

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2019

LUCIE SOUKUPOVÁ

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví (B5345)

Lucie Soukupová

Studijní obor: Zdravotní laborant (5345R020)

**MORFOLOGIE A IMUNOHISTOCHEMICKÝ PROFIL
MALPERFÚZNÍCH PLACENTÁRNÍCH SYNDROMŮ**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Magdaléna Dubová, Ph.D.

PLZEŇ 2019

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
Fakulta zdravotnických studií
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie SOUKUPOVÁ**
Osobní číslo: **Z16B0115P**
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Morfologie a imunohistochemický profil malperfúzních
placentárních syndromů**
Zadávací katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdra-
votnictví**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- Zpracovat seznam odborné literatury na vybrané téma
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu

Rozsah grafických prací:

Rozsah kvalifikační práce:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- Redline RW. Classification of placental lesions. Am J Obstet Gynecol. 2015 Oct;213(4 Suppl):S21-8.
- Khong TY, Mooney EE, Ariel I et al. Sampling and Definitions of Placental Lesions: Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement. Arch Pathol Lab Med. 2016 Jul;140(7):698-713.
- Baergen R. Manual of Pathology of the Human Placenta: Second Edition. 2nd ed. 2011. New York, NY, United States: Springer, 2011. ISBN 9781441974938.
- Kappela K, Pospíšilová V. Embryologický atlas: Atlas of embryology. Osveta, 1996. ISBN 8021705493.
- Kaplan C. Color Atlas of Gross Placental Pathology: Second edition. 2. US: Springer, 2007. ISBN 9780387338422.
- JIRKOVSKÁ, Marie. Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky. Druhé, doplněné vydání. Praha: Galén, [2017]. Zákklady (Galén). ISBN isbn978-80-7492-325-8.

Vedoucí bakalářské práce:

MUDr. Magdaléna Dubová

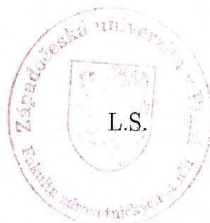
Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **31. ledna 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **29. března 2019**



PhDr. Lukáš Štich
pověřen vedením fakulty



PhDr. Alena Pistulková
vedoucí katedry

V Plzni dne 1. února 2019

Čestné prohlášení:

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

V Plzni dne 27.3.2019

.....

vlastnoruční podpis

ABSTRAKT

Příjmení a jméno: Soukupová Lucie

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Morfologie a imunohistochemický profil malperfúzních placentárních syndromů

Vedoucí práce: MUDr. Magdaléna Dubová, Ph.D.

Počet stran: číslované 41, nečíslované 19

Počet příloh: 2

Počet titulů použité literatury: 33

Klíčová slova: placenta, fetální vaskulární malperfúze, FVM, maternální vaskulární malperfúze, MVM, preeklampsie, morfologie, imunohistochemie, p53

Bakalářská práce se zabývá incidencí a charakteristikou fetální a maternální vaskulární malperfúze v placentách vyšetřených za jeden rok v Šiklově ústavu patologie.

Teoretická část práce obsahuje informace o placentě, morfologických znacích vaskulárních malperfúzí, klinických stavech provázejících malperfúze, důsledcích pro plod a matku a obecných charakteristikách imunohistochemického vyšetření.

V praktické části jsou shrnuta statistická data popisující frekvenci výskytu malperfúzních syndromů ve vyšetřeném souboru, asociované maternální choroby, patologické stavy plodu a korelaci klinických a morfologických diagnóz. Tyto výsledky byly porovnány s literárními údaji. Součástí praktické části je dále vyhodnocení imunohistochemického vyšetření v souboru vybraných případů s klinicky potvrzenou diagnózou preeklampsie, u kterých nebyly prokázány morfologické známky maternální vaskulární malperfúze.

ABSTRACT

Surname and name: Soukupová Lucie

Department: Department of Rescue Services and Technical Fields

Title of thesis: Morphological and immunohistochemical profile of placental vascular malperfusion

Consultant: MUDr. Magdaléna Dubová, Ph.D.

Number of pages: numbered 41, unnumbered 19

Number of appendices: 2

Number of literature items used: 33

Keywords: placenta, fetal vascular malperfusion, FVM, maternal vascular malperfusion, MVM, preeclampsia, morphology, immunohistochemistry, p53

The bachelor thesis deals with the incidence and characteristics of fetal and maternal vascular malperfusion in a series of placentas examined during 1-year period in the Šikl's Department of Pathology.

The theoretical part of the thesis contains information about placenta, morphological features of vascular malperfusions, clinical conditions accompanying malperfusions, consequences for the fetus and mother and general characteristics of immunohistochemistry.

The practical part summarizes statistical data describing the frequency of placental vascular malperfusion, associated maternal diseases, pathological conditions of the fetus and correlation of clinical and morphological diagnoses. These results were compared with literature data. Moreover, the practical part includes evaluation of immunohistochemical examination in a set of selected cases with a clinically confirmed diagnosis of preeclampsia, in which no morphological signs of maternal vascular malperfusion were present.

PŘEDMLUVA

K tématu bakalářské práce jsem se dostala díky praktické výuce histologické techniky ve FN Plzeň. Téma malperfúzních placentárních syndromů mě zaujalo jednak možností pracovat na neobvyklé a originální bakalářské práci a odlišit se tak od bakalářských prací, jejichž témata se pravidelně opakují, ale také příležitostí získat hlubší odborné povědomí o placentě, její patologii a jejím významu pro matku a plod.

Teprve před několika lety došlo k ucelení klasifikace a nomenklatury patologických nálezů v placentě, včetně malperfúzních syndromů, a lze předpokládat, že v budoucnu bude stále ještě docházet k jejímu zpřesňování. Tato bakalářská práce shrnuje současné poznatky o vaskulárních malperfúzích. Jejím účelem je zmapovat charakteristiku a incidenci fetální a maternální vaskulární malperfúze v placentách vyšetřených za jeden rok v Šiklově ústavu patologie FN Plzeň.

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce MUDr. Magdaléně Dubové, Ph.D. za pomoc při vypracování bakalářské práce, za poskytnuté materiály a rady, za povzbuzující slova, optimismus a především za nekonečnou trpělivost. Chtěla bych poděkovat také paní Gabriele Suché za zprostředkování spolupráce s paní doktorkou Dubovou.

Děkuji své rodině za psychickou a finanční podporu po celou dobu mého studia.

Dále děkuji panu Rychnavskému, že několik let prodlužoval své vlastní studium, abychom mohli ukončit vysokoškolská studia společně. Nesmírně si této oběti vážím.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ.....	10
SEZNAM TABULEK	11
SEZNAM ZKRATEK	12
Úvod	13
TEORETICKÁ ČÁST	15
1 Embryologie	15
1.1 Embryonální vývoj.....	15
1.2 Fetální vývoj.....	15
2 Placenta.....	17
2.1 Vývoj placenty	17
2.1.1 Zrání a diferenciacie klků.....	18
2.2 Anatomie placenty	18
2.2.1 Maternální (mateřská) část.....	19
2.2.2 Fetální (plodová) část.....	19
2.3 Funkce placenty	20
2.4 Placentární bariéra.....	20
2.5 Cirkulace krve v placentě.....	21
2.6 Pupečník.....	21
3 Malperfúzní syndromy.....	22
3.1 Choroby vedoucí k MVM	22
3.1.1 Preeklampsie	22
3.1.2 Hypertenze	23
3.1.3 HELLP syndrom	23
3.1.4 Diabetes mellitus.....	23
3.1.5 Autoimunitní choroby	24
3.2 Změny v placentě u MVM	24
3.3 Choroby vedoucí k FVM	26
3.3.1 Patologické stavy pupečníku.....	26
3.3.2 Hyperkoagulační stavy plodu.....	27
3.3.3 Srdeční selhávání plodu	28
3.4 Změny v placentě u FVM	28
4 Význam malperfúzních syndromů pro matku a plod	30
4.1 Hypoxie	30

4.2	Porodní hmotnost	30
4.3	Předčasný porod	31
4.4	Nitroděložní odumření plodu	31
5	Imunohistochemie.....	32
5.1	Odběr materiálu.....	32
5.1.1	Zpracování placenty	32
5.2	IHC metody	33
5.3	Výroba preparátu.....	33
5.4	IHC barvení	34
5.4.1	Antigen p53	35
	PRAKTICKÁ ČÁST	36
6	CÍL PRÁCE.....	36
7	VÝZKUMNÉ OTÁZKY	37
8	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	38
9	METODIKA PRÁCE	39
9.1	Výběr sledovaného souboru.....	39
9.2	Příprava preparátů k imunohistochemickému barvení.....	40
9.3	Mikroskopování	40
10	VÝSLEDKY	41
11	DISKUZE	49
	ZÁVĚR.....	53
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54
	SEZNAM PŘÍLOH	58

SEZNAM OBRÁZKŮ

Graf 1 Poměr zastoupení jednotlivých typů malperfúzí	41
Graf 2 Procentuální zastoupení věkových skupin matek, v jejichž placentách byly prokázány známky MVM.	44
Graf 3 Korelace klinické diagnózy s morfológickou diagnózou u placent postižených MVM	45
Obrázek 1 A: Maternální povrch placenty rozdělený v kotyledony. B: Fetální povrch placenty s plodovými obaly a pupečníkem.	20
Obrázek 2 A: Infarkty a infarkt–hematomy placenty. B: Mikroskopický obraz infarkt–hematomu.	25
Obrázek 3 A: Akcelerovaná zralost choriových klků, zmnožení syncytiálních uzlů (33. týden). B: Distální vilózní hypoplazie (DVH) (32. týden).	26
Obrázek 4 Výrazné vinutí pupečníku (>3 otáčky/10 cm délky pupečníku).27	
Obrázek 5 A: FVM: vlevo avaskulární choriové klky, vpravo choriové klky s normální vaskularizací B: Trombóza jedné umbilikální artérie.	29
Obrázek 6 Placenta z fyziologické gravidity – fokální exprese p53 v buňkách stromatu a vilózního trofoblastu (zvětšeno 400x)	47
Obrázek 7 MVM – zvýšená exprese p53 ve vilózním trofoblastu choriových klků, pozitivní buňky jsou hnědé (zvětšeno 200x)	47
Obrázek 8 Placenta bez známek MVM – zvýšená exprese p53 ve vilózním trofoblastu (zvětšeno 400x)	48

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Vyhodnocení počtu placent, u nichž byly nalezeny morfologické známky malperfúze.....	41
Tabulka 2 Gestační stáří plodů	42
Tabulka 3 Počet vícečetných gravidit ve vyšetřovaném souboru	42
Tabulka 4 Počet placent mrtvě porozených/potracených plodů.	43

SEZNAM ZKRATEK

ANA.....	Antinukleární protilátky
APA	Antifosfolipidové protilátky
DM	Diabetes mellitus
DNA.....	Deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	Double-stranded DNA (dvouvláknová DNA)
DVH	Distální vilózní hypoplasie
FGR	Fetal growth restriction (růstová restrikce plodu)
FVM	Fetální vaskulární malperfúze
hCG.....	Humánní choriový gonadotropin
IHC	Imunohistochemie
IUGR.....	Intrauterinní růstová restrikce
MVM	Maternální vaskulární malperfúze
SUA	Single umbilical artery (jedna umbilikální artérie)
UCI	Umbilical coiling index
VCC	Vitium cordis congenitum (vrozené srdeční vady)

Úvod

V roce 2014 byla světovými odborníky na perinatální patologii diskutována problematika placentárních lézí. Výsledkem kongresu bylo zavedení jednotného hodnocení a nomenklatury většiny placentárních lézí, známé jako tzv. Amsterdamská klasifikace (Amsterdam Placental Workshop Group Criteria). Tato kritéria by měla být pro všechny praktikující odborníky vyšetřující placentu závazná.

Na základě této klasifikace jsou patologické procesy placenty rozděleny do několika skupin, a to na procesy zánětlivé, vaskulární a jiné.

Malperfúzní syndromy zařazené mezi vaskulární léze jsou patologické stavy negativně ovlivňující cirkulaci krve v placentě a tím i správnou placentární funkci nezbytnou pro fyziologický vývoj plodu. Malperfúze může postihovat jak uteroplacentární, tak fetoplacentární oběh, přičemž morfologicky se postižení na jednotlivých úrovních projevuje specifickými mikroskopickými změnami. Malperfúzní syndromy mohou vznikat v asociaci s různými chorobami postihujícími matku i plod. Vzhledem k tomu, že etiopatogeneze některých těchto stavů není ještě plně objasněna, je velmi pravděpodobné, že nově objevené skutečnosti povedou i k dalšímu zdokonalení klasifikačních systémů, možná i k reklasifikaci některých placentárních lézí.

