



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Zavedení histoscanningu pro rutinní hodnocení
biopsií nativních a transplantovaných ledvin

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **ZDRAVOTNÍ LABORANT**

Autor: Petra Šmolíková

Vedoucí práce: Prof.MUDr. Ondřej Hes, Ph.D

České Budějovice 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem *Zavedení histoscsanningu pro rutinní hodnocení biopsií nativních a transplantovaných ledvin* jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 28.4.2017

.....

Poděkování

Mé poděkování patří mému nadřízenému a zároveň vedoucímu práce Prof. MUDr. Ondřejovi Hesovi, Ph.D, za rady, dohled a odbornou pomoc při vypracovávání této bakalářské práce. Další poděkování patří panu Tomášovi Dobnerovi za pomoc s přístrojovou technikou.

Zavedení histoscanningu pro rutinní hodnocení biopsií nativních a transplantovaných ledvin

Abstrakt

Cíl: Imunofluorescence se využívá k diagnostice nativních i transplantovaných ledvin, ačkoliv má řadu limitů: krátká doba expirace, obtížná manipulace a zasilání.

Materiál a metody: 168 případů bylo zpracováno a hodnoceno klasickou metodou, následně scannováno pomocí Panoramic Scan Midi ve formátu 3D a opět posouzeno jako virtuální preparáty.

Výsledky: Primární sada 20 případů byla znovu hodnocena. Na základě výsledků byla modifikována technologie (medium, krycí skla a systém scanningu). 148 nových případů bylo zpracováno modifikovaně, hodnoceno na skutečných i virtuálních sklech. Rozdíly ve výsledcích obou technik byly přijatelné a systém byl uveden do praxe.

Závěr: Virtuální mikroskopie je použitelná i pro imunofluorescenční techniku a je v naší instituci používána rutinně. Současně se scannováním základních a imunohistochemických skel je používána pro tzv. telepatologii. Největší výhodou je jednoduchý a rychlý přístup z velké vzdálenosti.

Klíčová slova: ledviny; nativní; transplantované; imunofluorescence; telepatologie; virtuální mikroskopie

Introduction of the Histoscanning for Routine Evaluation of the Biopsy of the Native and Transplanted Kidneys

Abstract

Aim: Immunofluorescence used as part of diagnostic algorithm for native and transplanted kidney, however it has several limitations: short expiration, difficult handling and shipment. We compared quality of real slides versus scanned digital (virtual) slides.

Material and methods: 168 cases were stained and diagnosed using classic technology and microscope. All cases were scanned using Panoramic Scan Midi 3D and evaluated again as virtual slides.

Results: 20 primary evaluated slides (real and virtual) were reevaluated. Based on results, changes of technology were introduced (medium, coverslips, scanning parameters). 148 new cases were examined using classic technology and subsequently using virtual microscopy. Results and minor differences in quality were acceptable and modified technology was introduced into the routine practice.

Conclusions: Virtual microscopy is applicable also to immunofluorescence techniques and it is routinely used in our institution now. Altogether with histoscanning of standard histochemical and immunohistochemical stainings is also used for so-called telepathology. Main advantage is easy and fast access of consultant pathologist to examined material even from oversea distance.

Keywords: kidney; native; transplant; immunofluorescence; telepathology; virtual microscopy

OBSAH:	5
Úvod	6
1. Ledvina	7
1.1. Stavba ledviny.....	7
1.1.1. Stavba nefronu.....	8
1.2. Funkce ledviny.....	10
2. Transplantace	12
2.1. Ledvinný štěp.....	13
3. Glomerulopatie	14
3.1. Základní klinické příznaky glomerulopatií.....	14
3.1.1. Nefrotický syndrom.....	14
3.1.2. Nefritický syndrom.....	15
3.2. Klasifikace glomerulonefritid.....	15
3.3. Základní dělení glomerulonefritid.....	16
3.3.1. Glomerulonefritidy spojené s nefritickým syndromem.....	16
3.3.2. Mesangioproliferativní glomerulonefritida.....	16
3.3.3. Akutní proliferativní glomerulonefritida.....	16
3.3.4. Membranoproliferativní glomerulonefritida.....	17
3.3.5. Krescentní glomerulonefritida.....	17
3.4. Glomerulonefritidy způsobující nefrotický syndrom.....	18
3.4.1. Minimální léze.....	18
3.4.2. Fokálně segmentální glomeruloskleróza.....	19
3.4.3. Membránózní glomerulonefritida.....	19
3.5. Glomerulopatie a benigní hematurie.....	20
3.5.1. IgA nefropatie.....	20

3.5.2. Benigní hematurie.....	20
3.5.3. Henoch – Schönleinova nefropatie.....	21
4. Poškození ledvin při systémovém lupusu.....	22
5. Vaskulitidy.....	23
6. Biopsie ledvin transplantovaných.....	24
6.1. Rejekce transplantované ledviny.....	25
6.1.1. Hyperakutní rejekce.....	25
6.1.2.1. Akutní intersticiální rejekce.....	26
6.1.2.2. Akutní tubulární rejekce.....	26
6.1.3. Vaskulární rejekce.....	26
6.1.4. Glomerulární rejekce.....	27
6.1.5. Humorální rejekce.....	27
6.1.6. Chronický rejekční proces.....	27
6.1.6.1. Glomerulární rejekce.....	28
6.1.7. Barvení na C4d.....	28
6.2. Nerejekční poškození ledviny.....	29
6.2.1. Akutní tubulární nekróza.....	29
6.2.2. Polyomaviróza.....	30
7. Histoscanning.....	31
8. Cíl práce.....	33
9. Hypotézy.....	33
10. Metodika.....	34
10.1. Materiál.....	34
10.2. Zpracování renální biopsie.....	35
10.3. Metody.....	37

