1 Glykosaminoglykany (mukopolysacharidy).....	33
4.1.1 Proteoglykany .....	34
4.2 Glykoproteiny (mukoproteiny) .....	34
4.2.1 Mucinózní žlázy .....	35
4.2.2 Mucinózní buňky .....	35
4.2.3 Muciny.....	35
PRAKTICKÁ ČÁST .....	40
5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE .....	40
5.1 Hlavní cíl.....	40



6	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY .....	41
6.1	Výzkumné problémy.....	41
6.2	Výzkumné otázky .....	41
7	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU .....	42
8	METODIKA PRÁCE .....	43
8.1	Přikrajování materiálu.....	43
8.2	Odvodnění a prosycení tkáňového vzorku.....	43
8.3	Zalítí do parafinu .....	44
8.4	Krájení parafinových bločků.....	44
8.5	Napínání parafinových řezů.....	45
8.6	Odparafinování tkáňových řezů.....	45
8.7	Barvení.....	46
8.7.1	Histochemické barvení .....	46
8.7.2	Imunohistochemické barvení.....	47
8.8	Montování obarvených řezů .....	48
9	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	49
9.1	Histochemické barvení .....	49
9.1.1	Hematoxylin – Eosin .....	49
9.1.2	Toluidinová modř .....	51
9.1.3	Alciánová modř .....	53
9.1.4	PAS reakce + alciánová modř .....	55
9.2	Imunohistochemické barvení .....	57
9.2.1	MUC–1 .....	57
9.2.2	MUC–2.....	58
9.2.3	MUC–4.....	59
9.2.4	MUC–6.....	61
	DISKUZE.....	62
	ZÁVĚR.....	64
	SEZNAM LITERATURY.....	65
	SEZNAM PŘÍLOH .....	69
	PŘÍLOHY .....	70
	Příloha 1 – Pracovní postup barvení Hematoxylin – Eosin.....	70
	Příloha 2 – Pracovní postup barvení Toluidinovou modří .....	71
	Příloha 3 – Pracovní postup barvení alciánovou modří.....	73
	Příloha 4 – Pracovní postup barvení PAS reakce + alciánová modř.....	74
	Příloha 5 – Pracovní postup pro protilátku MUC–1.....	75
	Příloha 6 – Pracovní postup pro protilátku MUC–2.....	76

Příloha 7 – Pracovní postup pro protilátku MUC-4.....	77
Příloha 8 – Pracovní postup pro protilátku MUC-6.....	78
Příloha 9 – Souhlas s poskytováním informací .....	80

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vývoj klku .....	17
Obrázek 2: Struktura klků v různých fázích vývoje.....	18
Obrázek 3: Přikrajovací pracoviště.....	43
Obrázek 4: Přístroj BenchMark Ultra – Ventana .....	48
Obrázek 5: Vzorek č. 16706/R8 – Fyziologická placenta .....	50
Obrázek 6: Vzorek č. 9149 – Placenta časného hydropického abortu .....	52
Obrázek 7: Vzorek č. 9149 – Placenta časného hydropického abortu .....	54
Obrázek 8: Vzorek č. 9485 – Placenta časného hydropického abortu .....	56
Obrázek 9: Vzorek č. 189/R2 – Placenta s prokázanou parciální molou .....	60
Obrázek 10: Vzorek č. 189/R12 – Placenta s prokázanou parciální molou .....	60

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Barvení Hematoxylin – Eosin .....	49
Tabulka 2: Barvení Toluidinovou modří .....	51
Tabulka 3: Barvení alciánovou modří .....	53
Tabulka 4: Barvení PAS reakce + alciánová modř .....	55
Tabulka 5: Imunohistochemické barvení MUC–1 .....	57
Tabulka 6: Imunohistochemické barvení MUC–2 .....	58
Tabulka 7: Imunohistochemické barvení MUC–4 .....	59
Tabulka 8: Imunohistochemické barvení MUC–6 .....	61

## SEZNAM ZKRATEK

ml/min.....	mililitrů za minutu
m <sup>2</sup> .....	metr čtvereční
ml.....	mililitr
Da.....	dalton
tj.....	to jest
tzn.....	to znamená
µm.....	mikrometr
IgG.....	imunoglobulin G
E1.....	estron
E2.....	17β-estradiol
E3.....	estriol
E4.....	estetrol
DHEA.....	dehydroepiandrosteron
hCG.....	lidský choriogonadotropin
LH.....	luteinizační hormon
FSH.....	folikulostimulační hormon
Treg.....	T regulační lymfocyty
hPL.....	lidský placentární laktogen
GTD.....	Gestační trofoblastická nemoc
HM.....	hydatidózní mola
MHP.....	parciální hydatidózní mola
MHC.....	úplná hydatidózní mola

tzv..... takzvaně

GTN ..... Gestáční trofoblastická neoplazie

cm..... centimetr

GAG..... glykosaminoglykany

PAS ..... Periodic Acid Schiff

MUC1 ..... mucin 1

MUC2 ..... mucin 2

MUC4 ..... mucin 4

MUC5AC..... mucin 5AC

MUC5B..... mucin 5B

MUC6 ..... mucin 6

MUC7 ..... mucin 7

MUC8 ..... mucin 8

MUC9 ..... mucin 9

MUC16 ..... mucin 16

MUC20 ..... mucin 20

## ÚVOD

Téma této bakalářské práce je zaměřeno na charakterizaci mukosubstancí obsažených v choriových klcích placent, u kterých byl histologicky potvrzen edém.

Mukosubstance tvoří základní hmotu, která se zásadním způsobem podílí na stupni hydratace mezibuněčné hmoty. Kyselé mukopolysacharidy (glykosaminoglykany) mají schopnost vázat velké množství vody, díky kterému zaujímají značný prostor. Patologické hromadění mukopolysacharidů ve tkáních způsobuje zvětšení orgánů nebo jejich částí. Muciny jsou produkovány různými sekrečními epiteliálními buňkami a jsou hlavní složkou jakékoli mukózní sekrece. Tvoří ochrannou fyzikální bariéru a pomáhají zvlhčovat povrch tkání. Jejich nadměrná exprese hraje významnou roli při patologických stavech.

Tato bakalářská práce se skládá z teoretické a praktické části. Teoretická část se zabývá všeobecnými informacemi o placentě. Podrobně popisuje její vývoj, stavbu, krevní oběh a funkci. Následující kapitola se zaměřuje na onemocnění choriových klků, u kterých je charakteristické, že se placentární klky stávají hydropickými. Další kapitola se věnuje pupečníku, který je rutinně zpracováván společně s fyziologickou placentou. Poslední kapitola teoretické části rozděluje mukosubstance do dvou podkapitol, které charakterizují jejich biochemické složení a biologickou funkci. V praktické části je popsán pracovní postup histochemických a imunohistochemických metod. Výsledky jsou zpracovány v podobě tabulek a fotografií.

Cílem bakalářské práce je biochemická a biologická charakteristika mukosubstancí v choriových klcích placenty z deseti parafinových bloků archivního materiálu Šiklova ústavu patologie. Dalším cílem bakalářské práce je využití histochemických a imunohistochemických metod ke sledování přítomnosti mukosubstancí v choriových klcích placenty a následném zpřesnění histologického popisu klků v rámci obecné patologie.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 PLACENTA

### 1.1 Vývoj placenty

Na začátku implantace je endometrium v sekreční fázi a jeho tloušťka je asi 6 mm. Sliznice je dobře prokrvená a tkáňovou tekutinou prosáklá. Žlázy sliznice hojně produkují hlenovitý sekret. Do přední nebo zadní děložní stěny v horní třetině těla dělohy se implantuje blastocysta. Po uhníždění blastocysty do endometria matky začíná vývoj placenty. Na povrchu blastocysty se nachází vnější buněčná vrstva, která se nazývá trofoblast. Trofoblast je zdrojem extraembryonálních struktur. Blastocysta se skládá také z vnitřní buněčné vrstvy, jenž je připojena k embryonálnímu (implantačnímu) pólu a vyvíjí se ve vlastní embryo. (1)

#### 1.1.1 Změny v trofoblastu

Trofoblast se diferencuje na tři morfologicky i funkčně odlišné části. Vnitřní vrstva se nazývá cytotrofoblast a vnější vrstva syncytiotrofoblast. Vrstva, která představuje přechod mezi cytotrofoblastem a syncytiotrofoblastem se nazývá intermediální trofoblast. (1)

Cytotrofoblast tvoří Langhansovy buňky, což jsou kubické buňky s kulatým jádrem a chromofobní cytoplazmou. Buňky cytotrofoblastu se vyznačují vysokou proliferační aktivitou. (1; 2)

Intermediální trofoblast je tvořen buňkami variabilního tvaru s větším tmavým jádrem, vakuolizovanou cytoplazmou a typickým jádérkem. Tyto buňky jsou větší než cytotrofoblastové. Také mohou mít více jader, ale převážně mají jedno jádro. (1; 2)

Syncytiotrofoblast vzniká z buněk cytotrofoblastu. Vlivem dostatečného vybavení buněčných organel dochází ke splynutí buněk, rozruší se buněčné membrány a vzniká mnohojaderná cytoplazma (syncytium). Syncytiotrofoblast rozrušuje žlázy, cévy a tkáň sliznice pomocí proteolytických enzymů. Výživné látky, které vznikly z narušené sliznice vyživují buňky embrya. (1)



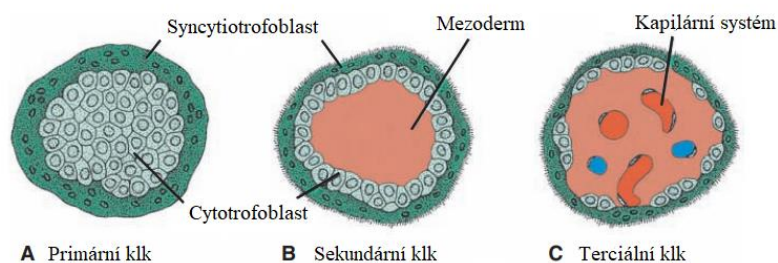
### 1.1.2 Vývoj choriových klků

Trofoblast nejdříve vytvoří síť buněk. Vzniklé buňky se později řadí do sloupků cytotrofoblastu, který je krytý syncytiotrofoblastem a vytvoří základy budoucích choriových klků – tzv. primárních choriových klků. (1; 3; 4)

Okolo 10.-12. dne vývoje se začínají zjevovat v syncytiotrofoblastu vakuoly. Tyto vzniklé vakuoly splývají do dutinek neboli lakun, které se propojují a vytvářejí prostorovou síť. Vzniklá prostorová síť je základem intervilózních prostor. Mateřská krev je dodávána do placenty spirálními tepnami v děloze. Z porušených kapilár sliznice začíná proudit mateřská krev do intervilózních prostor a vzniká uteroplacentární oběh. 14. den po oplodnění začne do cytotrofoblastu primárních choriových klků vrůstat mezoderm, a tak vzniknou sekundární choriové klky. (1; 3)

Ve třetím týdnu vývoje se začínají v choriových klcích vyvíjet extraembryonální cévy. Mezodermální buňky v jádru klku se začínají diferencovat do krevních buněk a malých krevních cév, které vytvoří kapilární systém. Choriové klky obsahující kapiláry se nazývají terciární klky. Přítomnost těchto kapilár vytváří předpoklady pro výměnu látek mezi mateřskou a fetální krví. Krev matky v intervilózních prostorech omývá povrch choriových klků. Krev plodu v kapilárách terciálních klků se okysličuje přes cévy v tzv. zárodečném stvolu. (1; 4)

Obrázek 1: Vývoj klku



Zdroj: (3)

A. Příčný řez primárního klku ukazující jádro cytotrofoblastických buněk pokrytý vrstvou syncytia. (3)

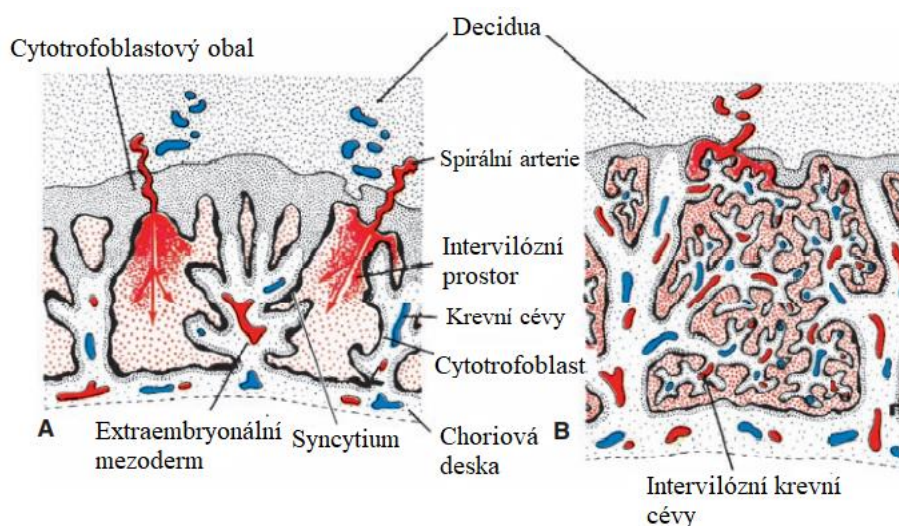
B. Příčný řez sekundárního klku. Mezoderm je pokryt jedinou vrstvou cytotrofoblastických buněk, která je pokryta syncytiem. (3)

C. Příčný řez terciálního klku, který obsahuje kapilární systém. (3)

Na začátku druhého měsíce je trofoblast charakterizován velkým počtem sekundárních a terciárních klků, které mu dávají vzhled. Kmenové (kotvící, úponové) klky vznikají z přirůstání buněčných sloupců cytotrofoblastu k decidua basalis. Buněčné sloupce cytotrofoblastu se nachází na volných okrajích terminálních choriových klků. Úponové klky se rozprostírají od mezodermu choriové desky k cytotrofoblastovému obalu. (1; 3; 4)

Povrch klků tvoří syncytium, spočívající na vrstvě cytotrofoblastových buněk, které pokrývají vaskulární mezoderm. Jak těhotenství postupuje, klky směrem k decidua basalis stále rostou a rozšiřují se, což vede k chorionu frondosum (hustý chorion). Klky na embryonální straně degenerují a do třetího měsíce je tato strana chorionu, nyní známá jako choriová leve, hladká s velkým množstvím lipidů a glykogenu. Chorion frondosum spolu s decidua basalis tvoří placentu. (3; 4)

Obrázek 2: Struktura klků v různých fázích vývoje.