Fetální i maternální vaskulární malperfúze významně přispívá ke zvýšené fetální morbiditě a mortalitě. Je tedy nesmírně důležité seznámení odborné veřejnosti s touto problematikou.

Bakalářská práce je rozdělena na dvě části. V části teoretické jsou shrnuty obecné informace o anatomii a funkci placenty. Obsáhlejší kapitola je věnována problematice fetální a maternální vaskulární malperfúze a chorobám asociovaným s těmito stavy. V neposlední řadě jsou v této části práce uvedeny informace o laboratorním zpracování placenty a imunohistochemickém vyšetření.

Praktická část je zaměřena na statistické vyhodnocení dat získaných z nemocničního informačního systému a dále na praktické hodnocení imunohistochemické exprese antigenu p53 ve vybraném souboru placent.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Embryologie

Věda zabývající se vznikem a vývojem živých organismů se nazývá embryologie. U člověka se embryologie zabývá vývojem před narozením tzv. prenatálním obdobím, tedy časem předcházejícím narození, které začíná oplozením a končí porodem plodu. Nitroděložní vývoj trvá přibližně 38 týdnů (40 ± 2 týdny) a má dvě fáze. Doba, kdy se během 8 týdnů z jedné buňky vyvíjejí základy orgánů se nazývá embryogeneze. V dalším období dochází k diferenciaci těchto buněčných základů a růstu plodu. Toto období se nazývá fetálním obdobím a trvá od 9. týdne až do konce gravidity. Studium tohoto období je důležité nejen pro porozumění normálnímu vývoji, ale i pro pochopení vzniku různých malformací, anomálií a jiných patologických změn (Schoenwolf, 2014; Sadler, 2011; Vacek, 2006; Kapeller, 2001).

1.1 Embryonální vývoj

Splynutím oocyty a spermie dochází ve vejcovodu k procesu oplodnění a vzniku tzv. zygoty. Zygota se dále opakovaně mitoticky dělí za vzniku dalších stádií moruly a blastocysty. V blastocystě se nalézají dva druhy buněk. Vnější vrstva buněk zvaná trofoblast se stará o výživu zárodka. Trofoblast se diferencuje ve dvě vrstvy, cytotrofoblast s Langhansovými buňkami a syncytiotrofoblast, jenž se účastní přenosu dýchacích plynů a živin mezi mateřským a fetálním krevním řečištěm a produkuje těhotenské hormony. Trofoblast také dává základ choriu, z něhož se vyvíjejí plodové části placenty a obalů. Z druhé části buněk blastocysty zvané embryoblast vznikají zárodečné listy, ze kterých se vyvíjejí embryo a extraembryonální struktury např. pupečník. Embryonální období trvá 8. týdnů (Balko, 2017; Kapeller, 2001).

1.2 Fetální vývoj

Fetální období probíhá od 9. týdne nitroděložního vývoje až do narození. V embryonálním období došlo k založení základů všech orgánů a ve fetálním období dochází k jejich růstu a funkčnímu vyžívání. Dochází tak

nejen k diferenciaci tkání, ale i ke vzniku definitivních orgánů a jejich systémů. Během této doby zvyšuje fetus svou hmotnost z 10–45 gramů na zhruba 3000 až 3400 gramů. Již po dosažení přibližně 24. týdne vývoje je v případě předčasného porodu plod schopen přežít (Balko, 2017; Stožický, 2015; Sadler, 2011; Kapeller, 2001).

2 Placenta

Placenta je dočasným orgánem, který po dobu nitroděložního vývoje zajišťuje výměnu látek mezi matkou a plodem (Kapeller, 2001). Z tohoto důvodu se skládá z plodových i mateřských tkání. Placenta také zastává funkci orgánu s vnitřní sekrecí. Hormony, které produkuje, jsou důležité pro udržení těhotenství od druhého trimestru. K plnému vyvinutí placenty dochází kolem 4. měsíce. Placenta donošeného plodu připomíná diskovitý útvar o průměru 15–25 cm, tloušťce 2–3 cm s průměrnou hmotností pohybující se v termínu porodu okolo 500 g (Balko, 2017).

2.1 Vývoj placenty

Vývoj placenty začíná poté, co se blastocysta uhnízdí v endometriu dělohy. Endometrium je v této době na vrcholu své sekreční fáze a sliznice je tím pádem dobře prokrvená. Vlivem pronikání blastocysty do sliznice dochází k transformaci endometria. Takto přeměněná sliznice dělohy se nazývá deciduou a lze ji rozdělit na čtyři části, z nichž je pro vznik placenty důležitá decidua basalis nalézající se pod blastocystou. Současně probíhají změny v samotné blastocystě (Kapeller, 2001).

Pro vznik placenty je zásadní trofoblast na povrchu blastocysty, který se diferencuje v trofoblast vilózní a extravilózní. Vilózní trofoblast pokrývá choriové klky a skládá se z vrstvy cytotrofoblastu i syncytiotrofoblastu. Extravilózní trofoblast je odpovědný za infiltraci děložního endometria a sestává především z intermediárního trofoblastu (Kapeller, 2001).

Mezi 2. a 3. týdnem vývoje se z choriové plotny, vzniklé z trofoblastu, vyvíjejí choriové klky. Nejprve se vytvoří primární choriové klky, a to vrůstáním buněk cytotrofoblastu do výběžků syncytiotrofoblastu. Za přispění mezenchymu z extraembryonálního mezodermu vznikají sekundární choriové klky. Po vytvoření krevních kapilár vznikají terciární choriové klky. Ty jsou uvnitř plně vaskularizované, obsahují vrstvu Langhansových buněk z cytotrofoblastu a na povrchu je pokrývá syncytiotrofoblast. Vaskularizace choriových klků a choriové plotny (membrány) je předpokladem pro úspěšnou výměnu látek mezi matkou a plodem (Kapeller, 2001).

Ve 3. týdnu se diferenciací klků mění poměr druhů trofoblastu a buňky cytotrofoblastu přirůstají k decidua basalis. Na okraji implantační dutiny se vytvoří trofoblastový obal, který oddělí choriové klky od ostatní deciduy. Přes tento obal pronikají cévy matky a z nich se mateřská krev vylévá do intervilózních prostor. Na trofoblastovém obalu se také shromažďuje látka zvaná fibrinoid (Kapeller, 2001). Fibrinoid je hmota podobající se fibrinu, její přesná funkce ani původ nejsou zcela jasné. Pravděpodobně však slouží k přichycení trofoblastu k decidua basalis a podporuje růst klků. (Balko, 2017)

Po celém obvodu choriové plotny se nacházejí terciární klky, jež vytvářejí tzv. chorion frondosum. Terciární klky pevně zakotvené na okraji trofoblastového obalu se nazývají kmenové klky. Z nich vyrůstají do intervilózních prostor volné klky, které se dále větví (Kapeller, 2001).

Přibližně ve 2. měsíci gravidity v dalších oblastech deciduy choriové klky atrofují a dávají tak vzniknout tzv. chorion laeve. Chorion frondosum se nadále vyvíjí pouze v rozsahu bazální deciduy, v níž vznikne placenta. V 5. měsíci gravidity je již placenta pevně spojena choriem s deciduou. (Kapeller, 2001)

2.1.1 Zrání a diferenciacie klků

Terciární choriové klky rostou po celém povrchu blastocysty. V začátku gravidity se jedná o mezenchymové klky, jejichž stavba je jednoduchá a z hlediska výživy jsou málo efektivní. Dalším druhem jsou nezralé intermediární klky, které podporují růst kmenových klků. Z nich vyrůstají zralé kmenové intermediární klky zastávající endokrinní a metabolickou funkci v placentě. Nejefektivnější výměnu látek mezi plodem a matkou zajišťují terminální klky s kapilárami na své periferii (Kapeller, 2001).

2.2 Anatomie placenty

Placenta se dělí na část mateřskou a fetální. Děložní sliznice se po uhníždění embrya diferencuje v deciduální ploténku, maternální část placenty. Tato část se skládá z 15–30 kotyledonů a její povrch je drsný a jemně zrnitý. Choriová plotna s terciárními choriovými klky představuje fetální část placenty. Její povrch je hladký a je pokryt amniovým epitelem, pod nímž prosvítají větvící se cévy (Balko, 2017; Kapeller, 2001).

2.2.1 Maternální (mateřská) část

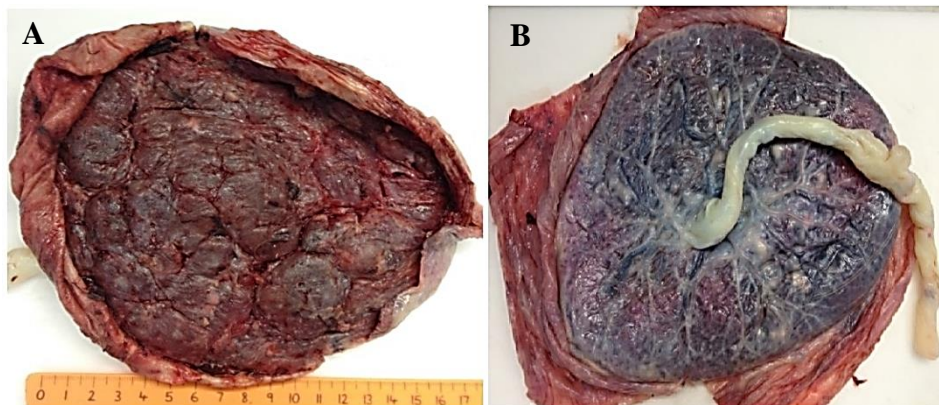
Maternální část je složena z děložních žlázek a deciduálních buněk. Decidua basalis je podkladem pro deciduální plotnu. Z deciduální plotny rostou ve směru k fetální části placentární septa pokrytá trofoblastem. Septa neprorostou celou tloušťkou placenty a neoddělí tak zcela kmenové klky. Tím se placenta rozdělí na laloky, tzv. kotyledony (Balko, 2017).

2.2.2 Fetální (plodová) část

Povrch fetální části placenty pokrývá jednovrstevný plochý až kubický amniový epitel. Pod touto vrstvou prosvítá pletěň větvících se pupečnickových cév. Vlastní choriová plotna je tvořena řídkým vazivem pocházejícím z extraembryonálního mezenchymu. Z choriové plotny odstupují choriové klky, které směřují k bazální deciduy. Jednak jde o klky kmenové zasahující až k bazální deciduy, do níž jsou zakotveny (kotvící klky), a jednak klky volné. Choriové klky během gravidity maturují, bohatě se větví a rozdělují tak intervilózní prostor v labyrint komunikujících štěrbin, kterými protéká maternální krev (Balko, 2017).

Choriové klky se skládají z vazivového stromatu, v němž probíhají větve fetálních cév, a vnější vrstvy trofoblastu. Povrch choriového klku je kryt syncytiotrofoblastem, který během vývoje fokálně proliferuje v pupenovitě vyrůstky (tzv. syncytiální uzly). Pod syncytiotrofoblastem se v prvních měsících těhotenství nachází souvislá vrstva buněk cytotrofoblastu, zvaných Langhansovy buňky. Stroma choriového klku je tvořeno rosolovitým vazivem s četnými kolagenními vlákny, fibroblasty, myofibroblasty a makrofágy (tzv. Hofbauerovými buňkami). Hofbauerovy buňky se podílejí na řízení lokálních imunitních reakcí (např. obraně proti přenosu infekce z matky na plod). Podporují vaskularizaci choriového klku a pravděpodobně se účastní i složitěho procesu imunitní tolerance matky a plodu (Balko, 2017).

Obrázek 1 A: Maternální povrch placenty rozdělený v kotyledony. B: Fetální povrch placenty s plodovými obaly a pupečníkem.



Zdroj: M. Dubová, Š. Hadravská – Šiklův ústav patologie FN Plzeň

2.3 Funkce placenty

Placenta je prostředníkem mezi matkou a plodem. Slouží k přísunu živin a odvádění katabolitů, výměně oxidu uhličitého za kyslík, dále má endokrinní a imunitní funkci (Trojan, 2003). Krevní plyny procházejí placentární bariérou pomocí difuze. Dále jsou z krve matky transportovány např. vitamíny, ionty, aminokyseliny, ale např. i některé léky. Naopak proteiny placentární bariérou neprocházejí, s výjimkou imunoglobulinů IgG, které v prvních měsících po narození utvářejí pasivní imunitu dítěte (Hájek, 2014).

Placenta produkuje také řadu enzymů a hormonů důležitých pro správný průběh těhotenství. Hormony jsou vyplavovány do krevního oběhu matky. Jedním z nich je humánní choriový gonadotropin (hCG) produkovaný trofoblastem. Nejvyšší koncentrace dosahuje mezi 8. a 11. týdnem těhotenství a svým působením zabraňuje zániku žlutého tělíska. Žluté tělísko produkuje progesteron, jehož funkce je zásadní pro udržení těhotenství, až do konce prvního trimestru. Posléze tvorbu tohoto hormonu přebírá právě placenta. Na produkci některých hormonů se podílí i plod a spolu s placentou jsou proto považovány za funkční fetoplacentární jednotku. Jedná se například o tvorbu estrogenů (Hájek, 2014).