10.3.1. Zpracování punkce pro zhotovení parafinového bloku.....	37
10.3.2. Imunohistochemické vyšetření.....	40
10.3.3. Imunofluorescenční vyšetření.....	40
10.3.3.1. Výsledek imunofluorescenčního barvení.....	42
10.4. Histoscanning.....	42
11. Výsledky.....	46
11.1. Vyhodnocení záznamů.....	47
11.2. Využití scannu.....	48
12. Diskuze.....	49
13. Závěr.....	54
14. Obrazové přílohy.....	55
15. Seznam literatury.....	60
16. Seznam obrazové přílohy.....	69
17. Seznam zkratk.....	70

Úvod

Předkládaná práce seznamuje s novou metodikou, tzv. histoscanning, která je součástí telepatologie, využívanou pro hodnocení nativních vzorků autologních a transplantovaných ledvin ve FN Plzeň. Práce dále představuje zpracování punkčního vzorku nativní autologní ledviny a punkčního vzorku ledvinného štěpu pro rutinní diagnostické účely. Vzorky se zpracovávají metodami klasické histologie a histochemie, dále jsou využívány imunohistochemické a imunofluorescenční metody, v neposlední řadě elektronová mikroskopie.

Metoda histoscanningu umožňuje scannování všech typů preparátů, klasických histologických vytvořených z parafinového tkáňového bloku a preparátů imunofluorescenčních, které jsou zhotoveny ze zmrazených řezů.

Hodnocení imunofluorescenčních preparátů biopsií ledvin je velmi složitá problematika a cílem této práce je prokázání, že odečítání virtuálních preparátů a preparátů pro optickou mikroskopii je možné ve stejné kvalitě a následného využívání histoscanningu pro rutinní hodnocení biopsií.

1. Ledvina

Ledvina (*ren, nefros*) je párová exkretční žláza a je součástí močového ústrojí. Ledvina se postupně vyvíjela ve třech vývojových fázích: *pronefros* – předledvina, *mesonefros* – prvoledvina, *metanephros* – ledvina. Má charakteristický tvar fazolového bobu. Ledviny jsou uloženy retroperitoneálně, podél páteře mezi dvanáctým hrudním a třetím bederním obratlem, kdy pravá ledvina je níže. U dospělého člověka je ledvina dlouhá 10 -12 cm, široká 5 -7 cm a 3,5 – 4 cm silná. Ledvina dospělého muže má hmotnost 125 – 170 gramů, u žen bývá hmotnost v průměru o 15 gramů méně (Čihák, 2002).

1.1. Stavba ledviny

Ledvina je pokryta vazivovým pouzdem – *capsula fibrosa*, kdy společně s nadledvinou je ještě uložena v tukovém pouzdře – *capsula adiposa*. U ledviny rozeznáváme části: kůru ledviny – *cortex renalis* s jemně zrnitou strukturou podél zevního obvodu a dřev ledviny – *medulla renalis* s tmavší žíhanou strukturou. Zrnitý vzhled ledviny je dán obsahem ledvinových tělísek. Dřev je dále uspořádána do pyramid, každá ledvina jich obsahuje 15 – 20. Báze pyramid jsou orientovány k povrchu ledviny a vrcholy pyramid směřují k hilu ledviny. Na vrcholech pyramid jsou vyústění odvodných kanálků (Čihák, 2002).

Základní jednotkou ledviny je nefron. Nefron je ledvinový kanálek, který se skládá z mnoha částí. Začíná jako Malpighiho (ledvinové) tělísko – *corpusculum renale*, pokračuje jako cévní klubičko – *glomerulus* a pouzdro cévního klubička – *capsula glomeruli*, tzn. Bowmanovo pouzdro. Pouzdro má dva listy. Vnější list – *parietální*, uzavírá celý glomerulus a kapiláry cévního klubička pokrývá vnitřní list – *viscerální*. Z prostoru mezi listy pouzdra vystupuje kanálek ledvinový, který má na svém průběhu několik úseků. První částí je proximální tubulus, který pokračuje v Henleovu kličku se sestupným a vzestupným raménkem, dále navazuje distální tubulus (Dylevský, 2009).

Sběrací kanálky – *tubuli colligentes* začínají ve dřevu. V každém sběrném se nachází vyústění 5-10 nefronů. Sběrné kanálky se spojují v široké papilární vývody –

ductus papillares, ty ústí v renálních papilách – *foramina papillaria*, odkud přechází moč do ledvinových kalichů, tedy do vývodných cest močových (Čihák, 2002).

1.1.1. Stavba nefronu

Ledvinové tělísko – *corpusculum renale* (Malpighiho tělísko) má část *capsula glomeruli*, tedy konec renálního tubulu, kde je vložený glomerulus. *Capsula glomeruli* se skládá ze dvou listů, kdy vnější list se skládá z vrstvy plochých epitelových buněk s tenkou *lamina basalis* (Jungerais, 2010). Epitelové buňky následně přecházejí v buňky stěny kanálku ledvinného. Vnitřní list naléhá na kapiláry glomerulu je složený se specializovaných buněk – podocytů. Podocyty se rozvětvují a na širších větvích mají výběžky – pedikly. Pedikly hustě obemykají stěny kapilár. Pedikly ze sousedních větví podocytů do sebe zapadají a tím vznikají submikroskopické štěrbin, ve kterých je dále vložena ultratenká membrána fibrilárně uspořádaná (Naňka et Elišková, 2015).

Glomerulus je složen asi ze 30 klíček kapilár, kdy se po vstupu *arteriola afferens* do ledvinného tělíška rozdělily a sbírají se do *arteriola efferens*. Stěnu kapilár glomerulu tvoří endotelové buňky, mezi kterými jsou jemné póry. Povrch kapilár pokrývá bazální membrána, která vznikla prolnutím bazálních membrán podocytů a kapilár. Toto uspořádání umožňuje filtraci primitivní moče a ultratenká membrána mezi podocyty, která má speciální strukturu vláken a je uspořádána do vrstev, zajišťuje funkci selektivního filtru. Takto je umožněn průchod vody a menších molekul rozpuštěných látek a jiné látky jsou naopak zadržovány. Tento děj se nazývá ultrafiltrace (Čihák, 2002).