Zdroj: (3)

A. Během čtvrtého týdne. Extraembryonální mezoderm proniká kmenovými klky ve směru deciduální desky. (3)

B. Během čtvrtého měsíce. V mnoha malých klcích je stěna kapilár v přímém kontaktu se syncytiem. (3)

### 1.1.3 Dozrívání a diferenciací choriových klků

Po celém obvodu choriové blány vyrůstají terciální choriové klky. Terciální choriové klky, také nazývané mezenchymové klky jsou charakteristické tím, že mají vaskularizované mezenchymové stroma, jednu vrstvu cytotrofoblastu a na povrchu vrstvu syncytiotrofoblastu. (1)

Dalším typem klků jsou nezralé klky obsahující cévy, které jsou umístěny blízko jejich středu. Přibližně od 7. do 8. týdne těhotenství jsou nezralé intermediální klky umístěny mezi kmenové a mezenchymální klky. Tyto časně nezralé intermediální klky se později vyvinou v kmenové klky s více extracelulární matricí, kolagenním stromatem, diferenciací myofibroblastů a buněk hladkého svalstva kolem centrálních cév. (5; 6)

Kmenový klk (villus ancorans) prochází celou hloubkou placenty a díky trofoblastu se připojuje k deciduální ploténce mateřské části placenty. Do meziklkových prostor vyrůstají z kmenových klků volné výběžky, ze kterých vznikají volné klky. (1; 5)

Volný klk (villus liber) je obvykle rozčleněný na větvičky. Povrch klku zahrnuje vrstvičku syncytiotrofoblastu, pod ním se výjimečně nachází Langhansovy buňky cytotrofoblastu, které slouží k obnově. Jádro klku je tvořeno řídkým kolagenním až rosolovitým vazivem a také obsahuje mnohonásobná kolagenní vlákna, fibroblasty, myofibroblasty a specializované makrofágy (Hofbauerovy buňky). (5)

Dále se kmenové klky větví ve zralé intermediální klky, které jsou sídlem endokrinních a metabolických funkcí placenty. Vlasečnice ve zralém klku jsou pod vrstvou syncytiotrofoblastu. Terminální klky jsou místem nejefektivnější výměny krevních plynů mezi krevním oběhem matky a plodu. (1; 5)

## **1.2 Stavba placenty**

Placenta má diskoidní tvar o průměru 15 až 25 cm, její tloušťka je přibližně 3 cm a váha asi 500 až 600 g. Při narození je odtržena z děložní stěny a přibližně 30 minut po narození dítěte je vyloučena z děložní dutiny. (3)

Tento orgán zajišťuje výměnu živin a plynů mezi mateřským a fetálním prostorem. V devátém týdnu vývoje plodu se jeho nároky na nutriční a další faktory postupně zvyšují, což způsobuje velké změny v placentě. Zvětšuje se povrch mezi mateřskými a fetálními komponentami. S rostoucí produkcí plodové vody se mění i dispozice plodových membrán. Poměr mezi hmotností plodu k hmotnosti placenty klesá postupem těhotenství. Placenta může regulovat růst plodu a vývoj mozku plodu. Placenta se vyvíjí v symbióze mezi tkáněmi plodu a tkáněmi matky. Proto se dělí na dvě části. Fetální část (pars fetalis placentae), která vzniká z trofoblastu a extraembryonálního mezodermu (chorionická deska) a mateřská část (pars materna placentae) je tvořená z decidua basalis (3; 7; 8)

Plodovou plochu placenty tvoří choriová ploténka (lamina chorionica), choriové klky a jednovrstevný kubický amniový epitel. Choriová plotna je tvořena vazivem, ve kterém se rozvětvují pupečnickové cévy do periferie placenty. Povrch je kryt lesklou modrošedou blánou – amniem, na kterou se upíná pupečník. Povrch amniové dutiny na převrácené straně k plodu je kryt amniovým epitelem. (1; 4; 7)

Mateřská část placenty je tvořena bazální destičkou (decidua basalis), která je složena z velkých deciduálních buněk nepravidelného oválného tvaru. Vzniká z ní deciduální plotna (lamina decidualis), která slouží jako podklad. Deciduální buňky obsahují mnoho enzymů, jako jsou nespecifická esteráza a kyselá fosfatáza. Z deciduální ploténky směrem k plodové části vyrůstají trofoblastem pokrytá deciduální septa, které neprorůstají až k choriové ploténce, čímž oddělují placentu na okrsky zvané kotyledony. (4; 2; 5)

Kotyledon je funkční a oběhovou jednotkou placenty. Každá placenta má okolo 120 až 240 kotyledonů. Jeden kotyledon se skládá z 10–20 lobulů, které představují makroskopicky viditelnou, morfologickou jednotku placenty. (2; 4)

### **1.3 Oběh krve v placentě**

Placenta je jedinečný cévní orgán, který přijímá krevní zásoby z mateřského, ale také z fetálního systému, a proto má dva oddělené krevní oběhové systémy: mateřsko-placentární (uteroplacentární) krevní oběh a fetálně-placentární (fetoplacentární) krevní oběh. (9)

Fetálně-placentární oběh umožňuje párovým pupečnickým tepnám přenášet odkysličenou a živinami vyčerpanou fetální krev z těla plodu do placenty. Pupeční tepny se dělí do placentárních arterií, které se v choriové ploténce větví až do vlásečnicové sítě, která zabíhá až do terciálních choriových klků. V kapilárách se krev okyslíčí a přechází do venózních cév, postupně se spojujících v jednu pupečnickovou žílu. Po výměně kyslíku a živin odvádí pupeční žíla čerstvou okysličenou a na živiny bohatou krev cirkulující zpět do fetálního systémového oběhu. (2; 4; 5; 9)

Uteroplacentární oběh začíná krví matky, která tryská otvory v bazální ploténce z deciduálních spirálních tepen do prostoru mezi klky, které omývá. Mateřsko-placentární krevní tok je poháněn mateřským arteriálním tlakem, protože uteroplacentární cévy se dokáží přizpůsobit masivnímu zvýšení děložního průtoku krve v průběhu těhotenství. Během těhotenství se objem krve matky postupně zvyšuje a dosahuje maxima přibližně ve 32. až 34. týdnu a poté zůstává relativně konstantní až do porodu. (2; 9)

V termínu porodu je průtok krve matky do placenty přibližně 600–700 ml/min. Odhaduje se, že povrch syncytiotrofoblastů je přibližně 12 m<sup>2</sup> a délka fetálních kapilár plně vyvinuté placenty je přibližně 320 kilometrů v termínu porodu. V placentě nedochází k prolínání krve matky a plodu. (9)

## **1.4 Funkce placenty**

Hlavní funkcí placenty je výměna metabolických a plyných produktů mezi mateřským a fetálním krevním oběhem a produkce hormonů. V době, kdy plod nemá plně rozvinutý imunitní systém tvoří placenta bariéru proti infekčním agens pomocí mateřských imunoglobulinů, které zprostředkovává pro plod. (3; 4)

Placenta zajišťuje pomoc při odstraňování odpadních produktů z plodu k matce. Kromě toho hraje důležitou roli při syntéze hormonů, peptidů a steroidů, které jsou životně důležité pro úspěšné těhotenství. Placenta poskytuje spojení mezi oběhy dvou odlišných jedinců, ale také funguje jako bariéra chránící plod před xenobiotiky v mateřské krvi. (10)

### **1.4.1 Placentární transport**

#### **Výměna plynů**

Výměna krevních plynů, jako je kyslík, oxid uhličitý, oxid uhelnatý se provádí jednoduchou difúzí na základě koncentračního spádu. Přenos snadno rozpustného oxidu uhličitého je snadnější ve srovnání s kyslíkem. Gradient parciálního napětí mezi plodem a matkou usnadňuje transport kyslíku přes placentární membránu. Rozdíl ve vlastnostech dospělého a fetálního hemoglobinu trvale udržuje gradient. Plod extrahuje 20 až 30 ml kyslíku za minutu z mateřského oběhu, a dokonce i krátkodobé přerušení dodávky kyslíku je pro plod smrtelné. (3; 4; 11)

#### **Výměna živin a elektrolytů**

Výměna živin a elektrolytů, jako jsou aminokyseliny, volné mastné kyseliny, sacharidy, glukóza a vitamíny probíhá rychle a zvyšuje se s postupujícím těhotenstvím. (3; 4)

Přes placentární membránu se transportují ve vodě rozpustné vitamíny a esenciální aminokyseliny aktivně, a to pomocí specifických enzymů vyžadujících energii. Přenos makromolekulárních látek (lipoproteiny, fosfolipidy, globuliny) probíhá pomocí pinocytózy. Vlivem osmotického a hydrostatického tlaku přestupuje voda přes placentu volně pomocí difuze. Draslík a vápník jsou transportovány aktivně. Sodík je pravděpodobně regulován

enzymaticky, což objasňuje, proč je v plazmě matky nižší koncentrace sodíku než ve venózní plazmě plodu. Krev matky také obsahuje nižší koncentrace aminových kyselin než v krvi plodu, což vypovídá o aktivním transportu proti gradientu. V malém množství přestupují placentou volné mastné kyseliny. Plod si vytváří vlastní fetální tuky a sérové proteiny, a proto není potřeba, aby proteiny přecházely od matky. Výjimkou jsou imunoglobuliny. (4)

### **Přenos léků**

Distribuce z mateřského oběhu do placenty je prvním krokem přenosu léčiva přes placentu a je primární funkcí krevního toku dělohy a propustnosti placentární membrány. Přenos placenty pro konkrétní léčivo lze obecně označit buď jako omezená propustnost (hydrofilní léčiva), omezená průtoková rychlost (lipofilní léčiva), nebo obojí. Léčiva mají většinou malou molekulu a jsou relativně rozpustná v tucích. Rychlost přestupu léků závisí na molekulové hmotnosti, rozpustnosti ionizovaných molekul v tuku a tloušťce trofoblastu. (4; 10)

Léky s molekulovou hmotností  $> 500$  Da mají často neúplný přenos přes placentu. Léky s molekulovou hmotností  $> 1\ 000$  Da přecházejí velmi špatně. Například různé hepariny (rozmezí molekulové hmotnosti  $3\ 000 - 15\ 000$  Da) se díky své relativně vysoké molekulové hmotnosti nepřenášejí přes placentu. Většina léčiv má molekulovou hmotnost  $< 500$  Da, a proto velikost jen zřídka omezuje rychlost přenosu léčiv placentou. (10)

Rozpustnost v tucích je také důležitým faktorem určujícím přenos léčiva přes biologickou membránu. Léčiva, která jsou rozpustná v tucích, snadno projdou placentou, zatímco hydrofilnějším léčivům je obecně bráněno. (10)

Průměrná výměnná plocha (plocha klků) se pohybuje ve 28 týdnu těhotenství od  $3,4$  m<sup>2</sup> do  $12,6$  m<sup>2</sup> v době termínu porodu, proto s postupujícím těhotenstvím přestupují léky placentu rychleji. (4; 10)

#### **1.4.2 Placentární bariéra**

Placenta je jediným orgánem spojujícím dva různé jedince, matku a plod. Lidská placenta je považována za hemochoriální tj., mateřská krev v intervenilózních prostorech je oddělena od krve plodu chorióvými klky. (9)

Funkce hematoplacentární bariéry spočívá v regulaci přenosu materiálu mezi mateřským a fetálním oběhem. Placentární membrána není skutečnou bariérou, protože přes

ni volně prochází mnoho látek. Placentou procházejí jen některé látky, jiným látkám není průchod umožněn i při stejné velikosti molekuly, tzn. že je placentární bariéra selektivně propustná. (9; 12; 13)

Placentární membrána se zpočátku skládá ze čtyř vrstev, které jsou endoteliální výstelka cév plodu, pojivová tkáň v jádře klků, cytotrofoblastická vrstva a vrstva syncytiotrofoblastu. Od čtvrtého měsíce se placentární membrána ztenčuje, protože endoteliální výstelka cév je v těsném kontaktu s membránou trofoblastu, což značně zvyšuje rychlost výměny dýchacích plynů a živin. (3)

Průměrná tloušťka bariéry se pohybuje od prvního trimestru okolo 20 až 30  $\mu\text{m}$  a do třetího trimestru od 2 do 4  $\mu\text{m}$ . V termínu porodu se průměrná plocha pohybuje přibližně okolo 11  $\text{m}^2$  a rychlost průtoku krve placentou je přibližně 450 ml/min. (12)

#### **1.4.3 Přenos mateřských protilátek**

Pro fyziologický vývoj těhotenství je velmi důležitý stav imunitní tolerance v těhotenství. Plod a placenta musí být považovány za dostatečně cizí (heterologní) i dostatečně vlastní (autologní) bílkovinnou substanci. (7)

Placentární syncytiotrofoblast má největší podíl na vytvoření příznivého imunologického prostředí, protože syncytiotrofoblastová membrána je vystavena pozornosti krvi matky. Mateřská krev obsahuje protilátky, buňky imunitního systému a biologicky aktivní látky, které mají schopnost poškozovat buňky plodu, na kterých se nacházejí otcovské aloantigeny. Molekuly, jenž nemají z imunologického hlediska schopnost poškodit buňky plodu, mohou obousměrně prostupovat membránou. (4)

Povrch placenty je kryt buňkami vilózního trofoblastu, které rostou do děložních arterií, nahrazují endotelové buňky matky a obstarávají látkovou výměnu mezi fetální cirkulací a mateřskou krví v intervilózním prostoru. Tyto buňky také produkují placentární hormony (choriový gonadotropin) a další látky (prostaglandiny), a proto se podílejí s buňkami imunitního systému z matčiny dělohy na vzájemné spolupráci. (4)

Matka nesmí být senzibilována antigeny ze strany plodu, a proto placenta používá mnoho mechanismů vůči imunitním reakcím matky proti antigenně odlišnému plodu. Jeden z mechanismů je vylučování neurokininu B. Jedná se o stejný mechanismus, který využívají paraziti, aby jejich imunitní systém nebyl detekovatelný v hostitelském organismu. Další mechanismus, který placenta používá je přítomnost malých lymfatických supresorových

buňek ve fetálním zárodku. Tyto buňky inhibují mateřské cytotoxické T-buňky. Aktivní transport protilátek je další imunologickou funkcí placenty. Výhradně protilátky typu IgG přecházejí placentou, protože placentární bariéra není zcela nepropustná. (7)

Imunologická kompetence se začíná rozvíjet pozdě v prvním trimestru, kdy plod tvoří všechny složky komplementu. Imunoglobulin G se začíná transportovat z matky na plod přibližně ve 14. týdnu. Plod tímto způsobem získává pasivní imunitu proti různým infekčním chorobám. Novorozenci začínají produkovat vlastní IgG. (3)

#### **1.4.4 Produkce hormonů**

Placenta funguje jako endokrinní žláza, která produkuje hormony. Placentární hormony jsou vylučovány hlavně syncytiotrofoblastem, vysoce a přísně regulovaným způsobem. Hlavními placentárními hormony placenty jsou estrogeny, progesteron, choriový gonadotropin a placentární laktogen. Tyto hormony jsou secerovány do krevního oběhu matky. Dalšími hormony jsou choriový kortikotropin, choriový thyreotropin a relaxin, což je hormon uvolňující pánevní vazivo. Ve spolupráci placenty a fetálními orgány vznikají některé hormony, např. estrogeny, a proto je na placentu a plod pohlíženo jako na funkční fetoplacentární jednotku. (4; 7; 11)

Progesteron je nepostradatelný hormon pro udržení gravidity a tvoří se od začátku těhotenství ve žlutém tělísku (corpus luteum). Koncem prvního trimestru přebírá placenta tvorbu progesteronu od žlutého tělíska. Produkce progesteronu je závislá na přísunu cholesterolu matky. Hladina progesteronu během těhotenství stoupá. Nejdůležitější úlohou progesteronu je udržovat sliznici endometria matky v průběhu gravidity adekvátně změněnou. Také zabraňuje nástupu předčasného porodu snížením kontraktility a dráždivosti myometria. (4; 11; 14)

Kromě progesteronu produkuje placenta rostoucí množství estrogenů, převážně estriolu. Placentární estrogeny jsou skupinou čtyř různých steroidních hormonů: estron (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3) a estetrol (E4). Estrogeny stimulují růst dělohy a vývoj mléčných žláz. Během prvních týdnů těhotenství jsou estrogeny produkovány žlutým tělískem, od 3. měsíce gravidity provádí syntézu těchto steroidů placenta. (7; 11; 14)

Krevní hladiny všech estrogenů se během těhotenství zvyšují v mateřské plazmě, ale největšího vzestupu koncentrace doznává estriol. 90 % celkové produkce estriolu pochází z kůry nadledvin plodu. Substrátem pro jeho tvorbu je dehydroepiandrosteron (DHEA).