2.4 Placentární bariéra

Je důležité, aby v placentě nedocházelo k mísení maternální a fetální krve. Mateřská krev tak pouze omývá choriové klky, které obsahují vlastní

bohatou cévní sítí. Lidská placenta je proto hemochoriální. Na této bariéře se podílí endotel vlásečnic, bazální membrána vlásečnic, vazivo choriových klků, bazální membrána trofoblastu, cytotrofoblast a syncytiotrofoblast. V závěru těhotenství dochází ke splynutí bazálních membrán trofoblastu a endotelu vlásečnic, aby se usnadnila výměna živin a dýchacích plynů (Balko, 2017).

2.5 Cirkulace krve v placentě

Cirkulace krve v placentě je v případě mateřské krve otevřená a v případě plodové krve naopak uzavřená. V intervilózním prostoru se nachází přibližně 150–170 ml krve a toto množství se vymění 3–4x za minutu (Balko, 2017).

Spirální artérie dělohy procházejí skrze bazální plotnu v mateřské části placenty. V artériích je okysličená krev matky tlakem vytlačována do intervilózního prostoru (*spatium intervillosum*), kde obtéká choriové klky a kyslík je prostou difuzí transportován přes syncytioendotelové membrány do krevního řečiště plodu. Okysličená krev se pomocí vlásečnic v choriových klcích dostává do choriové plotny plodové části placenty a pupečnickovou žílou (*vena umbilicalis*) putuje směrem k plodu. Odkysličená krev odtéká párovou pupečnickovou tepnou (*arteria umbilicalis*) směrem k placentě do cév choriových klků a oxid uhličitý opět přechází difuzí do intervilózních prostor (do mateřské krve). Mateřská krev chudá na kyslík se následně vrací zpět do bazální plotny (Kapeller, 1996).

2.6 Pupečník

Pupečník je provazec o délce přibližně 50 až 60 cm a průměru 1,5 cm. Vzniká sloučením trofoblastu s embryoblastem a spojuje plod s placentou. Pokryt je jednou vrstvou amniových buněk. Uvnitř pupečníku jsou uloženy umbilikální cévy – 2 artérie a 1 vena. Cévy jsou obklopeny Whartonovým rosolem vzniklým z embryonálního mezodermu. Pupečnickové cévy rostou nepravidelně a tím se vytváří charakteristické spirálovité stočení pupečníku, které zabraňuje poruchám cirkulace při ohybu nebo napnutí pupečníku (Binder, 2011).

3 Malperfúzní syndromy

Placenta je jakýmsi zprostředkovatelem při výměně živin a odpadních produktů mezi maternálním a fetálním oběhem. Aby tato výměna probíhala efektivně, je zapotřebí dobré funkce mateřského i fetálního krevního řečiště. Strukturální (ale i některé funkční) změny na úrovni mateřské nebo fetální cirkulace mohou vyústit v tzv. placentární malperfúzi. Malperfúzní syndromy lze rozdělit na maternální (MVM), při nichž je postižen přívod mateřské krve do placenty, a fetální (FVM), kdy dochází k poškození oběhu plodu (Redline, 2015).

3.1 Choroby vedoucí k MVM

3.1.1 Preeklampsie

Ke vzniku mateřské vaskulární malperfúze může vést preeklampsie. Jedná se o klinický syndrom projevující se v průběhu gravidity hypertenzí a proteinurií. Preeklampsii lze rozdělit na dvě formy, a to na časnou, vznikající před 34. týdnem těhotenstvím, a pozdní, nastávající po 34. týdnu. Časná forma má závažnější projevy, zvyšuje riziko růstové restrikce či úmrtí plodu. Hypertenzi vyvolává periferní vazokonstrikce, hodnota krevního tlaku je vyšší než 140/90 mm Hg. Proteinurie je způsobena zmožutněním endoteliálních buněk v glomerulech, což vede ke snížení glomerulární filtrace. Proteinurie je vyšší než 0,3 g/24 hodin. Etiologie preeklampsie není zcela objasněna, na její vznik mohou mít vliv některé faktory jako například genetický profil, věk matky, obezita či nemoci matky (např. diabetes mellitus nebo nemoci ledvin). Zajímavostí je, že většina studií poukazuje na fakt, že kouření cigaret je protektivním faktorem, tzn. snižuje riziko vzniku preeklampsie. Přítomnost preeklampsie při prvním těhotenství představuje zvýšené riziko opakování komplikací během dalších gravidit. Komplikací preeklampsie je eklampsie, kdy se k výše uvedeným příznakům přidávají křeče. V patogenezi preeklampsie se uplatňuje generalizovaná vasokonstrikce a změny v působení prostaglandinů. V důsledku těchto změn nedochází ke správné remodelaci spirálních arterií, což vyúští v placentární malperfúzi (Greiffeneggová, 2017; Parks, 2014; Baergen, 2011).

3.1.2 Hypertenze

Arteriální hypertenze zhruba v 8 až 10 % komplikuje průběh těhotenství. Světová zdravotnická organizace definuje hypertenzi v těhotenství jako vzestup systolického krevního tlaku na hodnoty 140 mm Hg a více, nebo diastolického tlaku na 90 mm Hg a více, případně zvýšení krevního tlaku o 25/15 mm Hg v porovnání s výsledky před počátkem gravidity nebo v 1. trimestru. Existuje několik typů arteriální hypertenze komplikující těhotenství. Preexistující hypertenzi charakterizuje přítomnost hypertenze již před vlastním těhotenstvím či její vznik před 20. týdnem gestace. Gestační hypertenze vzniká po 20. týdnu gestace, přičemž by se krevní tlak měl normalizovat zhruba do 40. dne po porodu. Preexistující hypertenze s nasedající hypertenzí je kombinací obou výše zmíněných druhů, tedy již zvýšené hodnoty krevního tlaku se v průběhu gravidity ještě zvyšují (Roztočil, 2017).

3.1.3 HELLP syndrom

HELLP syndrom je vzácné, ale velmi závažné onemocnění komplikující průběh gravidity a ohrožující život plodu i matky. Název je odvozen z anglických slov „Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets“ – hemolýza, zvýšené hodnoty jaterních enzymů, snížený počet trombocytů, což jsou typické laboratorní nálezy při této chorobě. Stejně jako v případě preeklampsie se objevuje hypertenze, proteinurie a otoky. Závažnost nemoci tkví i v tom, že rozvoj příznaků někdy nastává až v pokročilé fázi choroby, což komplikuje včasnou diagnostiku. Syndrom postihuje celou řadu orgánů matky. Objevují se kardiopulmonální a koagulační komplikace, postižení jater a ledvin, nebo abrupce placenty. Někteří kliničtí lékaři považují HELLP syndrom za těžkou formu preeklampsie, jiní za samostatný stav (Kascak, 2017; Roztočil, 2017).

3.1.4 Diabetes mellitus

Hyperglykémie je projevem diabetu mellitu (DM). Jedná se o následek nedostatečné sekrece inzulínu pankreatem (DM I. typu) nebo periferní inzulínové rezistence (DM II. typu). Chronická hyperglykémie je příčinou strukturální a funkční poruchy cílových orgánů, těmi jsou např. cévy v oku, ledvinách, mozku a srdci. Gestační diabetes mellitus je poprvé

diagnostikován během gravidity. Pro matku je rizikem vyplývajícím z diabetu vznik preeklampsie, polyhydramnia, hypertenze a možný vznik komplikací při porodu. V těžkém případě může nastat intrauterinní úmrtí plodu. Druhým typem diabetu komplikujícím graviditu je preexistující diabetes mellitus, kdy je hladina glykémie zvýšena ještě před počátkem gravidity. Rizika pro matku jsou podobná, ale existuje mnohonásobně vyšší riziko vzniku vrozených vývojových vad u plodu (Hájek, 2014; Scifres, 2016).

3.1.5 Autoimunitní choroby

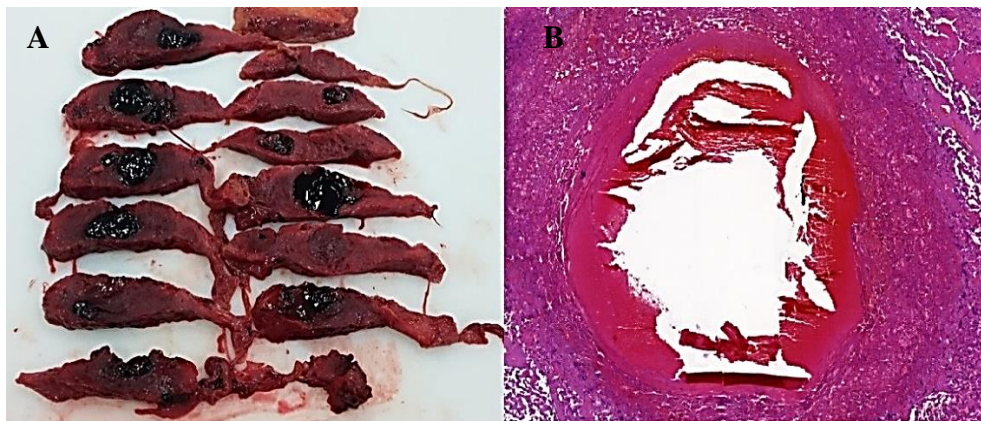
Průběh gravidity mohou komplikovat i autoimunitní choroby matky. Jedná se o heterogenní skupinu chorob, pro které je charakteristická tvorba autoprotilátek proti různým buňkám a tkáním vlastního organismu. Tyto choroby mohou vést k poškození různých orgánů, v těžkých případech mohou ohrožovat i život pacienta. Jednou z těchto chorob je systémový lupus erythematoses. Klinicky se může projevovat artritidou velkých i malých kloubů, fotosenzitivitou, typickou vyrážkou na obličejí, glomerulonefritidou, polyserositidou či poruchami krve tvorby. Laboratorními metodami lze u pacientů prokázat přítomnost antinukleárních autoprotilátek (ANA) a autoprotilátek proti dvouvláknové DNA (dsDNA), trombocytopenii či proteinurii. Těhotné matce hrozí spontánní potrat, předčasný porod či nitroděložní odúmrť plodu. Dalším onemocněním, které nepříznivě ovlivňuje průběh gravidity, je antifosfolipidový syndrom, který může být primární anebo může provázet jiné autoimunitní choroby (např. systémový lupus erythematoses). Syndrom se projevuje recidivujícími arteriálními i venózními trombózami. Laboratorně lze prokázat přítomnost antifosfolipidových protilátek (APA). Toto onemocnění může být příčinou placentární malfunkce, která může způsobit intrauterinní růstovou retardaci plodu či jeho potrat (Hájek, 2014; Baergen, 2011).

3.2 Změny v placentě u MVM

Maternální vaskulární malperfúze se v placentě může projevit makroskopickými i mikroskopickými změnami. Mezi makroskopické změny placenty patří její **nízká hmotnost** a **tenký pupečník**. Placenta je hypoplastická, její hmotnost je nižší než 10. percentil hmotnostní křivky pro

dané gestační stáří a průměr pupečníku je menší než 8 mm. Dalším možným nálezem je přítomnost **infarktů**, lokalizovaných především v bazální části placenty (Khong, 2016). Jedná se o ischemickou nekrózu tkáně, kterou způsobuje přerušení přívodu okysličené krve, přičemž dochází ke ztrátě funkce postižené tkáně (Mačák, 2012). Mikroskopicky lze rozlišit i stáří jednotlivých infarktů. V případě, že dochází ke krvácení do nekrotické tkáně, jedná se o **infarkt-hematom** (Khong, 2016). Infarkty se mohou vyskytovat i ve fyziologických placentách. Pokud jsou solitární, malé a lokalizované převážně v okraji placenty, nelze je považovat za projev MVM (Redline, 2015). Makroskopickým nálezem může být i **retroplacentární hematom**, který je morfoloickým korelátorem klinické diagnózy abrupce placenty (Khong, 2016). Abrupce placenty je definována jako předčasné centrální odlučování placenty od děložní stěny. V tomto prostoru se následně shromažďuje krev a vytváří se retroplacentární hematom (Binder, 2011).

Obrázek 2 A: Infarkty a infarkt-hematomy placenty. B: Mikroskopický obraz infarkt-hematomu.