Mesangiové buňky mají krátké výběžky, schopné kontrakce a jsou mesenchymového původu, část z nich má schopnost fagocytózy. Nacházejí se okolo arteriol, při vstupu a výstupu z glomerulu a v oblastech větvení se a spojování se kapilár - asi třetina všech glomerulárních buněk. Ledvinné mesangium je tvořené z celého souboru těchto buněk (Naňka et Elišková, 2015). Buňky mesangia mají mnoho funkcí, jako je produkce některých látek a mechanismus regulace průtoku glomerulem, fagocytóza buněčných zbytků z glomerulárního filtru. Jsou součástí opory a výztuhy kapilár. Ke zvětšení a zvýšení počtu mesangiových buněk dochází za patologických stavů, jako jsou diabetické a jiné nefropatie, chronické záněty (Čihák, 2002).

Proximální tubulus tvoří jedna vrstva kubických buněk s kartáčovým lemem z vysokých mikrokvlků (Lüllman-Rauch, 2012). Kubické buňky mění svou výšku dle

tlaku uvnitř tubulu, proto při punkčním odběru vzorku jsou tyto buňky vyšší. V proximálním tubulu dochází hlavně k transportu iontů a malých molekul, jak proti koncentračnímu spádu, tak pasivním transportem. Buňky tedy obsahují enzymy spojených s těmito funkcemi (Dylevský,2009).

Henleova klička je tvořena proximálnějším tenkým úsekem poskládaný z nízkých oploštělých buňek, kdy jejich jádra směřují do lumina kanálku. Tenký úsek je tvořen tenkým sestupným a vzestupným raménkem. Tlustý úsek tvoří krychlové buňky s velkým počtem mitochondrií (Jungerais, 2010). Tlusté sestupné raménko je koncová část proximálního tubulu a tlusté vzestupné raménko je koncová část distálního tubulu. Protiproudový multiplikační systém je mechanismus v Henleově kličce, který umožňuje odebírání vody z tekutiny protékající kličkou a výměnu iontů do extratubulárního prostoru. Mezi oběma raménky – sestupným i vzestupným a extratubulární tekutinou vzniká gradient, kdy extracelulární tekutina o vysokém osmotickém tlaku umožní uvolnění vodných iontů ze sestupného raménka (Čihák, 2002).

Distální tubulus tvoří buňky, které se podobají buňkám proximálního tubulu, ale jejich mikrokilky jsou nižší a nemají kartáčový lem, jsou nepravidelně rozmístěné. Buňky obsahují enzymy – sodnodraselná ATPasa, zajišťující aktivní transport sodných a draselných iontů a dalších iontů. Po průchodu distálním tubulem je moč oproti krvi a extratubulární tekutině hypotonická. Z tohoto důvodu dochází ke zpětné resorpci iontů, močoviny, fosfátů a dalších látek spolu s nepropustností pro vodu (Dylevský, 2009).

Tubulus colligens a ductus papillaris jejichž stěny jsou tvořeny jednovrstevným kubickým epitelem, který se postupně přechází v epitel cylindrický. Buňky mají méně organel a snižuje se počet mikrokilků (Lüllmann-Rauch,2012). Z *tubuli colligens* nadále vystupuje voda do extratubulární tekutiny ve dřeni, která je hypertonická. Výstup vody z *tubuli colligens* je řízený antidiuretickým hormonem, voda vystupuje dokud není moč úplně zahuštěna (Čihák, 2002).

Nefrony se dle uložení v ledvinné kůře dělí na nefrony superficiální, intermediální a juxtamedulární. Vedle nefronů se v kůře ledviny nachází proximální a distální tubuly a *tubuli colligentes*- korové části. Kůra ledviny přiléhající ke dřeni se nazývá *subcortex* nebo-li *juxtamedulární kůra*. Ve dřeni se nachází Henleovy kličky a *tubuli colligentes*- dřeňové části (Elišková et Naňka, 2015).

1.2. Funkce ledviny

Primární funkcí ledviny je vylučování (exkrece) odpadních látek jako jsou dále nevyužitelné zplodiny a metabolity, látky organismus potřebuje, ale v danou chvíli jsou nadbytečné a látky organismu cizorodé (léky, toxiny, drogy) a nosiče těchto látek. Ledviny jsou tedy hlavním efektoem dynamické homeostázy extracelulární tekutiny (Trojan, 2003).

Mechanismy, které ovlivňují ledvinovou exkreci, jsou renální hemodynamika a funkce tubulů. Renální cirkulace a glomerulární filtrace závisí na stabilitě průtoku krve ledvinami, kde se uplatňuje systém autoregulace. Autoregulace je řízena vazomotoricky, tzn. napětím hladké svaloviny cévní stěny a na vazokonstrikci způsobenou sympatickým nervovým systémem (Tesař et Viklický, 2015). Dalším systémem podílejícím se na řízení průtoku krve ledvinami je juxtaglomerulární aparát nacházející se na začátku distálního tubulu a eferentních arteriol, systémem *renin-angiotenzin II* s vazokonstrikčními účinky. Vazodilatačně ovlivňují aferentní arterioly *prostaglandiny*. Systém *kallikrein – kinin* působí vazodilatačně na arterioly a vazokonstrikčně na angiotenzin II. Významně ovlivňuje glomerulární hemodynamiku oxid dusnatý, který působí na buňky *macula densa*, tj. buňky tlustého vzestupného raménka Henleovy kličky (Trojan, 2003).