Volný estriol uvolňovaný do krevního oběhu matky se tvoří působením sulfatázy placenty. Estriol je nejhojnější estrogen v moči. Jeho hlavní funkcí je podle všeho zvýšení uteroplacentárního průtoku krve. (11; 14)

Estradiol je v těhotenství nejhojnějším estrogenem, který podporuje implantaci embryí, stimuluje růst a diferenciaci endometria. Další funkcí estradiolu je také stimulace proliferace mléčného epitelu. (11)

Estetrol je jedinečný steroid v lidském těhotenství, který je produkován výhradně fetálními játry. Je detekovatelný již devátý týden těhotenství. Biosyntéza estrogenů je regulována různými mechanismy, včetně dostupnosti substrátu a exprese nebo aktivity enzymů zapojených do jejich syntézy. (11)

Trofoblast produkuje také lidský choriový gonadotropin (hCG). Lidský choriogonadotropin je jedním z nejdůležitějších placentárních hormonů. Tento hormon vylučuje matka močí a v raných fázích těhotenství se jeho přítomnost používá jako indikátor těhotenství. Od 8. dne po oplodnění je hCG detekovatelný v mateřském séru a jeho hladina vrcholí v 10. týdnu těhotenství, poté pomalu klesá až do konce těhotenství. Detekovatelný je i 7 až 14 dní po porodu. (3; 7; 11)

HCG patří do skupiny hormonů glykoproteinů a skládá se ze dvou řetězců aminových kyselin ( $\alpha$  a  $\beta$ ). Jeho chemická struktura je podobná luteinizačnímu hormonu (LH) a folikulostimulačnímu hormonu (FSH). HCG také podporuje in vitro diferenciaci lidských cytotrofoblastů do syncytiotrofoblastů aktivací receptoru LH – HCG. (11)

Choriový gonadotropin také zajišťuje, že žluté tělísko nezaniká, a naopak se zvětšuje a stupňuje se tvorba progesteronu a estrogenů. HCG indukuje relaxační účinek v lidské myometrické tkáni, což naznačuje přímý přínos tohoto hormonu pro udržení děložního klidu během těhotenství. HCG produkováný cytotrofoblasty je důležitý pro imunotoleranci, protože potlačuje mateřský imunologický systém a přitahuje T regulační lymfocyty (Treg), což vede ke zvýšenému počtu Treg na rozhraní plodu a matky. (4; 11; 14)

Dalším hormonem produkováným placentou je humánní placentární laktogen. Lidský placentární laktogen (hPL), známý jako lidský chorionický somatomammotropin, je polypeptidový hormon kódovaný shlukem pěti genů lokalizovaných na chromozomu 17. Tento hormon je převážně tvořen syncytiotrofoblastem. Od druhého týdne těhotenství je v placentě detekován. Třetí až šestý týden se uvolňuje hlavně do mateřského oběhu, ačkoli

je také přítomen v oběhu plodu. Až do konce těhotenství se jeho hladina výrazně zvyšuje a mizí po porodu placenty. (11)

Hlavními funkcemi hPL je regulace mateřského metabolismu lipidů a sacharidů, což je důležité pro energetickou rovnováhu mezi matkou a plodem. Z tukových rezerv matky získává volné mastné kyseliny. Ty mohou být použity jako zdroj energie produkcí ketolátek, které fungují jako palivo pro plod. Plod může využít jako zdroj energie i mateřskou krevní glukózu. Tím činí matku poněkud diabetogenní. Podporuje také vývoj prsou pro produkci mléka, protože má laktogenní a růst podporující vlastnosti. (7; 11)

## 2 ONEMOCNĚNÍ CHORIOVÝCH KLKŮ

### 2.1 Gestační trofoblastická nemoc

Gestační trofoblastická nemoc (GTD) definuje spektrum proliferativních poruch trofoblastického epitelu placenty a vždy se vyskytuje v souvislosti s těhotenstvím. Po fyziologické implantaci se trofoblast velmi rychle ponoří do děložní sliznice, čímž se vytvoří placenta. Tento růst je řízen tělem a buňky cytotrofoblastu a syncytiotrofoblastu začnou pronikat nejen do děložní sliznice, ale i do cév, díky kterým se mohou šířit i do plic a dalších orgánů. Tato trofoblastická invaze je fyziologický stav během každého těhotenství a spontánně ustupuje během několika dnů po ukončení těhotenství (porod, potrat). Během každého těhotenství můžeme v krvi detekovat těhotenský hormon hCG (lidský choriový gonadotropin). Trofoblast regreduje během několika dnů po ukončení těhotenství (porodem či potratem). Za hranici normy pro spontánní ústup hCG svědčícím pro regresi trofoblastu se považujeme 30 dní. Jestliže se trofoblast vymyká normálnímu růstu a jeho kontrolním mechanismům, můžeme zpozorovat přetrvávající a postupně se zvyšující hladinu hCG, která nám ukazuje první patologické příznaky. (15; 16)

Gestační trofoblastické onemocnění prezentuje spektrum lézí do benigních po maligní formy. Benigní forma GTD se dělí na kompletní hydatidózní molu a parciální hydatidózní molu. Zhoubná forma, tzv Gestační trofoblastická neoplazie zahrnuje invazivní moly, gestační choriokarcinom, placentární trofoblastické tumory a epitelooidní trofoblastické tumory. (17)

Výskyt gestační trofoblastické choroby se liší podle geografického rozložení. Nejvyšší hlášená nemocnost byla 1/125 živě narozených dětí na Tchaj-wanu. Naopak, nízká incidence byla zaznamenána v Japonsku a jihovýchodní Asii (2/1000 těhotenství), ve Spojených státech (1/1500) a v Evropě (1/1000). (15)

#### 2.1.1 Hydatidózní mola

Hydatidózní moly (HM) jsou typicky diagnostikovány během prvního trimestru. Nejčastějším příznakem je abnormální krvácení. Mezi další klasické příznaky a symptomy patří zvětšení dělohy, chybějící srdeční ozvy plodu, cystické zvětšení vaječníků, těhotenstvím vyvolaná hypertenze v prvním trimestru a abnormálně vysoká hladina hCG. (18)

Parciální a kompletní hydatidózní moly jsou odlišná onemocnění. V obou případech se placentární klky stávají edematózními a vytvářejí malé hroznovité (hydatidózní) struktury v důsledku poruchy gametogeneze nebo oplození. Přes cytogenetické, patologické a klinické rozdíly je léčba pacientů s kompletními a parciálními moly podobná. (18)

U kompletní moly je rozsah hydropických klků a trofoblastické proliferace obecně vyšší, než rozsah pozorovaný u parciální moly nebo hydropických potratů. Cytologické atypie a časté mitózy jsou často pozorovány v trofoblastu kompletních mol. Hladiny hCG v séru jsou obvykle vyšší u pacientů s kompletní molou než u parciální moly. (18)

**Mola hydatidosa partialis** (MHP – parciální hydatidózní mola) má obvykle kompletní trizomii odvozenou ze dvou otcovských a jedné mateřské haploidní sady chromozomů. Většina má karyotyp 69 XXX nebo 69 XXY odvozený z haploidního vajíčka buď s reduplikací otcovské haploidní sady z jediné spermie, nebo méně často z dispermiického oplodnění. Trizomie s karyotypem XYY je pozorována zřídka. (16; 18)

Parciální moly obvykle vykazují dvě populace klků (velké hydropické klky a malé fibrotické klky) s nepravidelnými vroubkovanými obrysy, trofoblastickými inkluzemi ve stromatu a méně trofoblastickou hyperplazií než u kompletních mol. (19)

Fetální krevní cévy a jaderné červené krvinky jsou často přítomny, ale většina parciálních mol je avaskulární. Malá část, asi 20 %, může vykazovat abnormální krevní cévy. Tyto abnormální cévy jsou považovány za relativně specifické pro parciální moly. Obvykle jsou prázdné, což naznačuje smrt plodu. (17; 18)

Pomocnou technikou v diagnostice parciálních mol je imunocytochemické vyšetření exprese antigenu p57. Dokáže ve většině případů odlišit kompletní hydatidózní molu od parciální hydatidózní moly. Tkáň parciální moly prezentuje obvykle silnou jadernou expresi v cytotrofoblastu, intermediárním trofoblastu a deciduální ploténce. Takto však nelze odlišit parciální hydatidózní moly od hydropických spontánních potratů. (17; 18)

**Mola hydatidosa completa** (MHC – úplná hydatidózní mola) vzniká patologickým spojením vajíčka a spermie, kde všechny chromozomy pochází jen z otcovského genomu. To znamená, že dojde k oplodnění prázdného vajíčka, které nemá žádné chromozomy dvěma spermii (23X + 23X nebo 23X + 23Y). Karyotyp 46, XX je nejběžnější. Výbava, jenž obsahuje pouze otcovské chromozomy neumožňuje vývoj embrya a placenta se nevyvíjí. (16; 18)

Mikroskopicky jsou kompletní moly charakterizovány zvětšenými hydropickými choriovými klky s pozoruhodnou obvodovou trofoblastickou hyperplazií, tvorbou prázdných prostor, tzv. cisteren v některých klcích, trofoblastickými inkluzemi a cytologickými atypiiemi. Rovněž byla popsána raná forma kompletních mol vykazující méně rozvinuté, ale charakteristické rysy. Imunohistochemicky je negativní exprese antigenu p57. (19)

### 2.1.2 Gestační trofoblastická neoplazie

Gestační trofoblastická neoplazie (GTN) se obvykle vyskytuje po molárním (postmolárním) těhotenství. GTN však může následovat po jakémkoli typu předchozího těhotenství, včetně nonmolárního potratu, mimoděložního těhotenství a těhotenství v termínu. (17; 18)

**Invazivní mola** popisuje stav, kdy kompletní nebo parciální hydatidózní mola napadne myometrium. Tento typ moly lze diagnostikovat pouze po hysterektomii. Histologicky jsou postmolární a nemolární choriokarcinomy charakterizovány invazí do myometria. Na rozdíl od invazivní hydatidózní moly neobsahují choriové klky, abnormální syncytiotrofoblast a cytotrofoblast. (16; 17)

**Gestační trofoblastické nádory** představují široké spektrum novotvarů, které mají původ především v děloze a vzácně i na jiných místech v ženském pohlavním systému a na vzdálených místech, které mohou být například plíce. (17; 18)

Choriokarcinom je nejčastější maligní gestační trofoblastický novotvar, jenž zahrnuje intermediární trofoblast, cytotrofoblast a syncytiotrofoblast bez choriových klků. Cytologické zvláštnosti jsou běžné a většina případů má vysoký mitotický počet. Charakteristickým klinickým nálezem je vaginální krvácení a výrazné zvýšení sérového hCG. (18)

Trofoblastický tumor v místě placenty je histologicky charakterizován nepřítomností klků, proliferací intermediárních trofoblastových buněk, bez buněk syncytiotrofoblastů a nízkým počtem mitotických buněk. Tyto nádory vylučují relativně nižší hladiny hCG, protože syncytiotrofoblastové buňky chybí. Ačkoli se buňky barví pozitivně na lidský placentární laktogen, přítomnost tohoto hormonu v séru není spolehlivým nádorovým markerem. (18)

Epiteloidní trofoblastické tumory jsou velmi vzácné a nejčastěji histologicky diagnostikované kyretáží nebo cervikální biopsií. Mikroskopicky tento nádor obsahuje intermediární trofoblastické buňky s častou eozinofilní až jasnou cytoplazmou. (18)

### 3 PUPEČNÍK

Pupečník představuje spojující provazec, který propojuje plod s matkou. Pupeční šňůra je měkká, klikatá šňůra s hladkým vnějším obalem modravě šedé barvy. Tento obal se nazývá amnion. Pupeční šňůra se rozkládá od pupku plodu do středu placenty. Její délka se pohybuje od 50 cm do 60 cm, o průměru asi 1 cm. (4; 20)

Pupečník se skládá z Whartonova rosolu, který obsahuje mukopolysacharidy, fibroblasty a makrofágy. Také je tvořen třemi cévami: dvě párové pupečnickové tepny a jedna nepárová pupeční žíla. (20)

Pupečník se na placentu nejčastěji upíná centrálně (*insertio centralis*, *paracentralis*), zřídka může být upnut i excentricky, v oblasti hrany placenty (*insertio marginalis*, *paramarginalis*). (7)

#### 3.1.1 Stavba pupečníku

Převážná část pupeční šňůry se skládá z Whartonova rosolu. Pupeční vaskulatura má však několik vrstev hladkého svalstva různých kompozic a tloušťek. Stěny pupečních cév se skládají převážně ze tří vrstev: *tunica externa*, *tunica media* a *tunica interna*. (20)

##### **Tunica externa**

*Tunica externa* je také označovaná jako *tunica adventitia*. Je to vnější vrstva pupečních cév, která se skládá z vláknité a elastické pojivové tkáně s různým množstvím kolagenu a elastických vláken. Pojivová tkáň této vrstvy je poměrně hustá v blízkosti *tunica media*. *Tunica externa* pupečních tepen má hustší pojivovou tkáň ve srovnání s pupeční žílou. (20)

##### **Tunica media**

Tato část je mezivrstva ve stěně pupečních cév. Představuje svalovou většinu cév a skládá se hlavně z hladkého svalstva. Zodpovídá za změnu průměru a poskytuje konstrukční podporu pro pupeční cévy. Přispívá tak především k regulaci průtoku krve a krevního tlaku. Obvykle představuje nejsilnější vrstvu uvnitř cévní stěny. Je mnohem silnější v pupečních tepnách ve srovnání s pupeční žílou. Kromě toho *tunica media* pupečních tepen obsahuje vnitřní a vnější elastické membrány, kterých je ve stěně pupeční žíly málo nebo úplně chybí. (20)

## **Tunica interna**

Také nazývaná jako tunica intima, je nejvnitřnější vrstva pupeční vaskulatury. Skládá se z jednoduchého dlaždicového epitelu, který se nachází na membráně z pojivové tkáně bohaté na elastická vlákna. Tyto vrstvy dohromady tvoří endotel pupečních cév. Tunica interna pupeční žíly obsahuje ventily, které udávají směr průtoku krve v jednom směru a zabraňují jeho proudění v opačném směru. Tyto ventily chybí ve stěně pupečních tepen. (20)

### **3.1.2 Funkce pupeční šňůry**

Umbilikální (pupečnicková) vena slouží k přenosu okysličené a živinami obohacené krve, z placenty do těla plodu. Pupeční žíla se obvykle nachází v poloze 12 hodin. Když je otočená k pupku plodu je rozpoznatelná podle tenčí stěny a většího lumenu ve srovnání s tepnami. Krev protékající umbilikální žilou vstupuje do plodu pupečním prstencem a prochází ductus venosus před vstupem do dolní duté žíly. (1; 7; 21)