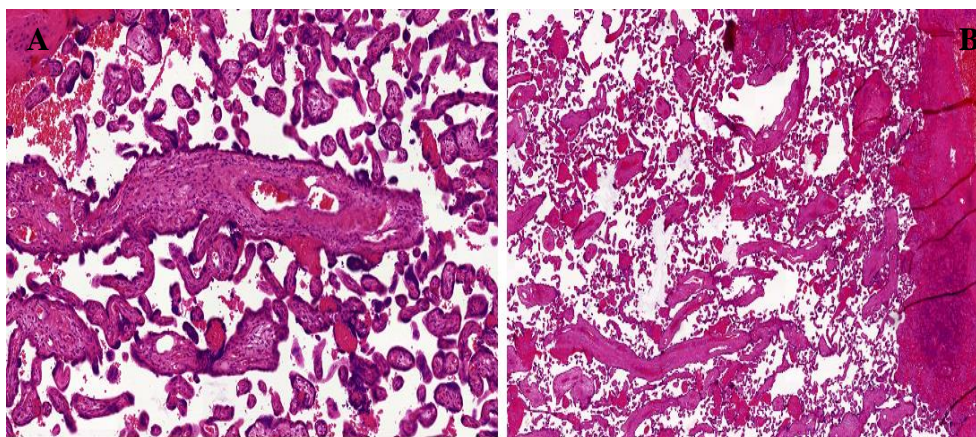


Zdroj: M. Dubová, Š. Hadravská – Šiklův ústav patologie FN Plzeň

Mezi mikroskopické změny provázející MVM patří abnormální vývoj choriových klků. Prvním případem je **distální vilózní hypoplazie (DVH)**. Klky jsou tenké a protáhlé, objevuje se větší množství syncytiálních uzlů. DVH se častěji vyskytuje do 32. týdne gestace. Druhým případem je **akcelerovaná zralost klků**. Přítomny jsou malé nebo krátké klky, jejichž zralost neodpovídá gestačnímu stáří, klky jsou vyzrálější. U toho stavu často

nacházíme **zvýšené množství syncytiálních uzlů**, v některých případech může být přítomno i zmnožení intervilózního fibrinu. K mikroskopickým nálezům se řadí i **deciduální arteriopatie**. Jde o patologické změny spirálních artérií v bazální i parietální deciduy. Dalšími ne zcela přesně definovanými mikroskopickými změnami v placentách postižených MVM jsou **zmnožené ostrůvky extravilózního trofoblastu, placentární pseudocysty, pseudocysty v chorion laeve i laminární nekrózy deciduy plodových obalů** (Khong, 2016).

Obrázek 3 A: Akcelerovaná zralost choriových klků, zmnožení syncytiálních uzlů (33. týden). B: Distální vilózní hypoplazie (DVH) (32. týden).



Zdroj: M. Dubová, Š. Hadravská – Šiklův ústav patologie FN Plzeň

3.3 Choroby vedoucí k FVM

3.3.1 Patologické stavy pupečníku

Mezi nejčastější patologické stavy pupečníku, které mohou vést k FVM, patří jeho abnormální vinutí, obtočení kolem různých částí těla plodu či vznik pravého uzlu.

Běžný počet otáček pupečníku je přibližně 1 otáčka na 5 cm délky pupečníku (dle indexu UCI 0,20–0,24 otáček na centimetr). Nižší počet otáček pupečníku, méně než 0,07 otáček na 1 cm délky, je statisticky častěji pozorován u předčasně porozených či potracených plodů. U novorozenců byla popsána horší poporodní adaptace (snížené Apgar skóre) i jejich pomalejší růst. Vyšší počet otáček pupečníku, více než 0,3 otáčky na 1 cm

délky, může být asociován s růstovou restrikcí plodu i jeho intrauterinním odumřením (D'Addario, 2015; Gibbs, 2008).

Obrázek 4 Výrazné vinutí pupečníku (> 3 otáčky/10 cm délky pupečníku).



Zdroj: M. Dubová, Š. Hadravská – Šiklův ústav patologie FN Plzeň

Obtočení pupečníku kolem části těla plodu je možné nalézt u 20 až 30 % porodů. Nejvíce vídané je obtočení kolem krku, dále se objevuje obtočení kolem horních a dolních končetin a trupu. Ke snížení krevního průtoku nedojde, pakliže je pupečník obtočen kolem části těla volně. Během porodu se však může klička utáhnout, cévní průtok se sníží, což může vést k hypoxii až anoxii plodu. Vznik tzv. pravého uzlu na pupečníku má na svědomí nitroděložní odumření plodu bez ohledu na jeho gestační stáří (Hájek, 2014).

3.3.2 Hyperkoagulační stavy plodu

Jde převážně o vrozené trombofilní stavy, méně často např. o prolongovanou polycytémii. Trombofilie (hyperkoagulační stav) je stav, při kterém je rovnováha hemostatických mechanismů vychýlena směrem ke vzniku krevních sraženin (trombů). Vrozená trombofilie je způsobována defektem koagulačních faktorů. Nejčastěji se vyskytuje Leidenská mutace, což je bodová mutace v genu, který kóduje

V. koagulační faktor, a dochází tak ke snížení schopnosti brzdit koagulační proces (Navrátil, 2017).

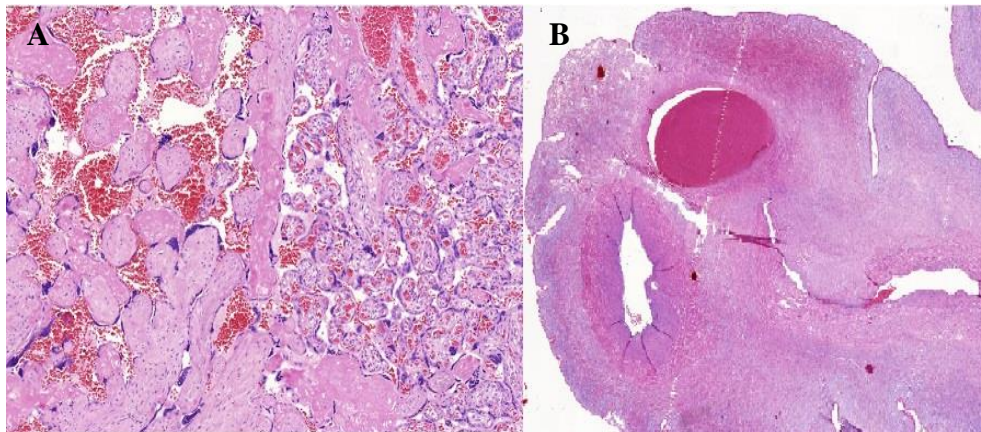
3.3.3 Srdeční selhávání plodu

Příčinou srdečního selhávání plodu mohou být například vrozené vývojové vady srdce (VCC – vitium cordis congenitum). Jedná se o vrozené anomálie srdce a velkých cév vzniklé neúplným dokončením vývoje či jejich chybným vývojem. Příčinou vzniku mohou být genetické faktory (viz např. asociace Downova syndromu s VCC), ale i choroby matky (diabetes mellitus), některá virová onemocnění (např. rubeola), užívání léků či alkoholu během gravidity. Nejrizikovějším obdobím pro vznik VCC je 5.–12. týden gravidity. VCC mohou být diagnostikovány již prenatálně pomocí fetální echokardiografie. Nález VCC u plodu je často důvodem k umělému ukončení gravidity (Navrátil, 2017).

3.4 Změny v placentě u FVM

Ve fetálních tepnách či žilách se mohou objevovat **trombózy**, které cévy uzavírají (Redline, 2015). V těžkých případech FVM mohou být tyto tromby viditelné pouhým okem. Tromby vznikají postupně a lze je nalézt v cévách pupečníku, choriové plotny i kmenových klků. Další mikroskopickou změnou jsou **avaskulární choriové klky**, kdy dochází k úplné ztrátě krevních cév a objevuje se fibróza stromatu postižených klků. Také může docházet k ukládání **intramurálního fibrinu** ve stěnách velkých cév. Fibrinová či fibrinoidová depozita jsou uložena subendoteliálně nebo intramuskulárně, přičemž v těchto místech může docházet ke kalcifikaci. Dalším znakem FVM je **rozpad fetálních krevních elementů** v choriových klcích (tzv. stromo–vaskulární karyorrhexe). Posledním mikroskopickým znakem je **vaskulární ektázie**, která je definována jako výrazné rozšíření choriálních cév (cévy dosahují 4x většího průměru než okolní cévy stejného kalibru) (Khong, 2016).

Obrázek 5 A: FVM: vlevo avaskulární choriové klky, vpravo choriové klky s normální vaskularizací B: Trombóza jedné umbilikální artérie.



Zdroj: M. Dubová, Š. Hadravská – Šiklův ústav patologie FN Plzeň

4 Význam malperfúzních syndromů pro matku a plod

4.1 Hypoxie

Hypoxie je definována jako nedostatek kyslíku v těle. Tento stav výrazně narušuje látkovou výměnu a zisk energie a může vést k těžkému postižení funkce tkání a orgánů. Intrauterinní hypoxie je závažná komplikace gravidity, která může způsobit narušení vývoje plodu i jeho perinatální úmrtí. Chronická hypoxie se obvykle vyvíjí postupně a plod se na ni může do jisté míry adaptovat. I přesto však ve většině případů tento stav vede k patologickým změnám, zejména intrauterinní růstové retardaci (IUGR). Znamky chronické hypoxie lze v placentě postižených plodů prokázat mikroskopicky. Naproti tomu akutní hypoxie je stav vznikající náhle a adaptace na tuto situaci často není možná (Hájek, 2014; Stanek, 2013; Binder, 2011).

Chronická hypoxie bývá často následkem nefunkčnosti částí placenty (způsobené např. infarkty), příčinou akutní hypoxie může být vznik pravého uzlu pupečníku, trombóza pupečnickových cév či abrupce placenty (Hájek, 2014; Stanek, 2013; Binder, 2011).

4.2 Porodní hmotnost

Fetální i maternální vaskulární malperfúze může ovlivňovat porodní hmotnost plodu. V důsledku chronické hypoxie, která je častým projevem malperfúzních placentárních syndromů, mohou plody trpět intrauterinní růstovou retardací (IUGR). Výsledkem může být hypotrofie novorozence, tzn. porodní hmotnost pod 10. percentilem pro dané gestační stáří (Leontovychová, 2018; Sedlářová, 2008; Kameníková, 2003).

Kromě nízké porodní hmotnosti může být narušena i poporodní adaptace plodu. Novorozenec může trpět hypoxií, hyperglykemií, poruchami termoregulace či být náchylnější k infekcím. Nízká porodní hmotnost může přispívat i k rozvoji dalších onemocnění nejen v dětském věku, ale i v dospělosti. Podle některých studií existuje asociace mezi nízkou porodní hmotností a rozvojem kardiovaskulárních onemocnění, hypertenze

nebo nefropatií během života jedince (Leontovyčová, 2018; Sedlářová, 2008; Kameníková, 2003).

4.3 Předčasný porod

Světová zdravotnická organizace definuje předčasný porod jako těhotenství ukončené v období kratším než ukončený 37. týden. Prenatální péče je důležitou součástí prevence předčasného porodu, neboť umožňuje odhalit rizikové faktory s ním spojené, jako je preeklampsie, diabetes mellitus, hypertenze – ať už preexistující nebo vzniklé během těhotenství – či životní styl. Pro novorozence jde o život ohrožující situaci, protože ještě není plně vyvinut. Riziko vzniku perinatálních komplikací je nepřímo úměrné gestačnímu stáří plodu. Čím vyšší je gestační stáří předčasně porozeného plodu, tím menší je riziko vzniku komplikací. Velmi nedonošení novorozenci mohou být postiženi jak akutními, tak chronickými orgánovými projevy, kterými mohou být syndrom dechové tísně, apnoe, retinopatie, bradykardie a neurologická postižení. V současnosti je považován za hranici životaschopnosti plodu 24. týden gestace (Roztočil, 2017; Muntau, 2014; Leifer, 2004).

4.4 Nitroděložní odumření plodu

Riziko nitroděložního odumření plodu klesá se zvyšujícím se gestačním stářím. I přesto však některé (obvykle náhle vzniklé) stavy mohou vést intrauterinní smrti plodu. Příčinami mohou být těžká preeklampsie, HELLP syndrom, abrupce placenty či akutní pupečnickové příhody (např. trombóza pupečnickové žíly či strangulace pupečnickových cév) (Čech, 2006).

5 Imunohistochemie

K rozpoznání tkáňových antigenů se využívá imunohistochemické barvení (IHC). Za pomoci specifické interakce antigenu s označenou protilátkou se vizualizuje komplex antigen–protilátka. Každý antigen na svém povrchu obsahuje antigenní determinanty tzv. epitopy, které jsou vazebnými místy pro protilátku. IHC metody, sloužící k průkazu specifických markerů, mají dnes v diagnostice nezastupitelnou roli (Čížková, 2018).