Děje probíhající v tubulech jsou ovlivněny několika mechanismy. Ledviny zde řídí extrarenální regulace a jsou zdrojem regulačních faktorů, kterými jsou antidiuretický hormon – *vazopresin* – působí na vylučování metabolitů, *aldosteron* – hormon nadledvin – podporuje resorpci a exkreci iontů, systém *renin – angiotenzin*, systém *kallikrein – kinin* – ovlivňuje aferentní a eferentní arterioly, *prostaglandiny* – působí na hladkou svalovinu, *parathormon* – aktivuje zpětnou resorpci kalcia, *natriuretické faktory a endoteliny* – ovlivňují výdej sodíku a resorpci vody (Gannong, 2005; Trojan, 2003).

Při glomerulární filtraci se filtruje tekutina podobná krevní plazmě stěnou kapilár glomerulu do renálních tubulů. Probíhají procesy tubulární zpětné resorpce, kdy se odstraňuje voda a soluty z tubulární tekutiny a procesy tubulární sekrece, kdy se soluty sekretují do tubulární tekutiny. Tímto způsobem vzniklá moč odtéká do ledvinné pánvičky spolu se všemi odfiltrovanými odpadními produkty (Gannong, 2005).

Za normální glomerulární filtrace se u průměrného člověka přefiltruje asi 125 ml tekutiny za minutu, vytváří se tedy asi 180 l za den primitivní moči a definitivní moči se utváří cca 1,5 l za den. Glomerulární filtrace je řízena několika faktory jako jsou velikost kapilárního řečiště, permeabilita kapilár, hydrostatický tlak v kapilárách glomerulu a onkotický tlak mezi listy Bowmanova pouzdra (Tesař et Viklický, 2015).

Propustnost glomerulárních kapilár zajistí volnou filtraci neutrálních látek menších než 4 nm. Také záleží na náboji procházející částice. Anionické látky s daným průměrem se filtrují méně než látky kationické (Gannong, 2005).

Hlavní tubulárními funkcemi jsou sekrece a reabsorpce. Malé proteiny a některé peptidové hormony jsou v proximálním tubulu resorbovány pomocí endocytózy. Další látky se resorbují nebo secernují v tubulech usnadněnou difúzí po koncentračním spádu nebo pasivní difúzí přes membránu po chemickém nebo elektrickém gradientu, jinou možností resorpce a sekrece v tubulech je aktivní transport proti gradientům při dodání energie ve formě ATP. Pohyb látek se přes iontové kanály, výměníky, přes pumpy a kotransportéry. Velký význam ve vodním a elektrolytovém metabolismu organismu má resorpce sodných a chloridových iontů, kdy s transportem sodíku souvisí transport vodíkových iontů a dalších elektrolytů. Dále se resorbuje glukóza, aminokyseliny, organické kyseliny, fosfáty a jiné látky (Tesař et Viklický, 2015).

Další funkcí ledvin je funkce endokrinní, kdy jsou produkovány hormony kalcitriol, erythropoetin a enzym renin. Erythropoetin je antiapoptotickým účinkem, který je po narození syntetizován hlavně v peritubulárních buňkách kůry ledviny. Erythropoetin se nikde v organismu neskládá, je podle potřeby syntetizován (Silbernagl et al., 2004). Kalcitriol je steroidní hormon 1,25-dihydroxycholekalCIFerol, je to nejaktivnější forma vitamínu D3. Vzniká 1-hydroxylací 25-hydroxycholekalCIFerolu v ledvinách, kterou stimuluje parathormon. Kalcitriol má důležitou úlohu v metabolismu vápníku (Guyton et Hall, 2006). Enzym renin je tvořený v buňkách juxtaglomerulárního aparátu. Systém *renin-angiotenzin-aldosteron* se hlavně účastní na regulaci krevního tlaku a na hospodaření s ionty, dále se uplatňuje při kontrole zánětlivých a reparačních pochodů (Kobori et al., 2007)

2. Transplantace

Transplantace znamená přenos části nebo celého orgánu jednoho organismu na druhý. Cílem transplantace je náhrada orgánu nebo tkáně příjemce, který ztratil svou funkci, za zdravý od dárce (Hořejší, 2013). U člověka se provádí homotransplantace – přenos orgánů nebo tkání mezi organismy téhož druhu, konkrétně allogenní transplantace – transplantace mezi geneticky odlišnými jedinci (syngenní transplantace – mezi geneticky shodnými jedinci). Autologní transplantace představuje přenos tkání u jednoho jedince, vylučuje se tímto indukce odhojovací reakce (Hořejší, 2013). U alogenních transplantací se hledá shoda v systémech HLA –A, -B, -C a HLA -DP, -DQ, -DR a systému AB0 z důvodu, co nejvyšší eliminace rejekční reakce (Aubert et al., 2014). Xenotransplantace je přenosem mezi různými živočišnými druhy, v klinické praxi se užívá vyjímečně.

Původu transplantovaného orgánu je dvojí. Orgán od žijícího dárce a od nežijícího (kadaverózního) dárce. Žijící dárce je ve většině případů příbuzný příjemce, u dárce cizího je možný odběr orgánu hodnocen etickou komisí. Kadaverózní orgány pochází buď od dárců s bijícím srdcem (HBD), u kterých byla prokazatelně zjištěna nezvratná smrt mozku. Nebo od dárců s nebijícím srdcem (NHBD), kde je nezvratná zástava srdce (Třeška et al., 2008).

Transplantace jsou spojené s mnoha etickými otázkami. V České republice je zavedený systém opting – out, tzn. systém, kdy je předpokládán souhlas jedince s darováním orgánů v případě smrti a takového stavu, kdy je odběr orgánu možný (Šimek, 2015). Z dárcovství je vyřazen ten, kdo předem vyjádřil nesouhlas a je vedený v Národním registru osob nesouhlasících s posmrtným odběrem tkání (vyhláška č. 434/2004 Sb.). Registr byl zaveden po přijetí nového transplantačního zákona č. 285/2002 Sb. Systém opting – out platí ve většině států Evropy, mimo Anglie, Německa a Nizozemska (Šimek, 2015).