Obě pupečnickové tepny přenášejí odkysličenou fetální krev, obsahující odpadní produkty z vnitřních iliakálních tepen zpět do placenty. K výměně těchto látek dochází v intervenilózních prostorech placenty mezi zásobami krve matky a plodu. Mezi pupečními tepnami mohou vznikat příčné mezitepenné spojky, které se nazývají Hyrtllova anastomóza. Primární funkcí Hartlovy anastomózy je vyrovnat průtok krve a tlak mezi pupečními a placentárními tepnami. (20; 21)

Whartonův rosol, obklopující pupeční cévy poskytuje odolnost vůči stlačení a kroucení, což umožňuje pokračující průtok krve pohybem plodu. (21)

### **3.1.3 Inervace pupečníku**

Pupeční šňůra postrádá vnitřní a vnější inervace ve všech fázích embryonálního vývoje. Za regulaci napětí hladkého svalstva v pupeční vaskulaturě jsou zodpovědné vazoaktivní látky, které jsou vylučované lokálně uvnitř pupeční stěny nebo přenášené cirkulací plodu. Například oxid dusný a prostacyklin hrají zásadní roli při udržování nízké vaskulární rezistence v pupeční a placentární cirkulaci. (20)



## 4 MUKOSUBSTANCE

Glykosaminoglykany, proteoglykany a glykoproteiny tvoří základní hmotu, která se zásadním způsobem účastní na stupni hydratace mezibuněčné hmoty. Hydratace má vliv na mechanickou pevnost tkání. Tato matrix zaplňuje prostor mezi buňkami pojiva a vazivem. Jejich struktura se se označuje jako amorfni (beztvará) substance, protože v optickém mikroskopu se se dále nerozlišuje. (5)

### 4.1 Glykosaminoglykany (mukopolysacharidy)

Glykosaminoglykany (GAG) jsou sestaveny z řetězců složených sacharidů obsahující aminosacharidy a kyselinu uranovou. Všechny GAG s výjimkou kyseliny hyaluronové obsahují sulfátové skupiny, které jsou vázané buď jako N-sulfát (heparin, heparansulfát) nebo jako O-estery. Většina polysacharidů této skupiny je esterifikována kyselinou sírovou, která posílí jejich kyselou povahu. Mají schopnost vázat velké množství vody, díky které zaujímají značný prostor, a tím působí jako výplně a maziva pro jiné struktury. I v nízkých koncentracích mohou vytvářet gel. Přítomnost dlouhých řetězců GAG a schopnost vytvořit gel umožňuje proteoglykanům působit jako síto, které omezuje průchod velkých makromolekul přes extracelulární matrix. Zástupci GAG jsou kyselina hyaluronová, chondroitinsulfát, keratansulfát I a II, heparin, heparansulfát a dermatansulfát. (22)

Nejdůležitějším typem mukopolysacharidů je kyselina hyaluronová v disociované formě zvaná hyaluronát. Kyselina hyaluronová vzniká působením enzymu hyaluronát-syntázy v mezibuněčném prostoru. Tento enzym se nachází v buněčné membráně mnoha buněk. Mimořádně hydrofilní látka váže značné množství vody, a tím umožňuje difuzi látek vazivem, přesun buněk, objem a vazkost vaziva. (5; 23)

V embryonálních tkáních se vyskytuje vysoký obsah kyseliny hyaluronové, která má zároveň důležitou roli v morfogenezi a hojení ran, protože umožňuje migraci buněk. Dále se vyskytuje téměř ve všech typech pojiv, v rosolovitém vazivu (pupečník), synoviální tekutině (klouby), řídkém kolagenním vazivu a v chrupavkách. (5; 22)

Stlačitelnost v chrupavce je ovlivněna vysokou koncentrací kyseliny hyaluronové a chondroitinsulfátu, který se vyskytuje v endochondrální kosti v místě její kalcifikace. Chondroitinsulfát je přítomen i uvnitř některých neuronů, kde zajišťuje endoskeletární strukturu a napomáhá udržení jejich tvaru. Také se nachází ve vazivu srdečních chlopní, cévní stěně a kůži. (5; 22)

V rohovce mezi kolagenními vlákny se nachází keratansulfát a dermatansulfát. Dermatansulfát se také nachází v kůži, šlachách, vazivu cévní stěny, srdečních chlopní a v bělimě, kde se podílí na zachování celkového tvaru oka. Keratansulfát se vyskytuje v kostech a chrupavce. Heparansulfát se nachází v granulích žírných buněk, játrech, plicích, a v kůži. (5; 22)

Mukopolysacharidy jsou štěpeny exoglykosidázami, endoglykosidázami i sulfatázami. Syntéza za pomoci specifických enzymů (glykosyltransferáz a sulfotransferáz) a odbourávání pomocí lysosomálních hydroláz probíhá zároveň. Genetickým nedostatkem těchto enzymů vznikají mukopolysacharidózy. U této skupiny onemocnění dochází pouze k částečnému odbourání kyselých mukopolysacharidů, které se potom hromadí v orgánech a jejich fragmenty jsou vylučovány močí. (22; 24)

GAG se mohou střádat v mezenchymálních tkáních, což vede ke kostním změnám. Dále se mohou hromadit buď ve vnitřní tkáni nebo v nervové tkáni. Hromadění ve vnitřní tkáni vede k organomegalii a hromadění v nervové tkáni, může vést k progresivní mentální retardaci. (24)

#### **4.1.1 Proteoglykany**

Hlavní složkou proteoglykanů jsou sulfonované glykosaminoglykany (GAG, kyselé mukopolysacharidy) a stávají se tak důležitou stavební součástí pojivové tkáně. Proteoglykany jsou syntetizovány v granulárním endoplazmatickém retikulu, vyzrávají v Golgiho aparátu a exocytózou jsou vylučovány ven z buňky. V Golgiho aparátu se připojují postranní řetězce GAG. (22; 23)

Nejlépe studovaný zástupce proteoglykanů je agrekan. Na proteinovém jádře agrekanu jsou navázané chondroitinsulfát a keratansulfát. Spojením agrekanu a hyaluronanu pomocí spojovacího proteinu vznikne komplex, který vyplňuje prostor mezi kolagenními vlákny a buňkami chrupavky. (23)

## **4.2 Glykoproteiny (mukoproteiny)**

Glykoproteiny jsou proteiny obsahující sacharidy v různých množstvích. Oligosacharidové řetězce jsou krátké nebo dlouhé (až 15 monosacharidových jednotek) větve nebo nevětvené řetězce sacharidů připojených k proteinům. Sacharidy se na proteiny připojují dvěma způsoby. První způsob nazývaný se glykosylace je enzymový a neenzymový způsob připojení sacharidů na proteiny se nazývá glykace. (25)

Glykoproteiny mohou být podle charakteru vazby mezi polypeptidovými a oligosacharidovými řetězci rozděleny do několika tříd. První třídu tvoří glykoproteiny obsahující N-glykosidovou vazbu mezi asparaginem a N-acetylglukosaminem. Druhou třídu tvoří glykoproteiny obsahující O-glykosidovou vazbu mezi řetězcem serinu nebo threoninu a monosacharidem, jako je N-acetylgalaktosamin. O-glykosidová vazba se vyskytuje v mucinech. Existují i další menší třídy glykoproteinů. (25)

#### **4.2.1 Mucinózní žlázy**

Mucinózní žlázy jsou exokrinní žlázy, které vydávají sekret merokrinním způsobem, což je nejobvyklejší způsob výdeje proteinů nebo glykoproteinů. Tento způsob zahrnuje typickou exocytózu, uvolňování obsahu ze sekrečních granul nebo váčků ohraničených membránou. Výška buněk se u merokrinní sekrece nemění. Molekuly a ionty jsou transportovány přes membránu za spotřeby energie. Na základě osmózy je následuje voda. (23)

Exokrinní žlázy se vyvíjejí z krycího epitelu, se kterým zůstávají spojeny tubulózním vývodem, který dopravuje sekreční produkt na místo užití. Epitely exokrinních žláz jsou uspořádány jako souvislý systém mnoha malých sekrečních oddílů a vývodů odvádějících sekret ze žlázy. Sekreční jednotky v exokrinních žlázách jsou podporovány vazivovou tkání. (23)

#### **4.2.2 Mucinózní buňky**

Mucinózní buňky mají cylindrický tvar a jejich jádro, které je příčně oploštělé se nachází v bazální části. Obsahují drsné endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex. Sekreční granula, jenž se nachází v apikální cytoplazmě mucinózních buněk obsahují silně glykosylované proteiny zvané muciny. Poté, co se muciny uvolní z buňky, hydratují a vytvoří vrstvu hlenu. Sekreční granula se barví eosinem velmi slabě, protože hydrofilní muciny jsou obvykle vyplavovány během rutinní přípravy histologických preparátů. Ve vyvíjejících se mucinogenních granulích však zůstává dostatek oligosacharidů, což umožňuje PAS metodou obarvit mucinózní buňky. (23)

#### **4.2.3 Muciny**

Muciny jsou velké glykoproteiny s vysokým obsahem O-vázaných oligosacharidů a přítomností repetitivních aminokyselinových sekvencí (tandemové repetice). Tyto tandemové repetice jsou bohaté na serin, threonin a prolin. Základem pro nataženou strukturu mucinů je vysoký obsah O-glykanů. Muciny mimo jiné obsahují mnoho

N-glykanových řetězců. Proteinový fragment mucinu (apomucin) tvoří 20 % a sacharidová složka mucinů obvykle tvoří více než 50 % jejich suché hmoty. (25; 26)

Muciny jsou produkovány různými sekrečními epiteliálními buňkami (včetně endoteliálních buněk) a leukocyty. Hlavními producenty mucinů jsou pohárkové buňky a slizniční buňky v povrchovém epitelu a žlázách gastrointestinálního traktu. (26)

V lidském organismu se nachází neutrální a kyselé muciny. Neutrální muciny jsou obsaženy v Brunnerových žlázách, epitelu prostaty a na povrchu epitelu žaludku. Kyselé muciny se dělí na sialomuciny a sulfomuciny, které se nachází ve slizničních žlázách bronchů. Sialomuciny obsahující sialovou kyselinu se nachází v submukózních žlázách průdušek, slinných žlázách a pohárkových buňkách. Obsahují velké množství záporně nabitých kyselých skupin. K barvení kyselých mucinů se používají kladně nabitá barviva, které jsou alcianová modř a mucikarmín. Neutrální muciny se barví PAS reakcí. (27)

Existují tři podrodiny mucinů. Membránově vázané/transmembránové muciny, které jsou například MUC1, MUC4, MUC16, sekretované (gelotvorné), což mohou být MUC2, MUC5AC, MUC6 a příkladem rozpustných (negelotvorných) mucinů jsou MUC7, MUC8, MUC9, MUC20. Stojí za zmínku, že MUC1, MUC4 a MUC16 se vyvinuly z odlišných předků a také to, že transmembránové muciny se skládají z různých podskupin na základě jejich genetického pozadí. (26)

Muciny jsou hlavní složkou jakékoli mukózní sekrece a poskytují hlenu jeho biofyzikální a chemické vlastnosti. Sekretované muciny se nacházejí v hlenu, který je přítomný v sekretech respiračního, gastrointestinálního a reprodukčního traktu. Hlen (mucus) často tvoří gel a má vysokou viskozitu. Je tvořen z 5 % mucinů a 94 % vody. Směs různých molekul, elektrolytů a zbytků buněk je také součástí hlenu. (25)

Muciny tvoří ochrannou fyzikální bariéru na epiteliálních površích a pomáhají je zvlhčovat. Muciny také hrají roli i v patologických stavech. Muciny mohou přispívat ke zvýšené buněčné pohyblivosti a schopnosti invaze, což je klíčové pro vznik nádoru. (26)

Muciny mohou maskovat určité povrchové antigeny. Této funkce využívají nádorové buňky, které tvoří nadměrné množství mucinů a tím jsou chráněny před imunitní kontrolou. Muciny také obsahují specifické, nádorové, sacharidové a peptidové epitopy (epitop je místo na antigenu rozpoznávané protilátkou). Některé z těchto epitopů mohou stimulovat imunitní odpověď proti nádorovým buňkám. (25)

**Mucin 1** je transmembránový glykoprotein a je nejsnáze rozpoznatelným členem rodiny mucinů. MUC1, nejlépe charakterizovaný transmembránový mucin, obsahuje různý počet vysoce glykosylovaných tandemových repetitivních, extracelulární domény, transmembránovou doménu a cytoplazmatický konec. Má se také za to, že MUC1 se může samovolně štěpit na dva peptidové segmenty: delší N-terminální podjednotku, který je extracelulární (MUC1-N) a kratší C-terminální podjednotku, která zahrnuje složky transmembránovou doménu a cytoplazmatický konec. (28)

Za normálních podmínek MUC1 pokrývá povrch všech epitelálních buněk a tvoří ochrannou bariéru přes povrch sliznice a chrání buňky ve zdravých tkáních před extrémními podmínkami prostředí. V nádorových buňkách má intracelulární signalizační funkci a hraje významnou roli při vzniku nádorů. Podílí se také na lubrikaci, hydrataci buněčného povrchu a ochraně před degradačními enzymy. V epitelu ústní sliznice MUC1 spolu s MUC5B a MUC7 vykazuje antimikrobiální účinky. (28)

MUC1 je běžně nadměrně exprimován u různých epitelálních adenokarcinomů, jako je karcinom plic, jater, tlustého střeva, prsu, slinivky a vaječnicků. Jde o dobře známý a životně důležitý onkogen, který reguluje různé znaky karcinomů (buněčný růst, proliferaci, metastázy, apoptózu, vývojové procesy) tím, že se účastní různých signálních drah. (28)

MUC1 může hrát buď prozánětlivou, nebo protizánětlivou roli u různých karcinomů vyvolaných infekcí. Například u roztroušené sklerózy hraje MUC1 protizánětlivou roli a inhibuje odpověď dendritických buněk, která je nezbytná pro vznik zánětu. Avšak ve své prozánětlivé roli může změněná forma MUC1 vytvořit specifické vzájemné působení s dendritickými buňkami a makrofágy, a tím podporuje únik karcinomu z imunitního systému. Změněná glykosylace MUC1 také podporuje chronické zánětlivé stavy, které vedou k maligní transformaci a vzniku karcinomů. (28)

MUC1 může vést ke vzniku lékové rezistence během léčby zhoubných nádorů, protože je běžně nadměrně exprimován u různých epitelálních karcinomů. Léková rezistence zprostředkovaná MUC1 nastává z velké části prostřednictvím regulace glykolytického metabolismu s určitou regulací dalších specifických drah. Zvýšení příjmu glukózy může způsobit, že nádorové tkáně budou méně citlivé na zvýšené koncentrace léčiva. (28)

MUC1 se často používá jako terapeutický marker kvůli jeho nadměrné expresi v různých epiteliálních buňkách. Jeho extracelulární doména podobná receptoru se může uvolnit do vnějšího prostředí a působit jako návnada pro slizniční patogeny, které snímají vnější prostředí. MUC1 je také dobře zavedený a užitečný biomarker pro časnou detekci karcinomu žaludku. U karcinomu pankreatu může být MUC1 detekován v různých stadiích a může indikovat zahájení a progresi s dobrou diagnostickou přesností. (28)