Imunohistochemie nebývá běžnou součástí morfologického vyšetření placenty, využívána je např. k diagnostice chronických idiopatických zánětů či průkazu některých infekčních agens. V případě placentárních malperfúzí je její využití prozatím na úrovni experimentální. Nelze však vyloučit, že nové poznatky o specifických antigenech povedou k tomu, že se tato metoda stane součástí rutinní praxe (Redline, 2015).

5.1 Odběr materiálu

Odběr materiálu z živé tkáně se nazývá biopsie a odběr z mrtvého organismu nekropsie. Samotná technika odběru se uzpůsobuje dané situaci. Odběr bioptického vzorku je prováděn různými způsoby (excizí, punkcí, kyretáží, resekcí různě velké části postižené tkáně či orgánu). V případě placenty je k vyšetření zasílán celý placentární disk s plodovými obaly a částí pupečnicku. Vzorky je nutné okamžitě fixovat obvykle ve 4% roztoku formaldehydu, aby nedošlo k jejich autolýze (Čížková, 2018; Jirkovská, 2006).

5.1.1 Zpracování placenty

Před samotným odběrem vzorků z placenty se nejprve zhodnotí její celkový stav. Popis placenty je velmi důležitý, protože některé patologické stavy je možné definovat pouze makroskopicky. Základní makroskopický popis zahrnuje rozměry a hmotnost placentárního disku, popis pupečnicku (délka, průměr, místo inserce, popis vinutí), plodových obalů (barva, celistvost) a ložiskových změn v parenchymu placenty (Baergen, 2011; Kaplan, 2007).

Podle současných doporučení by z placenty měly být pro histologické vyšetření odebrány minimálně tři řezy z placentárního disku, dva řezy z pupečníku, jeden řez ze srolovaných plodových obalů a dále řezy obsahující makroskopicky viditelné ložiskové změny. V praxi je však často zvykem odebírat více vzorků i z placent bez makroskopických změn (Khong, 2016).

5.2 IHC metody

Rozlišují se 3 typy metod průkazu antigenu. Nejjednodušší je přímá metoda, kdy primární protilátka na sobě rovnou nese značku (enzymatickou, fluorescenční). Nepřímá dvoustupňová metoda využívá značení až sekundární protilátky, která nasedá na primární protilátku. U nepřímé trojstupňové metody se na neoznačenou primární a sekundární protilátku váže značený komplex (streptavidin). Typem trojstupňové metody je i metoda avidin–biotin komplex, při níž se používá biotinylovaná sekundární protilátka (Čížková, 2018).

5.3 Výroba preparátu

Odebraný materiál je nutné nejdříve zfixovat, aby se zabránilo autolýze buněk a tkáň si zachovala strukturu a barvitelnost. Autolýze lze zabránit fyzikálními metodami, například využitím velmi nízkých teplot (takto fixovaný vzorek se do parafínu nezalévá), a chemickými postupy. Nejčastěji se jako fixační tekutina využívá formol v 10% koncentraci, tedy 4% roztok formaldehydu (Čížková, 2018; Jirkovská 2006).

Takto fixovaný vzorek musí být zalit vhodným zalévacím médiem, aby se mohl krájet. Zalévací média se rozlišují na média rozpustná a nerozpustná ve vodě. Médii rozpustnými ve vodě jsou některé pryskyřice a vosky. K zalévání médii nerozpustnými ve vodě se využívá například parafín. Před vlastním zalitím čistým parafínem je nutné nejprve odstranit fixační tekutinu ze vzorku, odvodnit ho a prosytit intermédiem (Čížková, 2018; Jirkovská 2006).

Po zchlazení parafínu vzniká tkáňový blok, který je možno krájet. Ke krájení se využívají přístroje zvané mikrotomy – rotační nebo sáňkové. Řezy o tloušťce přibližně 5 μm se přenesou na hladinu teplé destilované

vody, kde dojde k jejich napnutí, a posléze se přenesou na podložní sklo. Zmražené řezy se krájí v tzv. kryostatech, přičemž tato technika se využívá k peroperačním biopsiím a k průkazu tuků a enzymů (Čížková, 2018; Jirkovská 2006).

Aby bylo možné rozeznat jednotlivé tkáňové struktury, je nutné připravený tkáňový řez na podložním skle obarvit. Barviva se rozlišují podle různých hledisek, například dle jejich náboje na barviva bazická s kladným nábojem (hematoxylin), kyselá se záporným nábojem (eozin) a neutrální. Zvláštní skupinou jsou barviva fluorescenční, s jejichž pomocí lze sledovat například některé protilátky ve tkáních. Před barvením preparátu je nutné jeho odparafinování v lázních xylenu a následně se preparát barví dle specifického postupu pro jednotlivá barviva. Jakmile je preparát obarven, vytvoří se trvalý preparát zamontováním do montovacího média a přiložením krycího sklíčka (Čížková, 2018; Jirkovská 2006).

5.4 IHC barvení

Spojení antigenu s protilátkou je nutné vizualizovat pomocí enzymových (křenová peroxidáza) nebo fluorescenčních markerů (alkalická fosfatáza). Aby imunohistochemická detekce proběhla správně, musí být v tkáni zachovány epitopy. Nejvíce využívaným materiálem jsou tak vzorky fixované 4% formaldehydem zalité v parafínu s tloušťkou řezu 1–4 μm . Využitelné jsou i kryostatové řezy (Čížková, 2018).

Pro lokalizaci antigenů je nutné zpřístupnění epitopů protilátce. Odmaskování antigenu lze provést enzymaticky trávením (např. v pepsinu) nebo teplem. Využije-li se pro zviditelnění reakce enzymatické značení, musí se zablokovat aktivita endogenně se vyskytujících enzymů ve tkáni vysycením jeho enzymu substrátem. V případě křenové peroxidázy se zablokuje peroxidáza ve tkáni 5% peroxidem vodíku a zabrání se tak falešně pozitivnímu výsledku (Beranová, 2002; Čížková, 2018).

Po odblokování antigenů následuje inkubace v neimunním séru, při které se vysycuje tkáň bílkoviny. Dále se preparát nechá inkubovat v primární protilátce, po které následuje inkubace se spojovací protilátkou. Následně je třeba provést zviditelnění chromogenu a tím pádem i celé reakce speciálním činidlem. Preparát se ještě nechá zkontrastovat v 5% roztoku CuSO_4 ,

dobarví se Gillovým hematoxylinem a montuje se (Beranová, 2002; Čížková, 2018).

5.4.1 Antigen p53

Jaderný protein p53 je produktem tumor supresorového genu *TP53*. Tento protein patří mezi regulátory buněčného cyklu. Prostřednictvím svých cílových genů zprostředkovává adekvátní reakci buňky na nejrůznější typy stresu, jakými jsou poškození DNA, hypoxie či vliv nadměrné exprese některých onkogenů. Tento genový produkt je schopen zastavit buněčný cyklus v G1-fázi a indukovat mechanismy opravující DNA, popřípadě navodit apoptózu poškozených buněk a tím tyto z organismu eliminovat (Šmardová, 2014).

Protilátka proti antigenu p53 se využívá zejména k identifikaci exprese p53 v lidských novotvarech (Šmardová, 2014).

Zvýšená exprese p53 v placentách matek postižených preeklamsií se opírá o teorii recentní práce, jež předpokládá účast dysregulace apoptózy v patogenezi tohoto syndromu (Sharp, 2014).

PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL PRÁCE

Cílem práce je zjištění incidence a charakteristik fetální a maternální vaskulární malperfúze v placentách vyšetřených během roku 2017 v Šiklově ústavu patologie FN Plzeň.

7 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

- 1) Jaký byl celkový počet vyšetřených placent za jeden rok (rok 2017), jaké bylo průměrné gestační stáří plodů, jejichž placenty byly vyšetřeny?
- 2) Kolik placent pocházelo z vícečetných gravidit, kolik placent mrtvě porozených/potracených plodů bylo v tomto období vyšetřeno?
- 3) V kolika vyšetřených placentách byly přítomny známky malperfúze?
- 4) Které mateřské choroby byly asociovány s MVM a jaké stavy byly přítomny u plodů s FVM?
- 5) Jaká byla poporodní adaptace plodů, v jejichž placentách byly nalezeny známky malperfúze, a kolik plodů trpělo růstovou restrikcí?
- 6) Jaké bylo průměrné stáří matek, u nichž byly prokázány v placentě známky MVM?
- 7) V kolika případech koreluje klinická diagnóza MVM s morfológickou diagnózou?
- 8) V kolika případech nebyl v placentách matek s klinickou diagnózou preeklampsie přítomen žádný patologický nález? Lze v placentách bez morfológických známek MVM imunohistochemicky prokázat změny typické pro preeklampsii?

8 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Ze 413 placent vyšetřených na Šiklově ústavu patologie FN Plzeň za jeden rok (rok 2017) byla vybrána skupina placent splňující kritéria fetální či maternální vaskulární malperfúze. V nemocničním informačním systému byly vyhledány dostupné informace týkající se porodu a předporodního období a data byla následně porovnána s výsledky histologického vyšetření.

9 METODIKA PRÁCE

9.1 Výběr sledovaného souboru

Pomocí zadaných klíčových slov (placenta, 2017) byl z nemocničního informačního systému (WinMedicalc) nejprve vygenerován soubor laboratorních čísel, který odpovídal souboru všech placent vyšetřených v Šiklově ústavu patologie FN Plzeň během jednoho kalendářního roku. Podle laboratorních čísel byly v informačním systému vyhledány výsledky histologického vyšetření a klinická data související s porodem a předporodním obdobím. Šlo o následující údaje: věk matky v době porodu, počet předchozích porodů/potratů, chronické choroby matky a choroby komplikující graviditu, délka gravidity a stav plodu.

Po zhodnocení získaných dat byla ze souboru vybrána skupina placent, které jednoznačně splňovaly morfologická kritéria maternální a fetální vaskulární malperfúze (tj. placenty, ve kterých byly přítomny vícečetné infarkty, známky akcelerované zralosti choriových klků, zmnožení syncytiálních uzlů, distální vilózní hypoplázie, retroplacentární hematom, deciduální arteriopatie, trombózy v cévách choriových klků a choriové plotny a skupiny avaskulárních choriových klků). Histologické nálezy byly porovnány s klinickými údaji a výsledky byly statisticky zpracovány.

Dále byla z celého souboru vybrána skupina placent, které nevykazovaly žádné histologické známky maternální vaskulární malperfúze, ale klinicky byly u matek prokázány choroby, které mohou se vznikem malperfúze souviset (tj. hypertenze, preeklampsie, eklampsie, HELLP syndrom). Preparáty z těchto případů byly vyhledány v archivu a příslušné tkáňové bloky byly následně obarveny protilátkou proti antigenu p53. Dále byly z archivu vybrány vzorky z 5 placent s potvrzenou diagnózou maternální vaskulární malperfúze a 5 vzorků z placent pocházejících z fyziologických gravidit, ve kterých nebyly prokázány žádné patologické změny. Těchto 10 vzorků posloužilo jako kontroly.

9.2 Příprava preparátů k imunohistochemickému barvení

Všechny vybrané tkáňové bloky byly nejprve pomocí sáňkového mikrotomu nakrájeny na tenké řezy, které byly po přenesení na podložní sklo a odparafinování obarveny v barvicím automatu BenchMark ULTRA VENTANA od firmy Roche protilátkou proti antigenu p53 (Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein) od firmy Dako Denmark A/S (ředění 1:50).

Přístroj BenchMark ULTRA VENTANA je propojen s počítačem, který ovládá všechny programy prováděné tímto přístrojem. Pro jednotlivá barvení jsou zde naprogramovány speciální protokoly. Pracovní protokol používaný pro barvení protilátkou p53 je součástí Příloh (Příloha 2).

9.3 Mikroskopování

Imunohistochemické preparáty byly prohlédnuty pod světelným mikroskopem a byla vyhodnocena exprese antigenu p53 ve vilózním trofoblastu vyšetřovaných vzorků.

Za pozitivní výsledek byla považována jaderná exprese antigenu p53 v 5 a více buňkách vilózního trofoblastu terminálních choriových klků.