U orgánových transplantací dochází k záměrnému navození imunoprese, kdy je cílem potlačení imunitního systému příjemce v reakci proti štěpu. Projevem imunopresivní léčby jsou potom imunodeficiencie, kdy u orgánových transplantací jsou výraznější. Imunopresivní léčba zasahuje hlavně T-lymfocyty potlačující buňkami zprostředkovanou imunitu, to může mít za následek vznik oportunních infekcí a malignit (Hořejší, 2013).

2.1. Ledvinový štěp

Transplantovaná ledvina, nebo-li štěp, je implantovaná příjemci heterotopicky extraperitoneálně ve většině případů do pravé jámy kyčelní. Jak již bylo zmíněno, transplantovaný orgán může být původu kadaverózního od bijícího nebo nebijícího dárce. Dárce žijící může být pokrevní příbuzný nebo emotivní příbuzný (Třeška et al., 2008).

Přijmout ledvinu může pacient s nezvratným selháním ledvin s tím, že je schopen operačního výkonu a následné imunosupresivní léčby. Nejlepším předpokladem pro zdařilou transplantaci je fakt, že pacient ještě nebyl dialyzován, tzv. preemptivní transplantace (Tesař et Viklický, 2015).

Po transplantaci následují pravidelné kontroly stavu štěpu provedením punkční biopsie štěpu, a to tři měsíce po výkonu, dále jeden rok a tři roky po transplantaci. Nepravidelné kontroly jsou prováděny při dysfunkci štěpu nebo při podezření na rejekci.

3. Glomerulopatie

Nemoci glomerulů, také glomerulopatie nebo glomerulonefritidy jsou heterogenní skupinou onemocnění s různou podstatou. Původ glomerulopatií může být imunologický jako jsou proliferativní glomerulopatie, metabolický u diabetes mellitus (Povýšil et Šteiner, 2007). Jiná poškození vznikají na základě vaskulárním při hypertenzích, při hereditárně vázaných chorobách jako jsou Alportův syndrom nebo Fabryho choroba (Brenner, 2012). Další dělení glomerulopatií spočívá v rozlišení, jestli glomerulopatie vznikla jako samostatné onemocnění ledvin, potom nesou označení primární glomerulopatie. Sekundární glomerulopatie jsou součástí výše zmíněných systémových onemocnění (Tesař et Viklický, 2015). Časové hledisko vývoje onemocnění dělí glomerulonefritidy na akutní a chronické. Akutní glomerulonefritidy se rozvíjejí náhle, kdy se rozvine renální nedostatečnost a funkce ledvin se terapií významně kladně ovlivní (Novák et al, 2008). Chronické glomerulonefritidy jsou vleklými až dlouholetými onemocněními, kdy organismus nemocného mohou zatěžovat další komplikace a mohou končit chronickým selháním ledvin (Tesař et Viklický, 2015).

3.1. Základní klinické příznaky glomerulopatií

V podstatě existují dva základní klinické obrazy, kterými se glomerulopatie prezentují. Jednak je to nefrotický syndrom a druhý vážnější je nefritický syndrom.

3.1.1. Nefrotický syndrom

Typickými znaky pro nefrotický syndrom jsou ztráty proteinů, dále periferní tzv. renální edém, který vzniká následkem dalšího znaku a to hypoalbuminemií. Nefrotický syndrom bývá doprovázen hypercholesterolémií (Viklický, 2010). Nefrotický syndrom většinou probíhá nenápadně, poměrně velmi dlouho skrytě a jeho progres je pomalá. Samozřejmě může dojít k rychlému rozvoji a k rychlejší ztrátě renálních funkcí. Obvykle však většinou trvá velice dlouho než pacient dospěje do známek renální insuficience (Teplan, 2010).

3.1.2. *Nefritický syndrom*

Mezi základní znaky nefritického syndromu patří hematurie mikroskopická nebo makroskopická, dále periferní edém, který zde však nevzniká na základě hypoalbuminémie, ale na základě retence solí a na ní vázané vody (Teplan, 2010). K dalším znakům nefritického syndromu patří hypertenze a poměrně rychlá ztráta renálních funkcí, respektive nástup renální dysfunkce. Nefritický syndrom je vždy rychlejší, pacient dříve navštíví lékaře z důvodu makroskopické, tedy okem viditelné hematurie (Brenner, 2012). Nefritický syndrom se u mužů může projevit dalším znakem, nepříliš častým, a to je oligurie. Oligurie vzniká právě následkem zadržování solí a vody v organismu (Robbinson et Cotran, 2015).

Pro oba typy poškození je charakteristický tzv. periorbitální edém – otoky v oblasti víček, pacienti jsou přirovnáváni k žábě. Tento edém se může rozšířit po celém těle. Častou komplikací je kombinace obou těchto syndromů a pacient vykazuje příznaky obou syndromů. Poměrně časté je, že pacient se projeví převážně syndromem nefrotickým, ale současně je detekovatelná krev v moči (Povýšil et Šteiner, 2007).

Dalším typem projevu renálního poškození je rychlý nástup renální insuficience. Tento příznak může být spojen s poškozením glomerulů, často bývá spojen tubulointersticiálním poškozením ledviny. Tubulointersticiální poškození ledviny je v podstatě onemocnění tubulárního a intersticiálního systému, může být spojeno s ascendentní a celkovou infekcí, s alergickou reakcí, apod. (Perazella et Markovitz, 2010).