**Mucin 2** je klíčový protein pro tvorbu hlenu, jenž chrání epiteliální povrchy. MUC2 je hlavní sekreční glykoprotein hojně se vyskytující ve střevním a dýchacím traktu. Jeho exprese je společným rysem všech mucinózních karcinomů odvozených z různých orgánů, včetně prsu, tlustého střeva a prostaty, kde může působit jako potenciální prognostický indikátor. (29)

V tenkém a tlustém střevě se nachází hlen, který je vylučovaný pohárovými buňkami se skládá převážně ze sítě viskózního, propustného, gelotvorného mucinu MUC2, který poskytuje obranu v první linii proti endogenním a exogenním dráždivým látkám, umožňuje mikrobiálnímu uchycení a přepravu živin. V gastrointestinální sliznici jsou dvě vrstvy hlenového gelu, vnitřní pevně přilnaví a vnější volněji přilnaví vrstva. Obě se skládají převážně z glykoproteinu MUC2. Vnitřní vrstva hlenu je nepropustná vůči bakteriím a udržuje bakterie ve vzdálenosti od epiteliální buňky. Dvouvrstvá organizace hlenu je pravděpodobně nápomocná pro vyvážený a symbiotický vztah mezi hostitelem a bakteriemi. Lidská dospělá střevní mikrobiota se nachází ve vnější volně přilnaví vrstvě hlenu. (30; 31)

**Mucin 4** je transmembránový glykoprotein exprimován epitelem tubulárních orgánů, jako jsou plíce, tlusté střevo, děložní čípek, rohovka, prostata, střední ucho a Eustachova trubice. Funkční úloha MUC4 však byla nejlépe studována u malignit orgánů, které normálně postrádají expresi MUC4. (32)

MUC4 je první mucin, který se nachází v plicích, již v pülce sedmého týdne těhotenství v embryonálních dýchacích cestách. Exprese MUC4 je zachována až do dospělosti. MUC4 inhibuje proliferaci buněk karcinomu plic tím, že reguluje proteiny buněčného cyklu, jako jsou Cyclin A a Cyclin D1. MUC4 tak významně inhibuje metastatický potenciál buněk karcinomu plic. (32)

U epiteliálních malignit je změněná exprese mucinu významně spojena s vývojem nádoru. Ve tkáních postrádajících expresi MUC4 (vaječník a prsa) je exprese MUC4 pozorována po nástupu karcinomu a poskytuje špatnou prognózu. Vysoká hladina exprese MUC4 se také vyskytuje v nádorech slinivky břišní a diferencovaných liniích nádorových buněk pankreatu. Jeho hladina v normálním pankreatu je nezjistitelná. (32; 33)

**Mucin 6** je gelotvorný glykoprotein, který je jako jediný mucin produkován buňkami duodenálních Brünnerových žláz. Také se nachází v pankreatu, endocervixu a žlučníku. Primární funkcí MUC6 je ochrana zranitelných epiteliálních povrchů před škodlivými účinky neustálého vystavení endogenních nebo proteolytických látek, jako jsou proteázy (žaludek, semenné vajíčky, děložní sliznice, endocervix a slinivka břišní), kyseliny (žaludek a dvanáctník) a žluč (žlučník a žlučovody). (34; 35)

Funkce MUC6 je spolu s MUC5AC hlavní složkou ochranné vrstvy žaludečního povrchu. Exprese MUC6 je nižší u střevních karcinomů žaludku než u adenomů nebo normální sliznice, což naznačuje, že snížená exprese MUC6 může přispět k maligní transformaci žaludečních epiteliálních buněk. MUC6 se nachází v adenokarcinomech děložního čípku. Také je nadměrně exprimován při benigním onemocnění prsu a v karcinomu prsu. (35)

# PRAKTICKÁ ČÁST

## 5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

### 5.1 Hlavní cíl

Cílem bakalářské práce je biochemická a biologická charakteristika mukosubstancí v choriových klících placenty z deseti parafinových bloků archivního materiálu Šiklova ústavu patologie.

Cílem bakalářské práce je využití histochemických a imunohistochemických metod ke sledování přítomnosti mukosubstancí v choriových klících placenty a následném zpřesnění histologického popisu klků v rámci obecné patologie.



## **6 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY**

### **6.1 Výzkumné problémy**

Přítomnost hlenových substancí v choriových klcích placenty byla histochemicky potvrzena před 28 lety. Blíže však programově studována nebyla.

### **6.2 Výzkumné otázky**

Nachází se v sledovaném souboru vzorků glykoproteiny MUC-1, MUC-2, MUC-4 nebo MUC-6?

Obsahují vybrané vzorky placent kyselé mukopolysacharidy?

## 7 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Z archivního materiálu Šiklova ústavu patologie ve FN Plzeň byly vybrány parafinové bloky, které zahrnovaly 7 parafinových bločků placent časného hydropického abortu a 2 bločky placent s prokázanou parciální molou. Z fyziologické placenty, která byla poskytnuta zafixovaná ve formolu byl vytvořen také parafinový bloček.

*Vzorek č. 16706 – Fyziologická placenta*

*Vzorek č. 9149 – Placenta časného hydropického abortu*

*Vzorek č. 9485 – Placenta časného hydropického abortu*

*Vzorek č. 9488/A – Placenta časného hydropického abortu*

*Vzorek č. 9488/B – Placenta časného hydropického abortu*

*Vzorek č. 9488/C – Placenta časného hydropického abortu*

*Vzorek č. 5585/R2 – Placenta časného hydropického abortu*

*Vzorek č. 5585/R7 – Placenta časného hydropického abortu*

*Vzorek č. 189/R2 – Placenta s prokázanou parciální molou*

*Vzorek č. 189/R12 – Placenta s prokázanou parciální molou*

## 8 METODIKA PRÁCE

S využitím histochemických a imunohistochemických metod se dá sledovat přítomnost mukosubstancí v choriových klcích placenty.

### 8.1 Příkrajování materiálu

Z Šiklova ústavu patologie byla poskytnuta celá fyziologická placenta zafixovaná ve formolu. Fixace zabránila autolýze (rozkladu tkáně) a zachovala strukturu buněk a tkání pro histologické zpracování.

Proces příkrajování umožnil z tkáně připravit vzorky, které měly správnou velikost a prezentovaly celkovou tkáň. Tento proces probíhal na příkrajovacím stanovišti. Z celé fyziologické placenty bylo odebráno 11 vzorků, jež obsahovaly i fyziologický pupečník. Vzorky byly následně vloženy do biotických kazet, na kterých bylo uvedeno číslo vzorku.

*Obrázek 3: Příkrajovací pracoviště*



*Zdroj: vlastní*

### 8.2 Odvodnění a prosycení tkáňového vzorku

Tkáňové vzorky v histologické kazetě byly naskládány do kovového koše, který byl zavěšen do tkáňového automatu (autotechnikonu) nad zásobníky tekutin. Autotechnikon umožnil odvodnění, projasnění a prosycení vzorků parafínem.

V autotechnikonu nejprve docházelo k dofixování dvěma lázněmi 4% pufovaného formolu. Následovalo odvodnění tkáně vzestupnou řadou čtyř lázní ethanolů. Koncentrace postupně stoupala (70%, 80%, 96%, 96%) proto, aby nedošlo ke smrštění tkáně, což by

v opačném případě nastalo. Jednou lázní acetonu byl z tkáně odstraněn přebytečný ethanol a voda. Tkáň byla následně dvěma lázněmi prosycena xylenem.

Závěrečnou fází v autotechnikonu bylo prosycení tkáně parafinem, který byl rozehrátý při teplotě 56 °C až 58 °C. Parafin vyplnil všechny mikroskopické štěrby v tkáni. Výsledkem byly tkáňové vzorky, které byly připraveny k vlastnímu zalití do parafinu.

### **8.3 Zalití do parafinu**

Před zalitím do parafinu byly z autotechnikonu vyjmuty histologické kazetky, které obsahovaly 11 vzorků tkáně z fyziologické placenty. Důležité bylo, aby se vyšetřovaná tkáň nepřilepila ke spodní části kazetky a nezatuhla, proto až do zalití byla nahřívána na vyhřívané desce.

Zalévání bločků bylo provedeno na parafínové zalévací lince, která vysokou teplotou udržovala parafin v tekutém stavu. Nejprve byla otevřena histologická kazetka, z které bylo možno přemístit vzorek tkáně. Do kovové zalévací formičky byl nalit parafin, který formičku jen z části naplnil. Pomocí vyhřáté pinzety byl rychle přenesen vzorek tkáně do parafinu na dno kovové formičky. Na vyhřáté části parafínové linky byl vzorek dále orientován, což bylo důležité pro následnou mikroskopickou analýzu. Na studené části zalévacího přístroje tkáň přituhnula ke spodní části kovové formičky.

Na zalévací formičku byla nasazena spodní část kazetky, která obsahovala popisnou část, kde bylo uvedeno číslo vzorku. Tekutý parafin následně doplnil histologickou kazetku až po okraj. Poté se formička přenesla na chladicí část zalévací linky, kde se tuhnutí parafinu velmi urychlilo. Vychlazený bloček byl vyjmut z kovové formičky a byl očištěn od přebytečného parafinu. Výsledkem byl parafínový bloček, z kterého byly následně připraveny parafínové řezy

### **8.4 Krájení parafínových bločků**

Před krájením bylo důležité, aby parafínové bločky byly vychlazené, a proto byly vloženy na chladicí desku, která bločky udržovala studené během celého procesu krájení. Parafínové bloky byly krájeny na sáňkovém mikrotomu. Pro histochemické barvení byly krájeny řezy o tloušťce 2-4  $\mu\text{m}$  a pro imunohistochemické 1  $\mu\text{m}$  tenké.

Prvním krokem krájení bylo připevnění vychlazeného parafínového bloku do svorek na sáňkovém mikrotomu. Pod svorkami, které uchycovaly blok se nacházely neapolské

svorky, jejichž úkolem bylo vyrovnávání polohy bločku. Mikrometrickým šroubem bylo možno bloček posouvat svisle. Požadovaná tloušťka řezu byla nastavena na mikrometrické stupnici. Parafínový blok byl krájen mikrotomovým nožem. Po každém řezu byla pomocí šroubu zvednuta svorka s parafínovým bločkem ve svislém směru o požadovaný počet mikrometrů.

Z každých vybraných parafínových bloků, které obsahovaly placenty časného hydropického abortu a placenty s prokázanou parciální molou byly zhotoveny 4 řezy pro histochemické barvení a 4 řezy pro imunohistochemické barvení. Z každého z 11 bloků fyziologické placenty byl vytvořen jeden řez pro histochemické barvení Hematoxilin – Eosin. Na základě barvení a kvality řezu, jenž se odvíjela od kvality přikrojené vyšetřované tkáně byl vybrán vzorek, ze kterého se následně prováděly další diagnostické metody.

## **8.5 Napínání parafínových řezů**

Ukrojené parafínové řezy byly přeneseny na studenou hladinu destilované vody uvnitř Petriho misky. Na studené vodě byly řezy vypínány a rovnány. Následně pomocí podložních sklíček byly řezy přeneseny na hladinu teplé destilované vody ve vodní lázni, která byla vyhřátá na teplotu 47–49°C. Účinkem teplé vody došlo k finálnímu napnutí řezů.

Pro histochemické barvení byly použity podložní sklíčka od značky UniMark a pro imunohistochemii speciální skla (TOMO), která byla pokryta adhezivní vrstvou. Pod štítkem na každém speciálním sklíčku byla natažena pozitivní tkáňová kontrola, která byla odlišná pro každou protilátku.

Na podložní sklíčka, která byla popsána histochemickou nebo imunohistochemickou metodou a číslem tkáňového vzorku byly nataženy parafínové řezy pomocí preparačních jehel („pátradel“) jednoduchým vytažením z vody.

## **8.6 Odparafínování tkáňových řezů**

Parafínové řezy bylo nutno před každým barvením odparafínovat, protože parafin není rozpustný ve vodě a barviva byla použita jako vodný roztok.

Prvním krokem bylo několik lázní xylenu. Následovala sestupná řada alkoholů (96%, 96%, 80%, 70%) a voda. Po tomto procesu byly řezy připraveny k barvení.

## 8.7 Barvení

### 8.7.1 Histochemické barvení

#### Hematoxylin-Eosin

*„Barvení hematoxylin-eosinem (H&E) je základní přehledné barvení užívané v histologii, které umožňuje získání všeobecných informací o preparátu.“ (27, str. 43)*

Prvním krokem barvení bylo odparafinování řezů do 70% alkoholu. Poté byly odparafinované řezy ponořeny do roztoku Gillova hematoxylinu na 7 minut. Následně byly řezy diferenciovány v kyselém alkoholu. Diferenciované řezy byly prány pod tekoucí vodu, aby jádra zmodrala. Poté byly řezy ponořeny do roztoku Eosinu, kde byly dobarvovány 1 minutu. Po oplachu v destilované vodě byly řezy připraveny na proces odvodnění, projasnění a montování. Celý postup barvení byl proveden v barvicím automatu od společnosti bamed s.r.o. Podrobnější popis přípravy roztoků se nachází v příloze 1.

#### Toluidinová modř

Toluidinová modř je barvivo, které lze použít k průkazu metachromasie. Metachromatické barvení je typické pro mukosubstance, zejména sulfonované mukopolysacharidy. Prvním krokem přípravy přibližně 100 ml roztoku toluidinové modři o koncentraci 0,1 % bylo navážení 0,1 g toluidinové modři. Navážka byla následně rozpuštěna ve 100 ml destilované vody a pomocí filtračního papíru přefiltrována.

Postup metachromatického barvení začal ponořením odparafinovaných tkáňových řezů placenty do destilované vody po dobu 1 minuty. Poté byl na sklíčko nakapán roztok toluidinové modři na 1–2 minuty. Následoval opět oplach v destilované vodě, který trval 1 minutu. Posledními kroky bylo odvodnění, projasnění a montování. Podrobnější popis přípravy roztoků se nachází v příloze 2.

#### Alciánová modř

Účelem tohoto barvení je průkaz kyselých mukopolysacharidů v parafinových řezech. Prvním krokem v tomto barvení bylo odparafinování řezů do deionizované vody. Poté byl roztok alciánové modři, která měla pH 2,5 nakapán na sklíčko po dobu 45 minut. Následoval oplach v deionizované vodě a dobarvení jader jádrovou červení, která byla na sklíčku ponechána 2 minuty. Dalším krokem byl oplach v deionizované vodě, díky kterému byly řezy připraveny na odvodnění, projasnění a montování. Podrobnější popis přípravy roztoků se nachází v příloze 3.

## **PAS reakce + alciánová modř**

Účelem tohoto barvení je průkaz mukopolysacharidů v parafinových řezech. Postup tohoto barvení začal odparafinováním řezů do deionizované vody. Poté byl roztok alciánové modři nakapán na řez po dobu 30 minut. V dalším kroku bylo sklíčko opláchnuto v deionizované vodě. Řez byl dobarven PAS metodou a to tak, že se 0,5% roztok kyseliny jodisté na 5 minut nakapal na sklíčko. Následoval oplach v deionizované vodě a Schiffovo činidlo. Po 5 minutách se sklíčko dalo prát pod tekoucí vodu na 15 minut. Poté byl řez dobarven Gillovým hematoxylinem. Po 7 minutách se řez diferencoval v kyselém alkoholu. Sklíčko se vložilo prát pod tekoucí vodu. Posledními kroky bylo odvodnění, projasnění a montování. Podrobnější popis přípravy roztoků se nachází v příloze 4.