10 VÝSLEDKY

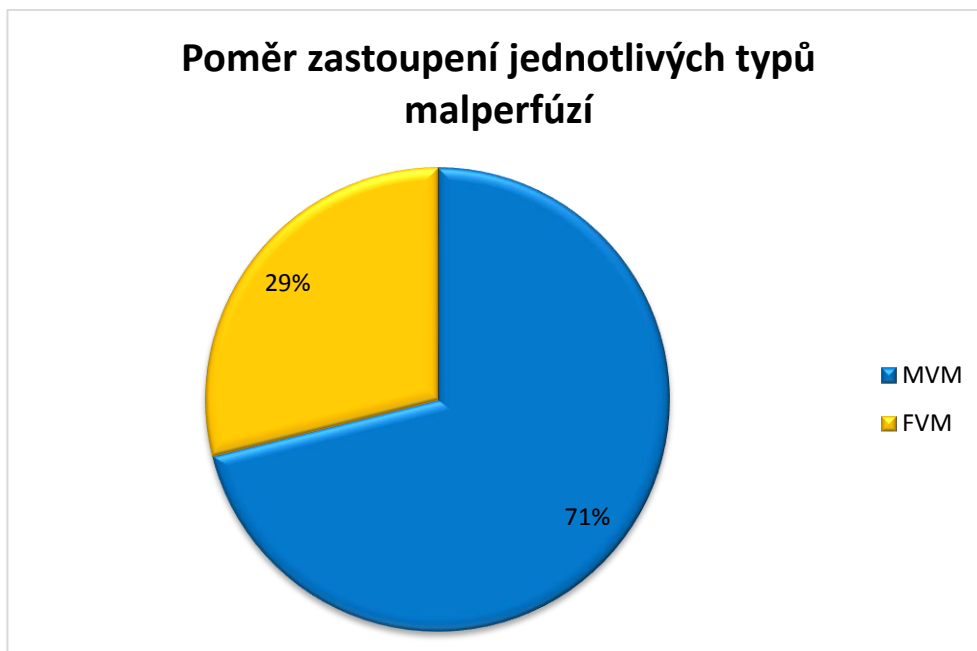
Během roku 2017 bylo vyšetřeno celkem 413 placent. Morfologické známky fetální a maternální vaskulární malperfúze byly přítomny ve 128 placentách (31 %). 91 případů (22 %) splňovalo morfologická kritéria maternální vaskulární malperfúze (MVM), ve 37 případech (9 %) byly prokázány známky fetální vaskulární malperfúze (FVM). MVM svou četností převažovala nad FVM. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 1. Graf 1 zobrazuje poměr zastoupení jednotlivých typů malperfúzí.

Tabulka 1 Vyhodnocení počtu placent, u nichž byly nalezeny morfologické známky malperfúze

Celkový počet vyšetřených placent		413
Malperfúze	Počet placent	Procenta [%]
MVM	91	22
FVM	37	9
Celkový počet placent vykazující známky malperfúze	128	31

Zdroj: vlastní

Graf 1 Poměr zastoupení jednotlivých typů malperfúzí



Zdroj: vlastní

V Tabulce 2 je zobrazeno porovnání gestačního stáří všech plodů, jejichž placenty byly vyšetřeny, s gestačním stářím plodů, u nichž se objevily

známky malperfúze. Aritmetický průměr gestačního stáří je v obou případech shodný – 34 týdnů.

Tabulka 2 Gestační stáří plodů

Gestační stáří plodů	Plody, jejichž placenty byly vyšetřeny [týdny]	Plody, jejichž placenty vykazovaly známky malperfúze [týdny]
Průměrné	34	34
Minimální	12	18
Maximální	42	41

Zdroj: vlastní

Tabulka 3 zobrazuje případy vícečetných gravidit ve vyšetřovaném souboru. V 31 případech se narodila dvojčata. V 1 případě se jednalo o dvojčata monochoriální – monoamniální s jednou společnou placentou. Společnou placentu mají i dvojčata monochoriální – biamniální, která se v souboru objevila 11krát. Bichoriální – biamniální dvojčata se dvěma placentami se vyskytla v 19 případech. V jednom případě pak byly vyšetřovány 2 placenty od bichoriálních – triamniálních trojčat. Celkový počet vyšetřených placent pocházejících z vícečetných gravidit je proto 52. Morfologické známky malperfúze byly u vícečetných gravidit nalezeny v 15 případech.

Tabulka 3 Počet vícečetných gravidit ve vyšetřovaném souboru

	Placenty	Celkový počet	Malperfúze
Dvojčata	mono – mono	1	1
	mono – bi	11	3
	bi – bi	19	10
Trojčata	bi – tri	1	1
Celkem		32	15

Zdroj: vlastní

V celkovém souboru bylo 20 placent, které patřily mrtvě porozeným či potraceným plodům. V 7 případech se jednalo o spontánní abortus, v 5 případech o porod mrtvého plodu a v 8 případech o indukovaný potrat. Indikací k umělému ukončení těhotenství byla výrazná růstová restrikce plodu, vrozená vývojová vada srdce, Downův syndrom, digynická

triploidie, mikroduplikace Xp11.22 a předčasný odtok plodové vody při chorioamnionitidě.

U 9 placent mrtvých plodů byly prokázány známky malperfúze.

Tabulka 4 Počet placent mrtvě porozených/potracených plodů.

Mrtvě porozené/potracené plody	Počet placent
Mrtvě porozené plody	5
Spontánní potrat	7
Indukovaný potrat	8
Celkový počet všech potratů	20

Zdroj: vlastní

U placent vykazujících známky malperfúze byla zjišťována poporodní adaptace plodů, tzv. Apgar skóre. Tento bodovací systém popisuje barvu kůže, srdeční činnost, dýchání, svalové napětí a reflexy novorozence v 1., 5. a 10. minutě po porodu a jeho maximální hodnota činí 10–10–10 bodů, přičemž každé z kritérií je hodnoceno 0 až 2 body. Skóre mezi 8–10 body je známkou fyziologické poporodní adaptace. Aritmetický průměr Apgar skóre u vybraných případů činil 8-8-9 bodů. Pouze v ojedinělých 5 případech bylo Apgar skóre v 1. minutě 6 či méně a k jeho úpravě na fyziologické hodnoty nedošlo ani do 10. minuty po porodu. U těchto novorozenců bylo nutné zahájit intenzivní péči včetně podpory životních funkcí.

Z uvedených výsledků vyplývá, že placentární malperfúze nemusí ve všech případech negativně ovlivňovat bezprostřední poporodní adaptaci plodu, v omezeném počtu případů však může způsobit závažný stav, který vyžaduje specializovanou intenzivní péči.

71 plodů trpělo růstovou restrikcí. Ve 41 případech byly v placentách těchto plodů prokázány známky malperfúze. Ve 14 případech byly přítomny známky FVM a v 27 případech známky MVM.

Morfologické známky maternální vaskulární malperfúze (MVM) byly prokázány v 91 placentách. Věk matek, v jejichž placentách byl přítomen obraz MVM, se pohyboval v rozmezí 18–51 let, aritmetický průměr činil 30 let. Nejčastěji postiženou skupinou matek byla věková skupina od 26 do

30 let. Procentuální zastoupení jednotlivých věkových skupin postižených MVM zobrazuje Graf 2.

Graf 2 Procentuální zastoupení věkových skupin matek, v jejichž placentách byly prokázány známky MVM.



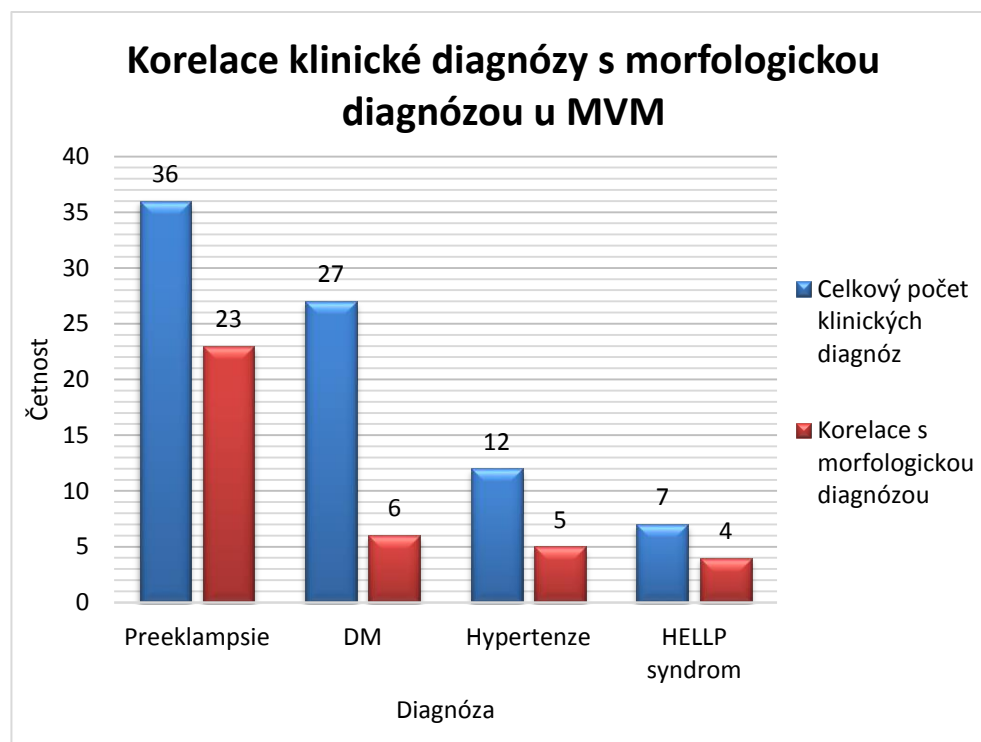
Zdroj: vlastní

Maternální vaskulární malperfúze (MVM) byla ve 23 případech asociována s preeklampsií (25 %), v 6 případech s diabetem (7 %), v 5 (5 %) případech byla klinicky prokázána hypertenze a ve 4 případech HELLP syndrom (4 %).

Známky FVM byly zjištěny ve 37 placentách. 14 plodů trpělo růstovou restrikcí (FGR) (38 %). Příčiny FVM byly objasněny ve 20 případech (54 %). V 7 případech se jednalo o abnormální vinutí pupečníku (19 %), v dalších 7 případech byla zjištěna abnormální inzerce pupečníku (marginální a velamentózní) (19 %), 2 případy byly asociovány s chronickými idiopatickými záněty (5 %), které destruovaly cévy choriových klků, u 2 plodů bylo prokázáno obtočení pupečníku kolem těla (5 %), v 1 případě byla popsána amniální plika pupečníku (3 %) a v 1 případě atrofie jedné umbilikální tepny (3 %).

Dalším úkolem bylo porovnání klinických a morfologických diagnóz. Nejprve byla v souboru všech placent vyhledána následující onemocnění – preeklampsie, diabetes mellitus, hypertenze a HELLP syndrom. Celkový počet jednotlivých chorob byl pak porovnán s počtem placent s prokázanou diagnózou MVM. Preeklampsie byla klinicky diagnostikována ve 36 případech, morfologicky však byla potvrzena pouze ve 23 případech. Diabetes mellitus kliničtí lékaři diagnostikovali u 27 matek, morfologické známky malperfúze byly prokázány v 6 případech. Hypertenzi trpělo 12 matek, v 5 případech tento nález korespondoval s morfologickou diagnózou. HELLP syndrom byl diagnostikován v 7 případech, ve 4 z nich byly v placentách zastíženy známky MVM.

Graf 3 Korelace klinické diagnózy s morfologickou diagnózou u placent postižených MVM



Zdroj: vlastní

Ve 13 případech klinicky potvrzené preeklampsie nebyly ve vyšetřených placentách prokázány žádné typické morfologické změny svědčící pro MVM. Vzorky z těchto placent byly vyhledány v archivu, nález byl zrevidován a vzorky byly následně obarveny protilátkou proti antigenu p53.

Při tomto vyšetření se vycházelo z výsledků recentní studie zabývající se výzkumem molekulárních změn v placentách matek trpících preeklampsií. Ze studie vyplývá, že v těchto placentách dochází k dysregulaci signální dráhy p53. Tato dysregulace, která je pravděpodobně způsobena hypoxicko–ischemickým poškozením buněk, vede ke zvýšené apoptóze buněk syncytiotrofoblastu a k uvolnění některých vazoaktivních a zánětlivých mediátorů do mateřského krevního oběhu. Působení těchto látek může v konečném důsledku vést ke generalizované vazokonstrikci, která je považována za hlavní etiopatogenetický faktor iniciující vznik symptomů typických pro preeklampsii.

Dysregulace signální dráhy p53 byla v této studii mimo jiné demonstrována zvýšenou expresí antigenu p53 v buňkách vilózního trofoblastu.

Na základě znalostí těchto literárních údajů byla vyslovena hypotéza, že exprese antigenu p53 by mohla být zvýšená i v případech, u kterých nebyly v placentě prokázány morfologické známky maternální vaskulární malperfúze.