3.2. *Klasifikace glomerulonefritid*

Klasifikace glomerulonefritid je komplikovaná ze své podstaty. Největším problémem pro pochopení a uchopení klasifikace glomerulonefritid je fakt, že jedna etiologická jednotka se může projevit několika různými klinickými příznaky a navíc morfologie, klinický průběh choroby je u jedné etiologické jednotky často výrazně modifikován řadou faktorů (Brenner, 2012). Můžeme tedy mít etiologickou jednotku, tzn. chorobnou jednotku, která se u pacienta projeví nefrotickým syndromem, u jiného pacienta se projeví syndromem nefritickým nebo kombinací obou možných. Z tohoto důvodu jsou glomerulonefritidy děleny jednak dle znaků morfologických, dále někdy

dle znaků klinických. Nejčastěji užívaná klasifikace je tvořená kombinovaným přístupem, tzn. klasifikuje se dle příznaků klinických i dle morfologie (Povýšil et Šteiner, 2007).

3.3. Základní dělení glomerulonefritid

Glomerulonefritidy spojené s nefritickým syndromem. Další kapitola jsou glomerulonefritidy spojené s nefrotickým syndromem. Dále glomerulopatie s benigní hematurií a ostatní, kam patří např. poškození hypertenzí, diabetem, poškození glomerulů při systémových onemocněních autoimunitního rázu (nejvíce systémový lupus), poškození glomerulů při vaskulitidách apod. (Colvin et Chang, 2016).

3.3.1. Glomerulonefritidy spojené s nefritickým syndromem

Jsou glomerulonefritidy, které se klinicky projeví hematurií a to buď mikroskopickou nebo makroskopickou, u pacientů dochází k retenci solí a vody, dochází k perifernímu edému a hypertenzi (Teplan, 2010).

3.3.2. Mesangioproliferativní glomerulonefritida

Mesangioproliferativní glomerulonefritida je čistě morfologický pojem a tato jednotka je charakterizovaná zvýšenou celularitou v oblasti mesangia. Jako mesangiálně proliferativní glomerulonefritida se může projevit celá řada chorobných jednotek, od postinfekční glomerulonefritidy až např. po IgA nefropatii, která však je většinou řazena separátně do zvláštní subkategorie (glomerulonefritidy spojené s benigní hematurií) (Suzuki et al., 2011).

3.3.3. Akutní proliferativní glomerulonefritida

Jde o další morfologickou jednotku, která nemá nic společného s etiologií. Tato jednotka je charakterizována s neutrofilů v kličkách, respektive v lumen kapilárních kliček a s endokapilární proliferací (Colvin et Chang, 2016). Endokapilární proliferace je stav, kdy dochází k hyperplazii endoteliálních buněk. Následkem je mechanické poškození kapilárních kliček, respektive ztížení průtoku krve kapilárními kličkami (Robbinson et Cotran, 2015)

3.3.4. *Membranoproliferativní glomerulonefritidy*

Další jednotka, zde se již jedná o etiologickou jednotku, která je ve specializované literatuře dále dělena na minimálně tři skupiny. Toto onemocnění je morfologicky charakterizované lobulárním uspořádáním glomerulů, přítomno je výrazné ztlustění stěn kapilárních kliček, které při speciálním barvení (impregnace stříbrem dle Jonese, PAS) vykazují rozštěpy, tzn. bazální membrána je „zdvojená“ (Sethi et Fervenza, 2012).

Charakteristické při imunofluorescenčním vyšetření výrazná pozitivita C3 komplementů v glomerulech a tuto C3 depozici lze korelovat s hypokomplementemií v krvi pacienta. Jedná se o onemocnění, které má poměrně pomalý průběh, avšak bohužel prognóza pro renální funkci je většinou velice špatná (Sethi et Fervenza, 2012).

3.3.5. *Krescentní glomerulonefritida*

Krescentní glomerulonefritida se někdy klinicky označuje jako rapidně progredující glomerulonefritida, popřípadě srpkovitá glomerulonefritida. Tento typ poškození patří mezi nejagresivnější a nejrychleji probíhající glomerulonefritidy, které vyžadují velice rychlý zásah, rychlou léčbu a přesnou diagnostiku (Jenette et al., 2015). Tento typ poškození je charakterizována nekrózami kapilárních kliček. V okamžiku, kdy dojde ke kontaktu krve s primární močí, dochází k vzniku tzv. srpků. Srpky jsou reaktivní změny v epitelu Bowmanského pouzdra, které proliferuje, vytváří epitelovou strukturu, která vyplňuje močový prostor glomerulu, komunikuje s poškozenými kapilárními kličkami, je prostoupena fibrinem a zánětlivými elementy (Krejčí et al., 2011). V průběhu vývoje srpků dochází k vrůstání fibroblastů a k postupné fibrózní obliteraci tohoto útvaru. Následkem je zjizvený kapilární trs, redukce filtrační plochy ledviny (Krejčí et al., 2011). Bez rychlého zásahu většinou dojde ke kompletní destrukci glomerulu a zániku glomerulu. Toto postižení je většinou difúzní, takže velice rychle dochází k rozsáhlým ztrátám glomerulárního aparátu a následkem toho k omezení filtrační plochy a k rychlému nástupu renální insuficience (Tarzi et al., 2011).

3.4. Glomerulonefritidy způsobující nefrotický syndrom

3.4.1. Minimální léze

Minimální léze je onemocnění, které bylo dlouhou dobu známo, postihuje především malé děti. Dlouhou dobu bylo toto onemocnění považováno za poškození tubulárního aparátu, starší označení této léze bylo tzv. lipidní nefróza. Důvodem dlouhodobě špatné diagnostiky byla nemožnost vyšetření ultrastruktury (Povýšil et Šteiner, 2007).