### **8.7.2 Imunohistochemické barvení**

*„Imunohistochemické barvení slouží k identifikaci tkáňových antigenů pomocí specifické vazby antigenu s protilátkou s následnou vizualizací komplexu antigen–protilátka.“*  
(27, str. 99)

Imunohistochemické barvení bylo provedeno na přístroji BenchMark Ultra–Ventana, který řezy sám odparafinoval. Principem imunohistochemického barvení na přístroji BenchMark Ultra – Ventana je využití specifických primárních protilátek, které se naváží na lokalizované antigeny. Speciální sklíčka TOMO, na kterých byly nataženy řezy tkáně a pozitivní tkáňové kontroly se vložily do termostatu, kde se při teplotě 60 °C nechala usušit. Po usušení byly řezy připraveny pro imunohistochemické barvení a dobarvování jader v barvicím přístroji.

Na vyšetření mucinů v tkáňových řezech placenty byli použity monoklonální protilátky MUC–1, MUC–2, MUC–4 a MUC–6. Komplex antigen – protilátka byl vizualizován pomocí substrátu, který se skládá z peroxidu vodíku a 3,3–diaminobenzidin tetrachlorid chromogenu. Pozitivní reakce se projevila vznikem hnědě zbarvené sraženiny. Pro dobarvení jader v barvicím přístroji se použil Gillův hematoxylin. Takto obarvené tkáňové řezy byly připraveny na odvodnění a montování v montovacím přístroji.

Obrázek 4: Přístroj BenchMark Ultra – Ventana



*Zdroj: vlastní*

## 8.8 Montování obarvených řezů

Montování obarvených řezů do vodou nemísitelného montovacího media (Pertex) bylo provedeno pro histochemické metody i pro imunohistochemické metody v montovacím automatu od společnosti bamed s.r.o. Následné prohlížení a vyhodnocení zhotovených histologických preparátů bylo provedeno pod světelným mikroskopem.



## 9 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

### 9.1 Histochemické barvení

V tabulkách jsou uvedeny výsledky všech provedených histochemických barvení. Intenzita zabarvení byla hodnocena podle stupně barevnosti mukopolysacharidů uvnitř choriových klků placenty. Pozitivní část ukazuje procentuální zastoupení choriových klků pozitivních na dané barvení z celkového počtu klků. Výsledky byly posuzovány samostatně třemi hodnotícími.

#### 9.1.1 Hematoxylin – Eosin

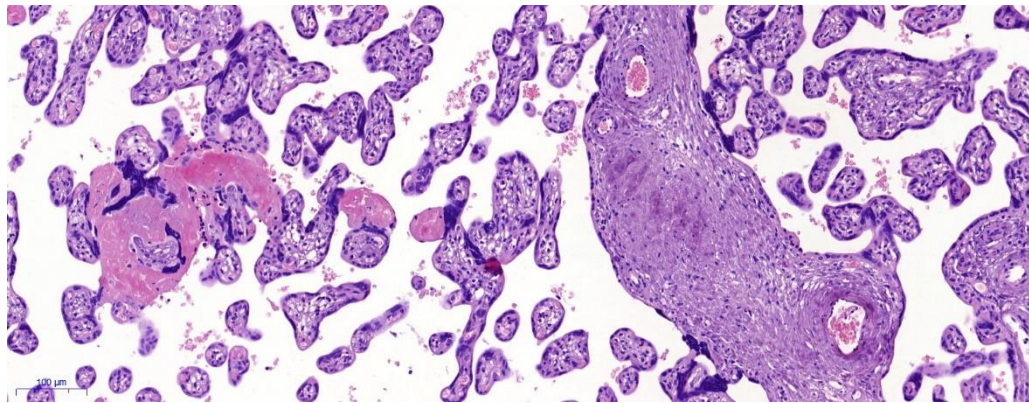
V tabulce jsou znázorněny výsledky barvení Hematoxylin – Eosin. Všechny výsledky jsou negativní, protože tato metoda neznázorňuje mukopolysacharidy.

Tabulka 1: Barvení Hematoxylin – Eosin

HEMATOXYLIN – EOSIN							
TYP MATE- RIÁLU	ČÍSLO VZORKU	HODNOTÍCÍ 1		HODNOTÍCÍ 2		HODNOTÍCÍ 3	
		INTENZITA	POZITIVNÍ ČÁST [%]	INTENZITA	POZITIVNÍ ČÁST [%]	INTENZITA	POZITIVNÍ ČÁST [%]
Fyziologická placenta	16706/R8	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
Placenta časného hydropic- kého abortu	9149	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9485	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9488/A	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9488/B	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9488/C	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	5585/R2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	5585/R7	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
Placenta s prokáza- nou parci- ální molou	189/R2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	189/R12	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0

Zdroj: vlastní

*Obrázek 5: Vzorek č. 16706/R8 – Fyziologická placenta*



*Zdroj: vlastní*

Výsledkem barvení Hematoxylin – Eosin jsou jádra modrá, kolagen růžový, hyalín růžový, fibrin červený, svalovina růžovočervená a chrupavka modrá.

### 9.1.2 Toluidinová modř

V tabulce jsou znázorněny výsledky histochemického barvení. Je zde zaznamenána intenzita zabarvení mukopolysacharidů a procentuální zastoupení pozitivních choriových klků.

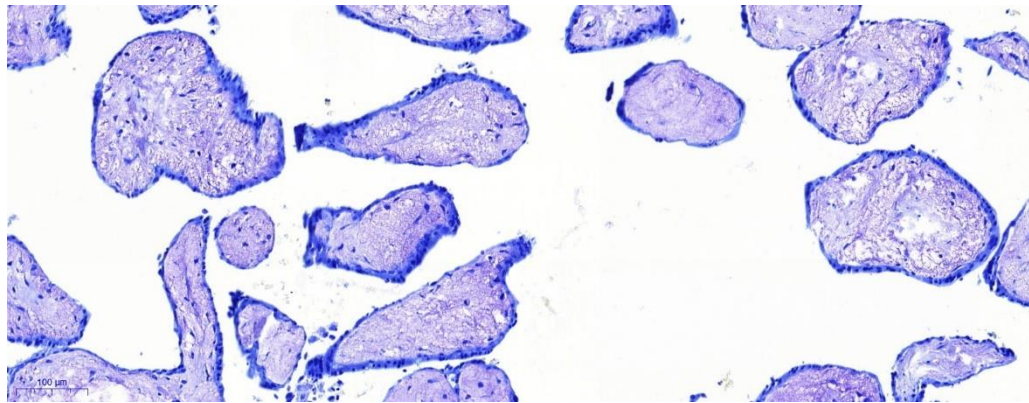
Z tabulky je patrné, že vzorek č. 9149 – placenta časného hydropického abortu vykazoval největší pozitivitu obarvených kyselých mukopolysacharidů uvnitř v choriových klků. Vzorek č. 16706/R8 – fyziologická placenta vykazoval nulovou pozitivitu.

Tabulka 2: Barvení Toluidinovou modří

TOLUIDINOVÁ MODŘ							
TYP MATERIÁLU	ČÍSLO VZORKU	HODNOTÍCÍ 1		HODNOTÍCÍ 2		HODNOTÍCÍ 3	
		INTENZITA	POZITIVNÍ ČÁST [%]	INTENZITA	POZITIVNÍ ČÁST [%]	INTENZITA	POZITIVNÍ ČÁST [%]
Fyziologická placenta	16706/R8	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
Placenta časného hydropického abortu	9149	+	80	++	70	++	70
	9485	+	10	+	15	+	30
	9488/A	+	5	+	20	++	30
	9488/B	+	1	+	10	++	5
	9488/C	Neg.	0	+	3	+	1
	5585/R2	+	10	+	5	+	3
	5585/R7	+	30	++	25	+++	15
Placenta s prokázanou parciální molou	189/R2	+	50	++	70	++	55
	189/R12	+	15	+	10	+	15

Zdroj: vlastní

*Obrázek 6: Vzorek č. 9149 – Placenta časného hydropického abortu*



*Zdroj: vlastní*

Výsledkem barvení Toluidinovou modří jsou buněčná jádra a cytoplazma ortochromaticky modrá. Různé kyselé uhlohydráty (muciny, bazické látky a pojivové tkáně) jsou metachromaticky růžové až červené nebo fialové.

### 9.1.3 Alciánová modř

V tabulce jsou znázorněny výsledky histochemického barvení. Je zde zaznamenána intenzita zabarvení mukopolysacharidů a procentuální zastoupení pozitivních choriových klků.

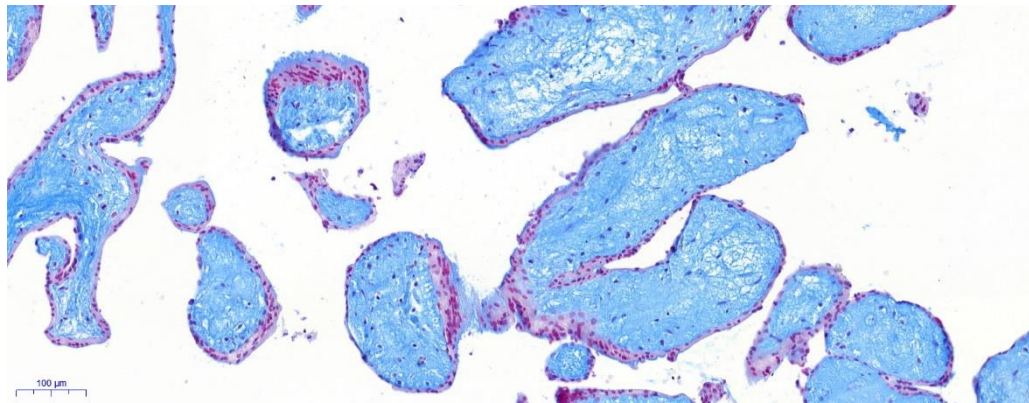
Stejně jako u předešlého barvení je z tabulky patrné, že vzorek č. 9149 – placenta časného hydropického abortu vykazoval největší pozitivitu obarvených kyselých mukopolysacharidů uvnitř v choriových klků. Vzorek č. 16706/R8 – fyziologická placenta vykazoval nulovou pozitivitu.

Tabulka 3: Barvení alciánovou modří

ALCIÁNOVÁ MODŘ							
TYP MATE- RIÁLU	ČÍSLO VZORKU	HODNOTÍCÍ 1		HODNOTÍCÍ 2		HODNOTÍCÍ 3	
		INTENZITA	POZITIVNÍ ČÁST [%]	INTENZITA	POZITIVNÍ ČÁST [%]	INTENZITA	POZITIVNÍ ČÁST [%]
Fyziologická placenta	16706/R8	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
Placenta časného hydro- pického abortu	9149	+++	100	+++	95	+++	80
	9485	+	90	++	75	++	70
	9488/A	+	70	++	65	++	60
	9488/B	+	70	++	65	++	60
	9488/C	+	50	+	60	+	50
	5585/R2	+	30	++	40	++	50
	5585/R7	++	70	++	60	++	55
Placenta s prokázanou parciální mo- lou	189/R2	+	80	++	75	+	70
	189/R12	+	30	+	45	++	40

Zdroj: vlastní

*Obrázek 7: Vzorek č. 9149 – Placenta časného hydropického abortu*



*Zdroj: vlastní*

Výsledkem barvení alciánová modř jsou jádra červená a kyselé mukopolysacharidy modře zbarvená.

#### 9.1.4 PAS reakce + alciánová modř

V tabulce jsou znázorněny výsledky histochemického barvení. Je zde zaznamenána intenzita zabarvení mukopolysacharidů a procentuální zastoupení pozitivních choriových klků.

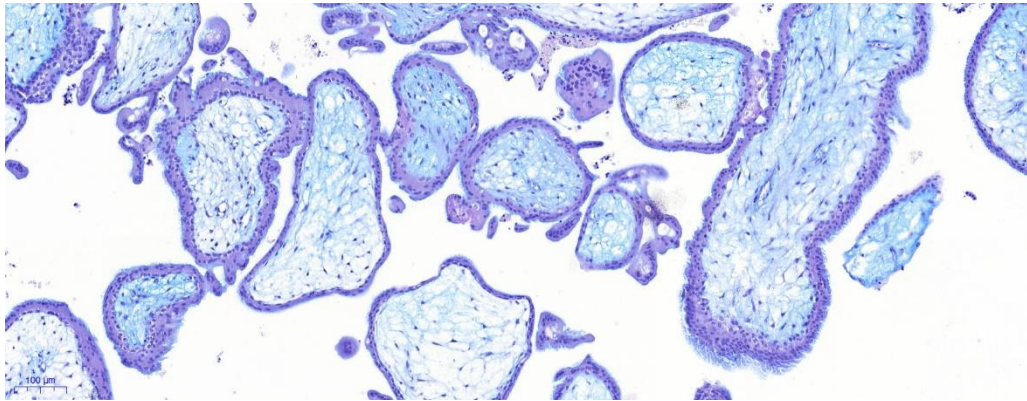
Stejně jako u předešlého barvení je z tabulky patrné, že vzorek č. 9149 – placenta časného hydropického abortu vykazoval největší pozitivitu obarvených kyselých mukopolysacharidů uvnitř v choriových klků. Vzorek č. 16706/R8 – fyziologická placenta vykazoval nulovou pozitivitu.

Tabulka 4: Barvení PAS reakce + alciánová modř

PAS REAKCE + ALCIÁNOVÁ MODŘ							
TYP MATE- RIÁLU	ČÍSLO VZORKU	HODNOTÍCÍ 1		HODNOTÍCÍ 2		HODNOTÍCÍ 3	
		INTENZITA	POZITIVNÍ ČÁST [%]	INTENZITA	POZITIVNÍ ČÁST [%]	INTENZITA	POZITIVNÍ ČÁST [%]
Fyziologická placenta	16706/R8	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
Placenta časného hydropic- kého abortu	9149	++	90	++	90	++	95
	9485	+	90	++	75	++	70
	9488/A	+	70	++	70	++	75
	9488/B	+	70	+	85	+	70
	9488/C	+	30	+	25	+	20
	5585/R2	+	40	+	60	+	60
	5585/R7	+	40	++	40	++	35
Placenta s prokáza- nou parci- ální molou	189/R2	+	80	++	60	++	80
	189/R12	+	30	+	45	+	25

Zdroj: vlastní

*Obrázek 8: Vzorek č. 9485 – Placenta časného hydropického abortu*



*Zdroj: vlastní*

Výsledkem barvení PAS+ alciánová modrá jsou kyselé mukopolysacharidy modře a ostatní polysacharidy růžovočerveně.



## 9.2 Imunohistochemické barvení

V tabulkách jsou uvedeny výsledky všech provedených imunohistochemických barvení, hodnocených pomocí mikroskopu. Míra exprese antigenu byla hodnocena podle stupně barevnosti vzniklé sraženiny uvnitř choriových klků placenty. Pozitivní část ukazuje procentuální zastoupení choriových klků pozitivních na danou protilátku z celkového počtu klků. Výsledky byly posuzovány samostatně třemi hodnotícími.

### 9.2.1 MUC-1

V tabulce jsou znázorněny výsledky imunohistochemického barvení s použitou protilátkou MUC-1. Je zde zaznamenána míra exprese antigenu MUC-1 a procentuální zastoupení pozitivních choriových klků. Žádný ze zkoumaných vzorků nevykazoval pozitivitu.