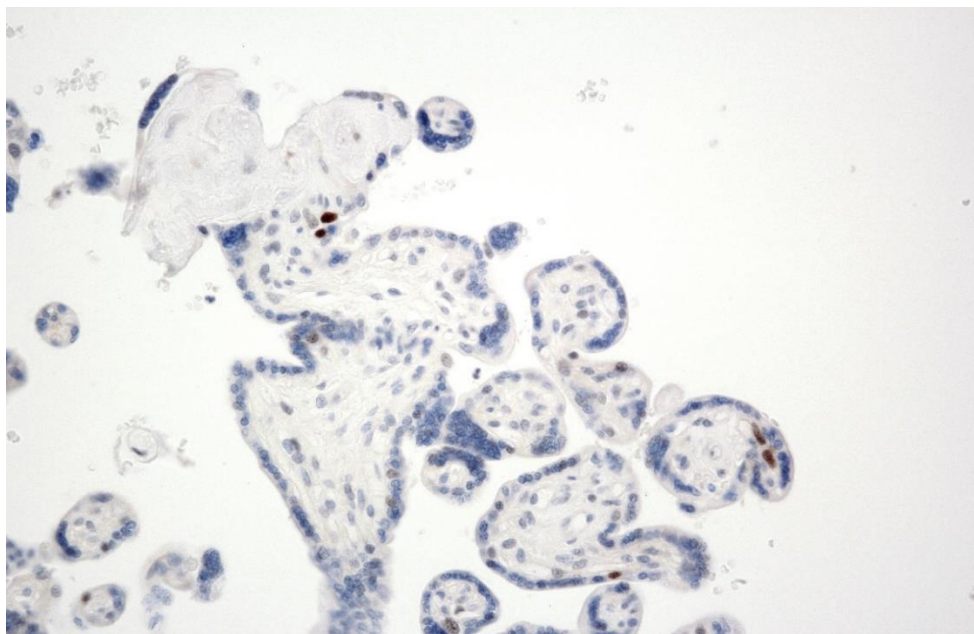
Výše popsaná série 13 vzorků byla doplněna o 5 placent s potvrzenými známkami maternální vaskulární malperfúze a dále o 5 placent pocházejících z fyziologických gravidit. Těchto 10 placent posloužilo jako vzorky kontrolní.

Za pozitivní výsledek barvení protilátkou proti antigenu p53 byla považována jaderná exprese v 5 a více buňkách vilózního trofoblastu. Všech 5 kontrolních vzorků placent se známkami maternální vaskulární malperfúze splňovalo kritéria positivity. Ve vzorcích z 5 fyziologických placent se vyskytovaly pouze zcela ojedinělé p53 pozitivní buňky. Tyto byly rozptýleny nejen ve vilózním trofoblastu ale i ve stromatu choriových klků.

Ve sledovaném souboru placent byla v 8 případech prokázána jaderná pozitivita antigenu p53 v 5 a více buňkách vilózního trofoblastu. 3 další případy vykazovaly rovněž zvýšenou expresí antigenu p53, ale nebylo dosaženo positivity v požadovaném počtu buněk (méně než 5 pozitivních buněk vilózního trofoblastu). 2 případy byly kompletně negativní

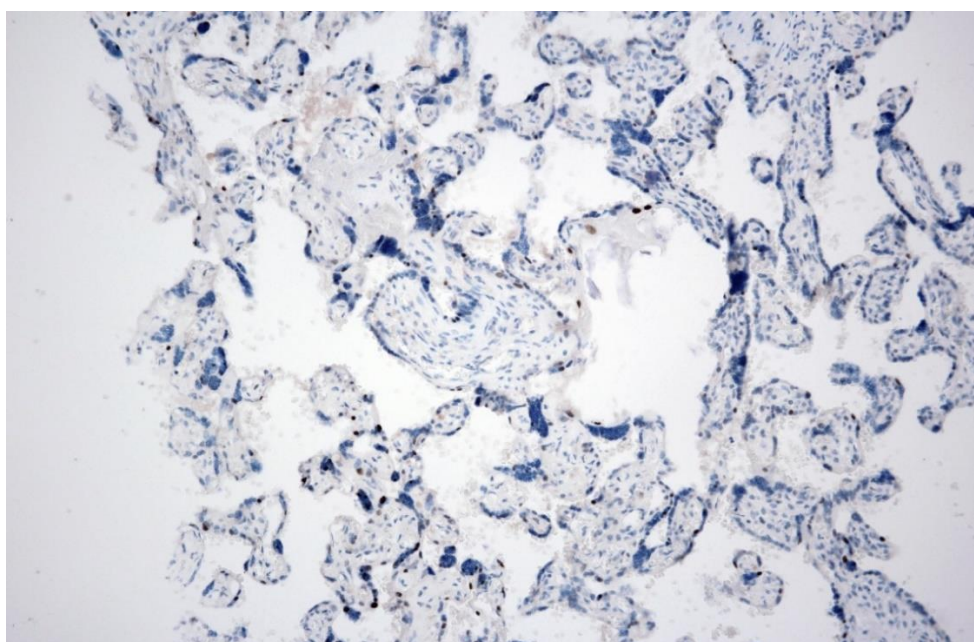
(při pozitivní vnější kontrole). V těchto případech však nelze jednoznačně vyloučit vliv autolýzy či technickou chybu při zpracování vzorku.

Obrázek 6 Placenta z fyziologické gravidity – fokální exprese p53 v buňkách stromatu a vilózního trofoblastu (zvětšeno 400x)



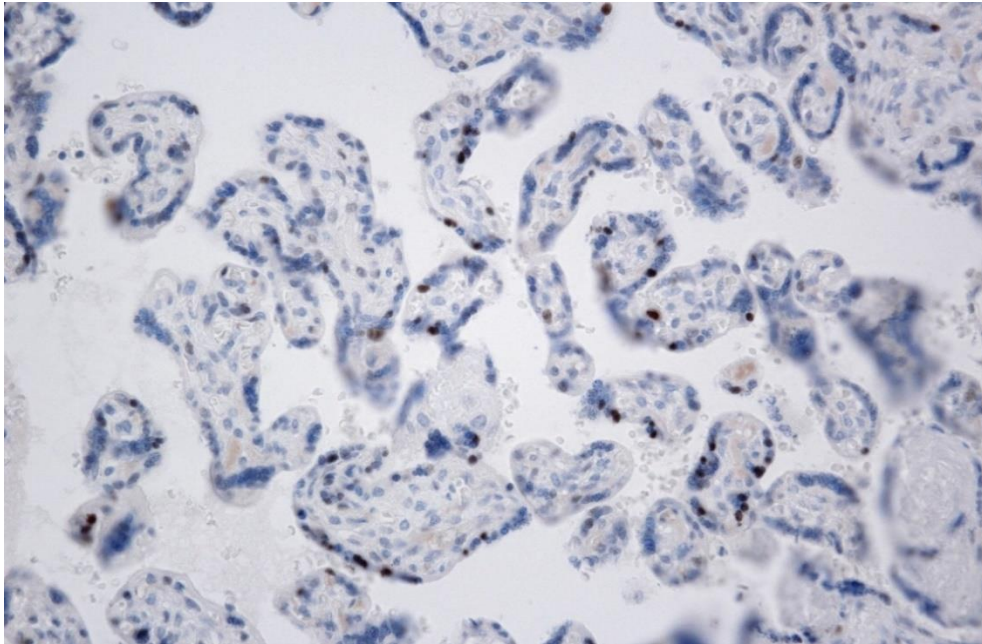
Zdroj: M. Dubová, Š. Hadravská – Šiklův ústav patologie FN Plzeň

Obrázek 7 MVM – zvýšená exprese p53 ve vilózním trofoblastu choriových klků, pozitivní buňky jsou hnědé (zvětšeno 200x)



Zdroj: M. Dubová, Š. Hadravská – Šiklův ústav patologie FN Plzeň

Obrázek 8 Placenta bez známek MVM – zvýšená exprese p53 ve vilózním trofoblastu (zvětšeno 400x)



Zdroj: M. Dubová, Š. Hadravská – Šiklův ústav patologie FN Plzeň

V souladu s literárními údaji byla v placentách se známkami maternální vaskulární malperfúze prokázána zvýšená exprese antigenu p53 ve vilózním trofoblastu. Navíc se podařilo prokázat, že exprese tohoto antigenu byla jednoznačně zvýšená i v nadpoloviční většině případů (62 %), které nevykazovaly morfologické známky malperfúze, ale klinicky byly u matek prokázány známky preeklampsie.

11 DISKUZE

Placenta je důležitým dočasným orgánem, jehož vývoj začíná záhy po oplodnění. Placenta zastává řadu funkcí, které jsou nezbytné pro správný vývoj plodu. Zajišťuje výměnu metabolitů a dýchacích plynů mezi maternální a fetální krví, funguje jako imunologická bariéra a v neposlední řadě je i zdrojem hormonů udržujících a podporujících graviditu. Patologické stavy placenty mohou zcela zásadním způsobem ovlivnit fyziologický průběh gravidity (Balko, 2017; Redline, 2015; Trojan, 2003).

Na základě tzv. Amsterdamské klasifikace jsou patologické změny placenty rozděleny do několika kategorií, a to na procesy zánětlivé, vaskulární a jiné (Redline, 2015).

Malperfúzní syndromy, řazené mezi patologické vaskulární procesy placenty, negativně ovlivňují cirkulaci krve v placentě a tím i její správnou funkci. Postižení uteroplacentární cirkulace vede k projevům tzv. maternální vaskulární malperfúze (MVM), postižení fetoplacentárního oběhu může vyústit v tzv. fetální vaskulární malperfúzi (FVM). Tyto stavy jsou velmi závažné a významně přispívají ke zvýšení fetální morbidity a mortality. Chronická hypoxie, předčasný porod či nitroděložní odumření plodu představují pouze stručný výčet komplikací, které mohou být s malperfúzními placentárními syndromy asociovány (Redline, 2015).

Ke vzniku placentární malperfúze může vést řada chorob či patologických stavů matky i plodu. Mezi nejčastější choroby vedoucí k maternální vaskulární malperfúzi patří preeklampsie, klinický syndrom definovaný přítomností edémů, proteinurie a hypertenze. Etiopatogeneze tohoto procesu je stále předmětem výzkumu (Greiffeneggová, 2017). Jednou ze současných teorií vývoje preeklampsie je dysregulace signální dráhy řízené tumor supresorovým genem *TP53*. Podle této teorie vede narušení buněčné signalizace ke zvýšené apoptóze buněk vilózního trofoblastu a k uvolnění zánětlivých a vazoaktivních látek do mateřského krevního oběhu. Tyto látky způsobí generalizovanou vazokonstrikci, na kterou tělo reaguje hemodynamicky i humorálně za vzniku typických projevů (Sharp, 2014).

Fetální vaskulární malperfúze (FVM) nejčastěji vzniká v souvislosti s patologickými stavy pupečníku (např. jeho nadměrným vinutím).

Morfologicky lze v placentách postižených malperfúzí prokázat řadu typických změn, z nichž některé mohou být viditelné pouhým okem, jiné pouze mikroskopicky (Redline, 2015).

Cílem bakalářské práce byla nejen sumarizace současných poznatků o placentární malperfúzi, ale především porovnání statistických výsledků získaných vlastním výzkumem s literárními údaji.

Do studovaného souboru bylo zařazeno 413 placent, které byly během jednoho kalendářního roku vyšetřeny na Šiklově ústavu patologie FN Plzeň. Jednalo se převážně o placenty živých plodů, pouze 15 případů zařazených do souboru patřilo potraceným plodům a 5 vzorků plodům mrtvě porozeným. Průměrné gestační stáří plodů, jejichž placenty byly vyšetřovány, bylo 34 týdnů.

Téměř jednu třetinu patologických změn (31 %) ve vyšetřovaném souboru představovaly nálezy splňující morfologická kritéria malperfúze. Toto zjištění je v souladu s literárními údaji, které tvrdí, že placentární vaskulární malperfúze je jednou z nejčastějších příčin placentární malfunkce. Znamky placentární vaskulární malperfúze byly prokázány jak v placentách živých, tak i v placentách mrtvých plodů, přičemž u 5 z těchto mrtvých plodů, lze placentární vaskulární malperfúzi (většinou FVM) považovat za jednoznačnou příčinu jejich smrti.

Ve sledovaném souboru převažovala MVM (71 %) nad FVM (29 %). Matky, v jejichž placentách byly prokázány známky MVM, trpěly preeklampií, diabetem či hypertenzí a u několika málo z nich byl diagnostikován i HELLP syndrom. Nejvíce postiženou věkovou skupinou byly matky mezi 26 a 30 lety (29 %).

Stavy, které se uplatňovaly v patogenezi FVM, byly reprezentovány v naprosté většině případů patologickými změnami pupečníku. Nejčastěji se jednalo o jeho nadměrné vinutí, abnormální inzerci, obtočení kolem těla plodu, přítomnost amniální pliky či absenci jedné umbilikální arterie (SUA). V malém počtu případů byla FVM asociována s chronickými idiopatickými záněty placenty, které destruovaly stroma choriových klků včetně fetálního

krevního řečiště. Spektrum těchto chorob a patologických změn plně odpovídá údajům známým z odborné literatury.

Placentární vaskulární malperfúze zodpovídala za 41 případů fetální růstové restrikce (FGR). U 14 plodů byly v placentách prokázány známky FVM, u zbylých 27 změny odpovídající MVM.