Toto onemocnění typicky postihuje pediatrické pacienty, může však vyskytovat i u pacientů dospělých. Pacienti mívají proteinurii, daleko častěji však mívají plně vyvinutý nefrotický syndrom (Colvin et Chang, 2016). Funkce ledvin je povětšinou zcela normální. Většina pacientů velmi dobře reaguje na bolus kortikoidů, dochází k uzdravení. Menší části pacientů je tzv. kortikoid dependentní, při vysazení kortikoterapie se vrací příznaky, tzn. proteinurie či plně vyvinutý nefrotický syndrom. Ještě menší část pacientů progreduje dále do fokálně segmentární glomerulosklerózy (Iwabuchi et al., 2014). Velice pravděpodobně se jedná o zcela iniciální stadium tohoto onemocnění (Tesař et Viklický, 2015). Minimální léze (další ze synonym je idiopatický nefrotický syndrom) je charakterizovaná normální morfologií. Morfologicky nacházíme zcela normální glomerulii bez patologie. Jediné změny, které jsou detekovatelné v optické mikroskopii, jsou lipidové a proteinové kapénky v cytoplazmě tubulů, zejména v oblasti proximálního nefronu a kolekce makrofágů v intersticiu (Colvin et Chang, 2016).

Imunofluorescenčně je drtivá většina případů zcela normální, tzn. negativní. Pouze u některých vzácnějších případů lze detekovat některou třídu imunoglobulinu (nejčastěji IgM), je možné detekovat Kappa, Lambda lehké řetězce (Jennete et al., 2015). Zásadní nález je v ultrastruktuře. Při ultrastrukturálním vyšetření glomerulů nacházíme fúzi pedicélií podocytů a tzv. mikrovilózní transformaci pedicélií podocytů. Tato transformace se běžně označuje jako tzv. „spagethi pattern“. Důležité je, že ultrastrukturálně nesmíme prokázat žádná elektrondenzní či translucenční depozita (Liu et al., 2014).

3.4.2. *Fokálně segmentální glomeruloskleróza (FSGS)*

Jedná se o onemocnění charakteristické nefrotickým syndromem (Povýšil et Šteiner, 2007). Největším problémem je stanovení tzv. primární FSGS a sekundární FSGS. Sekundární FSGS nacházíme například u Overload syndromu (syndrom z přetížení ledviny při ztrátových operacích či jiných ztrátách funkčního parenchymu ledviny). Dále bývá nacházena při posthypertenzních změnách, zejména po přestálé hypertenzní krizi, apod. (John et al., 2009).

U primární FSGS neznáme přesně etiologii. Onemocnění většinou progreduje, někdy si vyžaduje poměrně nákladnou léčbu (Tesař et Viklický, 2015). Problém FSGS je i možná častá progresse, resp. rekurence u transplantovaných pacientů (Colvin et Chang, 2016). Onemocnění je charakteristické fokálním (jednotlivé glomeruly) a segmentálním (pouze část kapilárního trsu) postižením (Stokes et al., 2014). Jedná se zejména o adheze kapilárních kliček k pouzdru, kolapsy kapilárních kliček, sklerotizaci části kapilárních kliček apod. (Schneider et al., 2017). Existují vzácnější varianty jako tzv. celulární FSGS, typ lesion apod. Tubulární aparát a intersticiium jsou obdobně postižené jako u tzv. minimálních lézí (Krejčí et al., 2011).

Imunofluorescenčně je většina případů zcela negativních, pokud nacházíme imunofluorescenci, pak nejčastějším markerem je IgM (Strassheim et al., 2013). V ultrastruktuře je nález poměrně nepříznačný, samozřejmě zde je velká chyba vzorku (sample error). Pokud zastihneme poškozený glomerulus, prokazujeme pouze necharakteristické kolapsy kapilárních kliček či sklerotizaci (D'Agati et al., 2011).

3.4.3. *Membranózní glomerulonefritida*

Membranózní glomerulonefritida je charakteristická rozvojem nefrotického syndromu (Povýšil et Šteiner, 2007). Existují dvě klinické varianty. Jednak tzv. idiopatická membranózní glomerulonefritida, u které se nepodaří zjistit žádnou jinou přidruženou chorobu a tzv. sekundární membranózní glomerulonefritida (Brenner, 2012), která bývá spojena s chronickými hnisavými infekcemi, chronickými granulomatozními záněty (Ma et al., 2013), některými malignitami apod. Je tedy velice důležité klinicky vyloučit tzv. sekundární membranózní glomerulonefritidu (Tesař et Viklický, 2015).

Membranózní glomerulonefritida je charakteristická ztluštěním bazálních membrán kapilárních kliček, které je možné pozorovat při barvení PAS či barvení

stříbrem (Povýšil et Šteiner, 2007). U rozvinutých případů je však toto ztlustění patrné i v základním HE barvení. Další morfoloickou změnou u membranózní glomerulonefritidy jsou tzv. holes, což jsou skutečně otvory v bazální membráně mikroskopického rozsahu. Další detekovatelnou morfoloickou změnou jsou tzv. spikes, což jsou hřebínkovité výrůstky na epiteliálním povrchu bazální membrány glomerulů (Colvin et Chang, 2016).

Pro diagnostiku membranózní glomerulonefritidy je naprosto zásadní imunofluorescenční vyšetření. Je nutné nalézt difuzní granulární pozitivitu na bazální membráně v IgG, nejčastější koexprese je C3 (Krejčí et al., 2011). Tato depozice má svůj protipól při vyšetření ultrastruktury, kde nacházíme jasné a významné tzv. humps, což jsou elektrondenzní vyvýšeniny na epiteliálním povrchu bazální membrány vytvářející pravidelné hrboly (Ronco et Debiec, 2012).

3.5. Glomerulopatie a benigní hematurie

Další skupinou primárních glomerulárních postižení je tzv. skupina glomerulopatie a benigní hematurie (Brenner, 2012).