*Tabulka 5: Imunohistochemické barvení MUC-1*

MUC-1							
TYP MATE- RIÁLU	ČÍSLO VZORKU	HODNOTÍCÍ 1		HODNOTÍCÍ 2		HODNOTÍCÍ 3	
		EXPRESE	POZITIVNÍ ČÁST [%]	EXPRESE	POZITIVNÍ ČÁST [%]	EXPRESE	POZITIVNÍ ČÁST [%]
Fyziologická placenta	16706/R8	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
Placenta časného hydropic- kého abortu	9149	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9485	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9488/A	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9488/B	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9488/C	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	5585/R2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	5585/R7	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
Placenta s prokáza- nou parci- ální molou	189/R2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	189/R12	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0

*Zdroj: vlastní*

### 9.2.2 MUC–2

V tabulce jsou znázorněny výsledky imunohistochemického barvení s použitou protilátkou MUC–2. Je zde zaznamenána míra exprese antigenu MUC–2 a procentuální zastoupení pozitivních choriových klků. Žádný ze zkoumaných vzorků nevykazoval pozitivitu.

*Tabulka 6: Imunohistochemické barvení MUC–2*

MUC–2							
TYP MATE- RIÁLU	ČÍSLO VZORKU	HODNOTÍCÍ 1		HODNOTÍCÍ 2		HODNOTÍCÍ 3	
		EXPRESE	POZITIVNÍ ČÁST [%]	EXPRESE	POZITIVNÍ ČÁST [%]	EXPRESE	POZITIVNÍ ČÁST [%]
Fyziologická placenta	16706/R8	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
Placenta časného hydropic- kého abortu	9149	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9485	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9488/A	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9488/B	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9488/C	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	5585/R2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	5585/R7	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
Placenta s prokáza- nou parci- ální molou	189/R2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	189/R12	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0

*Zdroj: vlastní*

### 9.2.3 MUC-4

V tabulce jsou znázorněny výsledky imunohistochemického barvení s použitou protilátkou MUC-4. Je zde zaznamenána míra exprese antigenu MUC-4 a procentuální zastoupení pozitivních choriových klků.

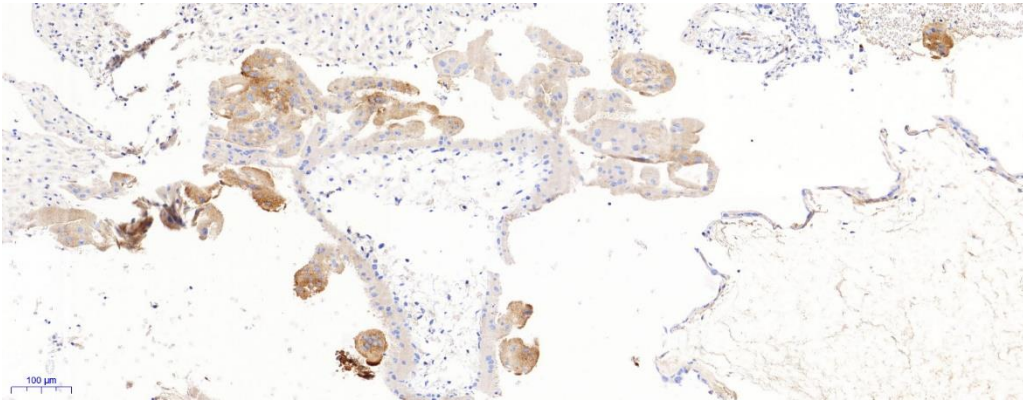
Z tabulky je patrné, že vzorek č. 189/R2 – placenta s prokázanou parciální molou vykazoval velice slabou pozitivitu MUC-4 uvnitř choriových klků.

Tabulka 7: Imunohistochemické barvení MUC-4

MUC-4							
TYP MATERIÁLU	ČÍSLO VZORKU	HODNOTÍCÍ 1		HODNOTÍCÍ 2		HODNOTÍCÍ 3	
		EXPRESE	POZITIVNÍ ČÁST [%]	EXPRESE	POZITIVNÍ ČÁST [%]	EXPRESE	POZITIVNÍ ČÁST [%]
Fyziologická placenta	16706/R8	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
Placenta časného hydropického abortu	9149	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9485	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9488/A	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9488/B	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9488/C	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	5585/R2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	5585/R7	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
Placenta s prokázanou parciální molou	189/R2	+	3	+	3	+	3
	189/R12	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0

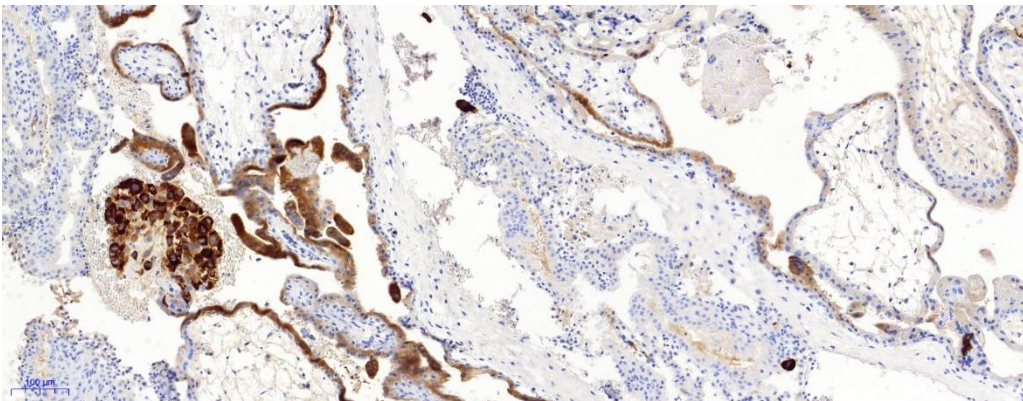
Zdroj: vlastní

*Obrázek 9: Vzorek č. 189/R2 – Placenta s prokázanou parciální molou*



*Zdroj: vlastní*

*Obrázek 10: Vzorek č. 189/R12 – Placenta s prokázanou parciální molou*



*Zdroj: vlastní*

Vzorek č. 189/R12 – placenta s prokázanou parciální molou vykazoval pozitivitu MUC-4 v oblasti trofoblastu.

### 9.2.4 MUC-6

V tabulce jsou znázorněny výsledky imunohistochemického barvení s použitou protilátkou MUC-6. Je zde zaznamenána míra exprese antigenu MUC-6 a procentuální zastoupení pozitivních choriových klků. Žádný ze zkoumaných vzorků nevykazoval pozitivitu.

*Tabulka 8: Imunohistochemické barvení MUC-6*

MUC-6							
TYP MATERIÁLU	ČÍSLO VZORKU	HODNOTÍCÍ 1		HODNOTÍCÍ 2		HODNOTÍCÍ 3	
		EXPRESE	POZITIVNÍ ČÁST [%]	EXPRESE	POZITIVNÍ ČÁST [%]	EXPRESE	POZITIVNÍ ČÁST [%]
Fyziologická placenta	16706/R8	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
Placenta časného hydropického abortu	9149	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9485	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9488/A	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9488/B	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	9488/C	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	5585/R2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	5585/R7	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
Placenta s prokázanou parciální molou	189/R2	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	189/R12	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0

*Zdroj: vlastní*

## DISKUZE

Tato bakalářská práce navazuje na studii Sustera a Robinsona z roku 1992. Ti, jako první, provedli pokus histochemické charakterizace mukosubstancí v patologicky změněných placentách. Výsledkem jejich studie bylo zjištění, že edém klků způsobuje akumulace silně sulfatovaných mukosubstancí a tím vyvrátili tvrzení, že hydropické klky souvisí s hemodynamickými změnami způsobenými akumulací vody.

Hlavní cíl této bakalářské práce se zaměřoval na charakterizaci hlenových substancí obsažených v choriových klcích placenty. Klíčové pro tento výzkum bylo vybrat placenty, které obsahovaly hydropické choriové klky. Vybraný sledovaný soubor zahrnoval 7 bločků placent časného hydropického abortu a 2 bločky placent s prokázanou parciální molou, u kterých hydropická degenerace klků představuje běžný histologický nález. John Soper ve svém článku uvádí, že parciální moly a hydropické aborty vykazují hydropické klky a trofoblastickou proliferaci.

Jako první v našem výzkumu bylo provedeno histochemické barvení u zkoumaných vzorků. Použili jsme čtyři histochemické metody, u kterých byla sledovaná intenzita barvení a procento choriových klků obsahujících kyselé mukolátky. První metoda Hematoxylin–Eosin sloužila pro vizualizaci vybraných řezů z každého vzorku. Další barvení bylo barvení toluidinovou modří, která obarvila kyselé mukopolysacharidy metachromaticky fialově. Následovalo barvení alcianovou modří, která měla pH 2,5. Toto barvení obarvilo kyselé mukopolysacharidy modře. Suster a Robinson ve své studii také uvádějí barvení alcianovou modří při pH 1,2 a 2,5, která dávala najevo silnou, difuzní pozitivitu mezibuněčné matrix uvnitř placentárních klků. Alcianová modř + PAS reakce, poslední z provedených barvení barví kyselé mukopolysacharidy také modře. Výsledky histochemických analýz, kromě přehledného barvení Hematoxylin–Eosin potvrzují přítomnost kyselých mukopolysacharidů uvnitř choriových klků placenty u všech našich zkoumaných patologických případů.

Jako další bylo provedeno imunohistochemické barvení. Byly použity čtyři protilátky, u kterých byla sledována míra exprese antigenů MUC–1, MUC–2, MUC–4, MUC–6 a pozitivní část, která zahrnuje procentuální zastoupení choriových klků pozitivních na danou protilátku z celkového počtu klků. U zkoumaných vzorků nebyla potvrzena přítomnost těchto sledovaných mucinu ve stromatu klku. Zvláštností a nečekaným nálezem je jeden vzorek parciální moly, který vykazoval velice slabou ložiskovou pozitivitu

MUC-4 a jeden vzorek s jednoznačnou pozitivní expresí MUC-4 v trofoblastu choriových klků.

Cílem této bakalářské práce bylo využít histochemické a imunohistochemické metody ke sledování přítomnosti mukosubstancí v choriových klcích placenty a následném zpřesnění histologického popisu klků v rámci obecné patologie. Námi získané výsledky potvrdily přítomnost kyselých mukopolysacharidů uvnitř choriových klků placenty. Přítomnost glykoproteinů MUC-1, MUC-2, MUC-6 nevykazoval žádný ze zkoumaných vzorků. Glykoprotein MUC-4 byl jednoznačně prokázán u jednoho ze vzorků parciální moly.

Naše výsledky mohou posloužit pro další navazující studie, které se také budou zabývat zpřesněním histologického popisu hydropicky změněných choriových klků v placentě a mohou být doplněny o další glykoproteiny jako jsou například gelotvorné MUC5AC nebo MUC5B.

## ZÁVĚR

Téma této bakalářské práce bylo zaměřeno na charakterizaci mukosubstancí obsažených v choriových klcích placent, u kterých bylo potvrzeno, že se placentární klky stávají hydropickými.

Teoretická část se věnovala obecným informacím o placentě a mukosubstancích, které jsou zde rozděleny do dvou podkapitol. Praktická část popisuje pracovní postup histochemických a imunohistochemických metod. Výsledky byly zpracovány do tabulek a fotografií.

Závěrem lze říci, že výsledky histochemických metod prokázaly, že hlenové substance hromadí se v hydropických klcích placent představují kyselé mukopolysacharidy, a to ve všech zkoumaných patologických vzorcích. Výsledky imunohistochemických metod ukázaly, že vyšetřované muciny MUC-1, MUC-2, MUC-6 nejsou exprimovány v choriových klcích hydropicky změněných placent ve sledovaném souboru vzorků. MUC-4 vykazoval mírnou expresi uvnitř choriových klků v jednom ze dvou zkoumaných vzorků parciální moly, což představuje spíše výjimku než významný nález. MUC-4 také vykazoval zvláštní typ positivity v oblasti trofoblastu, a to u druhého vzorku parciální moly. Uvnitř choriových klků však pozitivita prokázána nebyla.



## SEZNAM LITERATURY

1. **Kapeller, Karol a Pospíšilová, Viera.** *Embryologický atlas / Atlas of embryology.* Martin : Osveta, 1996. 80-217-0549-3.
2. **Pařízek, Antonín a kolektiv.** *Porodnická analgezie a anestezie.* Praha; Kamenice : Galén; MCC Publishing, 2012. 978-80-7262-893-3.
3. **Sadler, T. W.** *Langman's Medical Embryology - 12th edition.* místo neznámé : Lippincott Williams & Wilkins, 2012. 978-1-4511-1342-6.
4. **Hájek, Zdeněk, Čech, Evžen a Maršál, Karel, kolektiv.** *PORODNICTVÍ.* Praha : Grada Publishing, a.s., 2014. 978-80-247-4529-9.
5. **Hudák, Radovan, a další.** *Memorix histologie.* Praha : Stanislav Juhaňák - TRITON, 2017. 978-80-7553-249-7.
6. **Aplin, John D, Lewis, Rohan M a Jones, Carolyn J.** Development of the Human Placental Villus. *ResearchGate.* [Online] Leden 2018. [Citace: 6. Říjen 2021.] [https://www.researchgate.net/publication/323103413\\_Development\\_of\\_the\\_Human\\_Placental\\_Villus](https://www.researchgate.net/publication/323103413_Development_of_the_Human_Placental_Villus). 9780128012383.
7. **Višňovský, Jozef.** *Základy gynekologie a pôrodnictva I.* [Skripta] Martin : Jesseniova lekárska fakulta Univerzity Komenského, 2013. 978-80-89544-22-6.
8. **John, Rosalind a Hemberger, Myriam.** Trophoblast Development Symposium. *Reproductive BioMedicine Online.* [Online] 9. Duben 2012. [Citace: 22. Říjen 2021.] <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.03.018>.
9. **Wang, Yuping a Zhao, Shuang.** Vascular Biology of the Placenta. *National Center for Biotechnology Information.* [Online] 2010. [Citace: 25. Říjen 2021.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53254/>.
10. **Syme, Michael R., Paxton, James W. a Keelan, Jeffrey A.** Drug Transfer and Metabolism by the Human Placenta. *ResearchGate.* [Online] Únor 2004. [Citace: 4. Říjen 2021.] [https://www.researchgate.net/publication/8537048\\_Drug\\_Transfer\\_and\\_Metabolism\\_by\\_the\\_Human\\_Placenta](https://www.researchgate.net/publication/8537048_Drug_Transfer_and_Metabolism_by_the_Human_Placenta). 1179-1926.