Vzhledem k vysokému zastoupení MVM ve vyšetřovaném souboru byla při statistickém vyhodnocování dat zaměřena pozornost především na tuto problematiku. Porovnáním klinických údajů s výsledky histologického vyšetření bylo zjištěno, že téměř u poloviny případů (49 %) klinicky potvrzených maternálních chorob, nebyl v placentě nalezen příslušný morfologický korelát. Hlavní roli ve vzniku takovéto výrazné diagnostické diskrepance pravděpodobně hraje čas, neboť některé klinické projevy mohou vzniknout velmi rychle a neočekávaně a typické morfologické změny se nestačí vyvinout.

Na základě znalostí výsledků recentní práce zabývající se molekulárně genetickými aspekty patogeneze preeklampsie byla vyslovena hypotéza, že i při absenci morfologických změn lze v placentách matek s klinickou diagnózou preeklampsie prokázat abnormální expresi některých antigenů. Ve 13 případech, které splňovaly tato kritéria, bylo provedeno dodatečné imunohistochemické vyšetření protilátkou proti antigenu p53, který je produktem tumor supresorového genu *TP53*. Tento gen fungující jako senzor poškození DNA je za normálních okolností inaktivní. Pokud dojde k poškození buňky, dochází k jeho aktivaci a tím k zastavení buněčného cyklu, důležitému k reparaci poškozených struktur. Pokud je toto poškození natolik závažné a reparace je neúspěšná, dojde k apoptóze buňky. Při aktivaci toho genu dochází ke zvýšené expresi genového produktu p53, který lze vizualizovat pomocí imunohistochemického barvení. Právě porucha regulace apoptózy ve vilózním trofoblastu choriových klků a uvolnění vazoaktivních látek do krevního řečiště matky jsou považovány za klíčový děj uplatňující se v patogenezi preeklampsie a vzniku typických symptomů.

8 vzorků (62 %) z vybraného souboru vykazovalo zvýšenou expresi p53 v jádrech buněk vilózního trofoblastu shodnou s kontrolními vzorky

z placent se známkami MVM. V dalších 3 případech byla rovněž prokázána pozitivita p53, avšak tato nespĺňovala predem stanovená kritéria.

Ačkoli je tato studie zatížena malou velikostí sledovaného souboru, lze se domnívat, že známky MVM lze za pomoci imunohistochemického vyšetření prokázat v placentách bez vyjádřených morfologických změn.

ZÁVĚR

Přestože je placenta naprosto unikátním a pro vývoj jedince nepostradatelným orgánem, je povědomí širší veřejnosti o problematice placentární patologie poměrně malé. Jedním z dílčích záměrů bakalářské práce byla sumarizace současných poznatků o vybrané skupině placentárních lézí, které mohou zásadním způsobem ovlivnit průběh gravidity.

Jednotlivé kapitoly teoretické části práce shrnuly informace o anatomii a funkci placenty, o morfologických změnách v placentách provázejících vaskulární malperfúze popsaných dle Amsterdamské klasifikace, o chorobách, které jsou s malperfúzními syndromy asociovány, o laboratorním zpracování placenty a o imunohistochemickém vyšetření.

V praktické části došlo k vyhodnocení statistických dat. Toto statistické vyhodnocení vlastního souboru případů potvrdilo, že malperfúze patří k nejčastějším patologickým stavům postihujícím placentu. V souladu s literárními údaji byla prokázána asociace s některými maternálními chorobami i patologickými stavy plodu. Dále byla v praktické části zhodnocena imunohistochemická exprese antigenu p53 v souboru vybraných placent, a to na základě hypotézy, že i při absenci morfologických změn je možné v placentách matek s klinickou diagnózou preeklampsie prokázat abnormální expresi některých antigenů. Na základě vyhodnocení imunohistochemického barvení lze předpokládat, že projevy MVM je možné prokázat i v placentách bez vyjádřených morfologických změn. K potvrzení této hypotézy však bude zapotřebí ověření výsledků na větším souboru případů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BAERGEN, Rebecca N. *Manual of Pathology of the Human Placenta: Second Edition*. 2nd edition. New York, USA: Springer, 2011. ISBN 978-1-4419-7493-8.

BALKO, Jan, Zbyněk TONAR, Ivan VARGA a kolektiv. *Memorix histologie*. 2. vydání. Praha: TRITON, 2017. ISBN 978-80-7553-249-7.

BERANOVÁ, Milena a Zbyněk TONAR. *Principy a příklady imunohistochemie* [online]. Plzeň, 2002 [cit. 2019-02-06]. Dostupné z: http://www.lfp.cuni.cz/Histologie/education/guides/ihc_hi_res.pdf.

Příručka pro studenty. LF UK v Plzni.

BINDER, Tomáš. *Porodnictví*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1907-1.

ČECH, Evžen, Zdeněk HÁJEK, Karel MARŠÁL a kolektiv. *Porodnictví*. 2. vydání. Praha: Grada, 2006. ISBN 978-80-247-1303-8.

D'ADDARIO, Vincenzo. *Donald School basic textbook of ultrasound in obstetrics and gynecology*. 2nd edition. India: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2015. ISBN 978-93-5152-337-6.

GIBBS, Ronald S. a kolektiv. *Danforth's obstetrics and gynecology*. 10th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. ISBN 978-0-7817-6937-2.

GREIFFENEGGOVÁ, Liana, Drahoslava HRUBÁ a Pavlína KAŇOVÁ. Preeklampsie není jen komplikací v těhotenství. *Praktický lékař*. 2017, **97**(3), 117-122. ISSN 0032-6739.

HÁJEK, Zdeněk, Evžen ČECH, Karel MARŠÁL a kolektiv. *Porodnictví*. 3. vydání. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4529-9.

JEŽOVÁ, Marta. Vrozené vývojové vady srdeční. *Fetopatologie a vývojová patologie embrya a plodu* [online]. 2018 [cit. 2019-02-26]. Dostupné z: https://atlases.muni.cz/atlases/feto/atl_cz/vvvsrdcefetopatol.html

JIRKOVSKÁ, Marie. *Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. 1. vydání. Praha: Galén, 2006. ISBN 978-80-726-2263-4.

KAMENÍKOVÁ, Miloslava a Miroslava KYASOVÁ. *Ošetrovatelské diagnózy na porodním sále*. 1. vydání. Praha: Grada, 2003. ISBN 978-80-247-6172-5.

KAPELLER, Karol a Viera POSPÍŠILOVÁ. *Embryologický atlas: Atlas of embryology*. 1. vydání. Martin: Osveta, 1996. ISBN 80-2170-549-3.

KAPELLER, Karol a Viera POSPÍŠILOVÁ. *Embryológia človeka: učebnica pre lekárske fakulty*. 1. vydání. Martin: Osveta, 2001. ISBN 80-8063-072-0.

KAPLAN, Cynthia G. *Color Atlas of Gross Placental Pathology: Second edition*. 2nd edition. New York, USA: Springer, 2007. ISBN 978-0387-33842-2.

KASCAK, Peter, Milos PASKALA, Peter ANTAL a Radovan GAJDOSIK. Recurrent HELLP Syndrome at 22 Weeks of Gestation. *Case Reports in Obstetrics and Gynecology* [online]. 2017, , 1-4 [cit. 2019-01-04]. ISSN 2090-6684. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2017/9845637>

KHONG, T. Yee, et al. Sampling and Definitions of Placental Lesions: Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2016, **140**(7), 698-713. ISSN 0003-9985.

LEIFER, Gloria. *Úvod do porodnického a pediatrického ošetrovatelství*. 1. vydání. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0668-7.

LEONTOVYČOVÁ, J., J. JANDA. Nízká porodní hmotnost a další rizikové faktory pro pozdější onemocnění u dětí a dospělých (prenatální a postnatální programming). *Česko-slovenská pediatrie*. 2018, **73**(3), 166-172. ISSN 0069-2328.

MAČÁK, Jirka, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie: 2. doplněné vydání*. 1. vydání. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3530-6.

MUNTAU, Ania Carolina. *Pediatrie: Překlad 6. vydání*. 2. vydání. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4588-6.

NAVRÁTIL, Leoš a kolektiv. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory: 2., zcela přepracované a doplněné vydání*. 1. vydání. Praha: Grada, 2017. ISBN 978-80-271-0210-5.

PARKS, W. Tony. Placental hypoxia: the lesions of maternal malperfusion. *Seminars In Perinatology*. 2015, **39**(1), 9-19. ISSN 0146-0005.

REDLINE, Raymond W. Classification of placental lesions. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2015, **213**(4), 21-28. ISSN 0002-9378.

ROZTOČIL, Aleš a kolektiv. *Moderní porodnictví: 2., přepracované a doplněné vydání*. 1. vydání. Praha: Grada, 2017. ISBN 978-80-247-5753-7.

SADLER, Thomas W. *Langmanova lékařská embryologie*. 1. české vydání. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-2640-3.

SCIFRES, Christina M., W. Tony PARKS, Maisa FEGHALI, Steve N. CARITIS a Janet M. CATOV. Placental maternal vascular malperfusion and adverse pregnancy outcomes in gestational diabetes mellitus. *Placenta* [online]. 2017, (49), 10-15 [cit. 2019-01-04]. ISSN 1532-3102. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cmedm&AN=28012449&lang=cs&site=ehost-live>

SEDLÁŘOVÁ, Petra a kolektiv. *Základní ošetrovatelská péče v pediatrii*. 1. vydání. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-6667-6.

SHARP, Andrew N., Alexander E. P. HEAZELL, Dora BACZYK, et al. Preeclampsia is associated with alterations in the p53-pathway in villous trophoblast. *PLoS One* [online]. 2014, **9**(1). [cit. 2019-01-08]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3907567/>

SCHOENWOLF, Gary C., Steven B. BLEYL, Philip R. BRAUER and Philippa H. FRANCIS-WEST. *Larsen's Human Embryology*. 5th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2014. ISBN 978-1-4557-2791-9.

STOŽICKÝ, František, Josef SÝKORA a kolektiv. *Základy dětského lékařství*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-2997-1.

ŠMARDOVÁ, Jana a Jana KOPTÍKOVÁ. Brazilský příběh mutace p53 R337H. *Klinická onkologie* [online]. 2014, **27**(4), 247-254 [cit. 2019-03-06]. ISSN 1802-5307. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/187.pdf>

TROJAN, Stanislav a kolektiv. *Lékařská fyziologie* 4. vydání. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.

VACEK, Zdeněk. *Embryologie: Učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka*. 1. vydání. Praha: Grada, 2006. ISBN 978-80-247-6999-8.

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Povolení sběru informací ve FN Plzeň59

Příloha 2 Pracovní protokol používaný pro barvení protilátkou p5360

Příloha 1 Povolení sběru informací ve FN Plzeň



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

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

Vážená paní

Lucie Soukupová

Studentka oboru Zdravotní laborant

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

Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se 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 „*Morfologie a imunohistochemický profil malperfúzních placentárních syndromů*“.

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, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.

Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je **MUDr. Magdaléna Dubová, Ph.D., lékařka ŠÚP FN Plzeň**.

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

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

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová

manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP

zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň

tel.: 377 103 204, 377 402 207

e-mail: chabrovas@fnplzen.cz

14. 3. 2018

Příloha 2 Pracovní protokol používaný pro barvení protilátkou p53

Souhrn protokolů

Procedura: U ultraView DAB (v.1.02.0018)

BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module

FN Plzen, alej Svobody Plzen

Č protokolu	Název protokolu	Datum vytvoření
181	P 53 dako	23.09.2011

- 1 Sušení [Zvoleno]
- 2 Zahřát skla na [75 st. C] a inkubovat po dobu [4 minuty] (Sušení)
- 3 Odparafinování [Zvoleno]
- 4 Ohřát sklíčka na [72 st. C] z Střední teploty (Odparafinování)
- 5 Kondicionování buněk [Zvoleno]
- 6 ULTRA Conditioner #1 [Zvoleno]
- 7 Zahřát skla na [95 st. C] a inkubovat po dobu 8 minut (Kondicionér buněk č.1)
- 8 20 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 9 Teploty inkubace protilátky [Zvoleno]
- 10 Zahřát skla na [37 st. C] a inkubovat po dobu 4 minuty (Protilátka)
- 11 Titrace [Zvoleno]
- 12 Hand Apply (Primární protilátka), and Incubate for [0 h 32 min]
- 13 ultraWash [Zvoleno]
- 14 Jádrové barvení [Zvoleno]
- 15 Aplikovat jednu kapku [HEMATOXYLIN II] (Jádrové barvení), zakrýt a inkubovat po dobu [4 minuty]
- 16 Po jádrovém barvení [Zvoleno]
- 17 Aplikovat jednu kapku [BLUING REAGENT] (Po jádrovém barvení), zakrýt a inkubovat po dobu [4 minuty]