11. **Costa, Mariana A.** The endocrine function of human placenta: an overview. *Reproductive BioMedicine Online*. [Online] 27. Říjen 2015. [Citace: 5. Listopad 2021.] [https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(15\)00495-2/fulltext.1472-6483](https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(15)00495-2/fulltext.1472-6483).
12. **Gupta, Rekha K. a Gupta, Ramesh C.** Reproductive and Developmental Toxicology (Second Edition). *ScienceDirect*. [Online] 31. Březen 2017. [Citace: 21. Listopad 2021.] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128042397000688?via%3Dihub.9780128042397>.
13. **Vacek, Zdeněk.** *Embryologie*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2006. 80-247-1267-9.
14. **Trávník, Pavel a Čech, Svatopluk.** *Základy obecné a speciální embryologie pro klinické embryologie*. Brno : YBUX s.r.o., 2011. 978-80-904697-0-9.
15. **Zakaria, Ahmed, a další.** Incidence and outcome of gestational trophoblastic disease in lower Egypt. *African Health Sciences*. [Online] 20. Duben 2020. [Citace: 16. Listopad 2021.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7750079/>.
16. **Rob, Lukáš.** Gestační trofoblastická nemoc. *Linkos*. [Online] 4. Leden 2017. [Citace: 27. Listopad 2021.] <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/gynekologicke-nadory-c51-54-c56-57/gestacni-trofoblasticka-nemoc/>.
17. **Hacker, Neville F., Gambone, Joseph C. a Hobel, Calvin J.** *Hacker & Moore's essentials of obstetrics & gynecology*. Philadelphia : Elsevier, 2016. 978-1-4557-7558-3.
18. **Soper, John T.** Gestational Trophoblastic Disease. *Obstetrics & Gynecology*. [Online] Únor 2021. [Citace: 19. Říjen 2021.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7813445/>.
19. **Vang, Russell, a další.** Diagnostic Reproducibility of Hydatidiform Moles: Ancillary Techniques (p57 Immunohistochemistry and Molecular Genotyping) Improve Morphologic Diagnosis. *National Center for Biotechnology Information*. [Online] Březen 2012. [Citace: 18. Říjen 2021.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4562215/>. PMID: 22245958.
20. **Basta, Marina a Lipsett, Brody J.** Anatomy, Abdomen and Pelvis, Umbilical Cord. *National Center for Biotechnology Information*. [Online] Leden 2021. [Citace: 3. Listopad 2021.]

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557389/?fbclid=IwAR0\\_uTiH1O\\_jaZ8EC1h1DbPM3T6bR5E7NVWwCP7XXQAXIdzrOe\\_uX7BKtz4](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557389/?fbclid=IwAR0_uTiH1O_jaZ8EC1h1DbPM3T6bR5E7NVWwCP7XXQAXIdzrOe_uX7BKtz4). PMID: 32491321.

21. **Heil, Jenna, R a Bordoni, Bruno.** Embryology, Umbilical Cord. *Reproductive BioMedicine Online*. [Online] Leden 2021. [Citace: 10. Listopad 2021.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557490/>. PMID: 32491422.

22. **Murray, Robert K., a další.** *Harperova BIOCHEMIE*. Praha : Nakladatelství a vydavatelství H&H, 2002. 80-7319-013-3.

23. **Mescher, Anthony, L.** *Junqueirovy ZÁKLADY HISTOLOGIE*. Praha : Galén, 2018. 978-80-7492-324-1.

24. **Muntau, Ania, Carolina.** *Pediatric*. Praha : Grada Publishing a.s., 2009. 978-80-247-2525-3.

25. **Murray, Robert K., a další.** *HARPEROVA ILUSTROVANÁ BIOCHEMIE*. Praha : Galén, 2012. 978-80-7262-907-7.

26. **Kasprzak, Aldona a Adamek, Agnieszka.** Mucins: the Old, the New and the Promising Factors in Hepatobiliary Carcinogenesis. *National Center for Biotechnology Information*. [Online] 14. Březen 2019. [Citace: 3. Listopad 2021.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6471604/?report=classic>. PMID: 30875782.

27. **Čížková, Kateřina.** *Základy histochemických metod*. [Skriptum] Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2018. 978-80-244-5316-3.

28. **Chen, Wenqing, a další.** MUC1: Structure, Function, and Clinic Application in Epithelial Cancers. *National Center for Biotechnology Information*. [Online] 18. Červen 2021. [Citace: 2. Listopad 2021.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8234110/>. PMID: 34207342.

29. **Rakha, Emad, a další.** Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer. *Modern Pathology*. [Online] 24. Červen 2005. [Citace: 6. Listopad 2021.] <https://www.nature.com/articles/3800445>.


30. **Kim, Young a Ho, Samuel.** Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *SpringerLink*. [Online] 13. Srpen 2010. [Citace: 6. Listopad 2021.] [https://link.springer.com/article/10.1007/s11894-010-0131-2?utm\\_source=getftr&utm\\_medium=getftr&utm\\_campaign=getftr\\_pilot](https://link.springer.com/article/10.1007/s11894-010-0131-2?utm_source=getftr&utm_medium=getftr&utm_campaign=getftr_pilot).
31. **Johansson, Malin, Larsson, Jessica a Hansson, Gunnar, C.** The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. [Online] 25. Červen 2010. [Citace: 7. Listopad 2021.] <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1006451107#sec-12>. 1091-6490.
32. **Majhi, Prabin, Dhangada, a další.** Pathobiological Implications of MUC4 in Non–Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. [Online] 1. Duben 2013. [Citace: 8. Listopad 2021.] <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1556086415327830>. 1556-0864.
33. **Choudhury, Amit, a další.** Retinoic Acid-dependent Transforming Growth Factor- $\beta$ -mediated Induction of MUC4 Mucin Expression in Human Pancreatic Tumor Cells Follows Retinoic Acid Receptor- $\alpha$  Signaling Pathway\*. *Journal of Biological Chemistry*. [Online] 10. Srpen 2000. [Citace: 9. Listopad 2021.] [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)89095-4/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)89095-4/fulltext).
34. **Toribara, Neil, W., a další.** The Carboxyl-terminal Sequence of the Human Secretory Mucin, MUC6. *Journal of Biological Chemistry*. [Online] 3. Únor 1997. [Citace: 10. Listopad 2021.] [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)70115-4/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)70115-4/fulltext).
35. **Lara, Cobler, Garrido, Marta a de Bolós, Carme.** MUC6 (mucin 6, oligomeric mucus/gel-forming). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. [Online] Prosinec 2009. [Citace: 10. Listopad 2021.] <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/MUC6ID44115ch11p15.html>.
36. **Suster, Saul a Morton, Robinson J.** *Placental Intravillous Accumulation of Sulfated Mucosubstances A Reevaluation of So-Called Hydropic Degeneration of Villi*. [Dokument] Miami : Institute for Clinical Science, 1992.

## **SEZNAM PŘÍLOH**

- Příloha 1 – Pracovní postup barvení Hematoxylin – Eosin
- Příloha 2 – Pracovní postup barvení toluidinovou modří
- Příloha 3 – Pracovní postup barvení alciánovou modří
- Příloha 4 – Pracovní postup barvení PAS reakce + alciánová modř
- Příloha 5 – Pracovní postup barvení pro protilátku MUC-1
- Příloha 6 – Pracovní postup barvení pro protilátku MUC-2
- Příloha 7 – Pracovní postup barvení pro protilátku MUC-4
- Příloha 8 – Pracovní postup barvení pro protilátku MUC-6
- Příloha 9 – Souhlas s poskytováním informací

# PŘÍLOHY

## Příloha 1 – Pracovní postup barvení Hematoxylin – Eosin

 FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ	PPZ SUP/003/VERZE 06		
Pracovní postup zkrácený SUP/003/06			
<b>Barvení Hematoxylin – Eosin</b>			
Účinnost od:	15. 4. 2019	Revize:	1x za 2 roky
Kontaktní osoba:	Petra Vopelková Načeradská	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 diferenačním roztoku
4. práť 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

Rozpusťte hematoxylin, jodičnan sodný a síran hlinitý v destilované vodě (rozpusťte každé zvlášť a pak teprve smíchejte). Přidejte ethylenglykol, promíchejte. Naposledy přidejte kyselinu octovou ledovou. Hematoxylin lze 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: Petra Vopelková Načeradská	Správce dokumentů: Eva Kaslová kl. 2740	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: Šiklův ústav patologie FN Plzeň

## Příloha 2 – Pracovní postup barvení Toluidinovou modří

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 mukosubstance, 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 označeny.  
K odběru vzorků a jejich přípravě je nutné použít vhodné nástroje.  
Dodržujte pokyny výrobce týkající se aplikace/použití.  
Řezy zbarve parafínu 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
rozpustíte a přefiltrujete	

Čerstvě připravený barvicí roztok by se před použitím měl přefiltrovat.

#### Postup – barvení jader / přehledné barvení

##### Barvení v barvicí komůrce

Histologická sklíčka zbarve obvyklým způsobem parafínu 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 řežem	
Destilovaná voda	1 min
Toluidinová modř O roztok 0,1 %	10 - 20 min
Destilovaná voda	1 min
Montování pomocí glycerolu	
<b>nebo pro trvalé preparáty:</b>	
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 zbarve obvyklým způsobem parafínu 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 řežem	
Destilovaná voda	1 min
Toluidinová modř O roztok 0,1% <sup>1)</sup>	1–2 min
Destilovaná voda	1 min
Montujte s glycerolem a krycím sklíčkem (utěsněte bezbarvým lakem na nehty)	
<b>nebo pro trvalé preparáty:</b>	
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.	

<sup>1)</sup> 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 kyselá uhlohydráty\* metachromatická růžová až červená nebo fialová

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

Zdroj: Šiklův ústav patologie FN Plzeň

### Technické poznámky

Použitý mikroskop by měl splňovat požadavky zdravotnické diagnostické laboratoře.  
Při používání histoprocenů 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 uznávaných 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.

Abyste nedocházeli 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 směrnici.

### Pokyny ohledně likvidace

Balení musí být zlikvidováno v souladu se stávajícími směrnici týkajícími se likvidace.

Použité roztoky a roztoky po uplynutí doby použitelnosti je nutno likvidovat jako zvláštní odpad v souladu s místními směrnici. 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](http://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 klasifikacemi rizik vytisknutými na štítku a informacemi 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

$C_{15}H_{16}ClN_2S$

M = 305,84 g/mol

### Jiné výrobky pro IVD

Kat. č. 100362	Souprava pro stříbení 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. Romels - 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 Kiernan, 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](http://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: Šiklův ústav patologie FN Plzeň



## Příloha 3 – Pracovní postup barvení alciánovou modří

Pracovní postup zkrácený SUP/023/04

### Barvení alciánovou 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 alciánové 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:

Alciánová modř pH = 2,5:

Používáme hotový roztok od firmy Merck

#### Jádrová červení:

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 Mukenšnabl, Ph.D./9.9.2016
-------------------------------	---	---	---

## Příloha 4 – Pracovní postup barvení PAS reakce + alciánová modř



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:

kyselě 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: Šiklův ústav patologie FN Plzeň

## Příloha 5 – Pracovní postup pro protilátku MUC-1

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

**MUC-1**  
Koncentrovaná a předředěná monoklonální protilátka 901-319-111318

**BIOCARE**  
MEDICAL

**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 studiemi 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 ductálních 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 cholangioepiteliální 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

**Druhá 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 (tkáň fixovaná 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. Ředěné činidlo okamžitě spotřebujte; jakékoli zbývající činidlo by mělo být skladováno při 2°C až 8°C.

**Doporučení protokolu (intellIPATH FLX® a manuální použití):**  
**Blokování peroxidázy:** Blokujte po dobu 5 minut s Peroxidazed 1.  
**Předošetření:** 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 omyvací 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 použití detekční soupravy. Vzhledem k vynikající citlivosti těchto jedinečných reagenci 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 (NaN<sub>3</sub>), který se používá jako konzervační látka, je toxický při požití. Azid sodný může reagovat s olověným a měděným potrubím za vzniku vysoce výbušných azidů kovu. 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 likvidovány s náležitými opatřeními. Nepipetujte reagencie 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>.

Zdroj: Šiklův ústav patologie FN Plzeň

## Příloha 6 – Pracovní postup pro protilátku 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 parafínu. Podmínky odmaskování: Doporučuje se předběžné ošetření deparafinizované 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 1<sup>st</sup> 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: Šiklův ústav patologie FN Plzeň

## Příloha 7 – Pracovní postup pro protilátku MUC-4

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

# Mucin 4 (8G7): sc-53945



The Power to Cure™

---

### 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 slalomucinového 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, plic 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.

### VÝZKUMNÉ POUŽITÍ


*Pouze pro výzkumné účely, není vhodný pro diagnostické postupy*

---

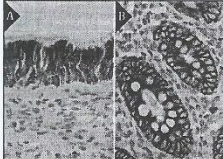
### LOKALIZACE CHROMOSOMŮ

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

### DATA



Mucin 4



---

### ZDROJ

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

### 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, NFkB 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.

---

### PRODUKT

Každá vialka obsahuje 100 µg IgG<sub>1</sub> v 1,0 ml PBS s <0,1% azidu sodného a 0,1% gelatinu.

### SKLADOVÁNÍ

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

---

### 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 zapařených do parafínu) (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.

### CONJUGATES

Podívejte se také na: Mucin 4 (1G8): sc-33654 pro konjugáty protilátky mucin 4, zahrnující AC, 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](http://www.scbt.com)

Zdroj: Šiklův ústav patologie FN Plzeň

## Příloha 8 – Pracovní postup pro protilátku MUC-6

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

Kat. č.: PA0053

#### Určené použití

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

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

Klinickou interpretaci jakéhokoliv barvení nebo 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 reagensí 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 reagensí 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 inhereční variability v důsledku ředění jednotlivých reagensí, manuálního pipetování a použití reagensí.

#### Dodávané reagencie

Muc-6 Glycoprotein (CLH5) je myši monoklonální protilátka proti lidským antigenům vyráběná jako supernatant z tkáňové kultury a dodávána 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 reagensie 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 reagensí 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 ověřit!

#### Bezpečnostní opatření

- Tento produkt je určen pouze 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 reagensími 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](http://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 opatření<sup>2</sup>. Nikdy reagensie nepipetujte ústy a zabraňte kontaktu reagensí a vzorků s kůží a sliznicemi. Pokud se reagensie nebo vzorky dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody. Vyhledejte lékařskou pomoc.

PA0053  
Page 2

Zdroj: Šiklův ústav patologie FN Plzeň

- Údaje 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.
- Získávací, 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 tkáň

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

##### Nádorové tkáň

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 sířevní metapláze. Barvení nebylo zjištěno v různých dalších vyšetřovaných abnormálních tkáních včetně nádorů sířev (0/9), nádorů šitné 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), nádoru pankreatu (0/1), hyperplazie prostaty (0/1), nádoru jazyka (0/1) a melanomu (0/1). (Celkový počet vyšetřovaných 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 zvyraznění antigenu a musí být stanoveny empiricky. Při optimalizaci podmínek při získávání a dob v protokolu musí být použity reagensy 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 Principu testu, 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. Horjō K, Hiraki T, Higashi M, et al. Immunohistochemical expression profiles of mucin antigens in salivary gland mucoepidermoid 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 Archiv: 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

PA0053  
Page 3

Zdroj: Šiklův ústav patologie FN Plzeň

## Příloha 9 – Souhlas s poskytováním informací



**FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ**  
Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči  
Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory  
alej Svobody 89, 304 60 Plzeň - Lochotín  
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní  
Denisa Bošková  
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** s analýzou / zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních metod, používaných na pracovišti *Šiklova ústavu patologie (ŠÚP) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „Charakterizace hlenových substancí přítomných v choriových klicích placenty“.

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

- Vrchní zdravotní laborantka ŠÚP souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně provedete 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 Vaší, školou schválené odborné praxe na ŠÚP a 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: [chabrov@s@fnplzeň.cz](mailto:chabrov@s@fnplzeň.cz)

18. 2. 2020

Zdroj: FN Plzeň