3.5.1. IgA nefropatie

Nejdůležitější jednotkou je tzv. IgA nefropatie, což je onemocnění neznámé etiologie s poměrně variabilním klinickým průběhem (Povýšil et Šteiner, 2007).

3.5.2. Benigní hematurie

Převážná většina případů benigní hematurie je omezena pouze na mikroskopický průkaz hematurie při laboratorním vyšetření moči (Folsch et al., 2003). Není možné zachytit žádnou dysfunkci renálních funkcí ani jiná poškození. Typicky je toto onemocnění zachyceno při periodických prohlídkách u mladistvých, v dřívější době velká část případů byla zachycena při nástupech k prezenční vojenské službě jako náhodný nález (Povýšil et Šteiner, 2007). Převážná většina onemocnění zůstává takto klinicky němá. U části případů, nelze přesně vytipovat rizikové skupiny, dojde k velmi rychlému a prudkému nárůstu potíží a k poškození parenchymu. Někdy bývá spouštěcím mechanismem banální viróza či jiná infekce, jindy nelze dohledat

v anamnéze pacienta žádnou možnou spouštěcí situaci. U těchto pacientů může dojít k velmi rychlé progresi a k těžkému poškození renálních funkcí až k úplné renální dysfunkci (Herlitz et al., 2014). Morfologicky je toto onemocnění v typických případech charakterizováno pouze mírným rozšířením mesangia, často doprovázené hypercelularitou. Toto bývá společně s masivní depozicí IgA imunoglobulinu a C3 komplementu v mesangiu jediným nálezem. Na druhém konci morfologického spektra IgA nefropatie je krescentní velmi agresivní glomerulonefritida s rychlým zánikem renálních funkcí (Yuste et al., 2015). Mezi těmito dvěma póly morfologických projevů stojí celá řada variant. Jednou z častých variant je tzv. FSGS pattern, kdy glomeruly připomínají onemocnění při primární či sekundární fokálně segmentární glomeruloskleróze (Roberts, 2014). Díky tomuto typu poškození není hematurie často hlavním projevem, pacienti naopak mívají proteinurii či dokonce vyvinutý nefrotický syndrom s mikroskopickou hematurií. Samozřejmě u této jednotky je patrná depozice IgA, často C3(Jennete et al., 2015). Další možnou variantou je tzv. celulární léze či typ lesion s drobným srůstem v oblasti tubulárního pólu glomerulu (Roberts, 2014).

3.5.3. *Henoch – Schönleinova nefropatie*

Dalším poškozením, respektive onemocněním z této skupiny je tzv. Henoch-Schönleinova nefropatie. Henoch-Schönleinova nefropatie (HSN) je onemocnění typicky postihující děti či mladistvé. Klinickým projevem HSN je mikroskopická či makroskopická hematurie, pouze v některých případech, podobně jako u IgA nefropatie dochází k poruše renálních funkcí (Davin, 2014). Kromě tohoto poškození pacienti mají jiné, tzv. extrarenální projevy. Bývají to petechie na kůži, petechie v GIT, zejména ve sliznici tenkého či tlustého střeva, může jít o infiltráty v plicním parenchymu (Patrick et al., 2016) Morfologicky, imunofluorescenčně a ultrastrukturálně je toto onemocnění neodlišitelné od IgA nefropatie (Kim, 2014). Jediným diferenciálně diagnostickým nástrojem je právě přítomnost či nepřítomnost extrarenálních projevů. Etiologicky se HSN řadí mezi vaskulitidy, patří do skupiny vaskulitid postihující drobné arterie, nemoc tenkých bazálních membrán a další onemocnění (Suzuki et al., 2011).

Nemoc tenkých bazálních membrán je onemocnění, které je velmi obtížně diagnostikovatelné a činí trvalé problémy jak v laboratorní diagnostice, v klinické diagnostice i v diagnostice morfologické (Povýšil et Šteiner, 2007). Pacienti s nemocí tenkých bazálních membrán mívají pouze izolovanou hematurii, hematurie bývá

většinou mikroskopická, může být však makroskopická, často pouze v atakách. Morfologicky na glomerulech nenacházíme nic nápadného, subjektivně lze říci, že bazální membrány jsou ztenčené. Imunofluorescenčně jsou většinou případy negativní. Jediným místem, kde lze s určitými problémy a rezervou toto onemocnění diagnostikovat je ultrastruktura (Gubler, 2008).

Ultrastrukturálně se prokazují tenké bazální membrány, avšak neexistuje žádná norma pro stanovení šíře bazální membrány. Jsou zde výrazné rozdíly u bazální membrány dětí, dospělých, velké individuální rozdíly jsou i v jednotlivých skupinách (Brenner, 2012). Studie, které se pokouší změřit objektivně bazální membránu glomerulů, mají poměrně rozporuplné výsledky. Jako norma pro ženy se uvádí šíře bazální membrány okolo 300 až 330 nm, u mužů okolo 350 až 460 nm podle jiných studií. Děti v časném stádiu vývoje mají šířku okolo 100 až 150 nm v době narození, okolo 200 nm zhruba v jednom roku věku (Brenner, 2012). Dospělých parametrů dosahuje bazální membrána zhruba v 11 roku věku. V originálním popisu tzv. tenkých bazálních membrán či familiární hematurie byly popisovány bazální membrány o síle kolem 150 nm (Colvin et Chang, 2016). Z výše pospaného vyplývá, že diagnostika tzv. tenkých bazálních membrán je nesmírně komplikovaná ať již z klinického či laboratorního pohledu. Situace je navíc komplikovaná tím, že v současné době se onemocnění z této skupiny řadí velmi blízko ke glomerulárním poškozením způsobeným vrozenými změnami ve složení kolagenu IV, kam se řadí dále tzv. Alportův syndrom (Jenette et al., 2015). Komentář na toto téma je zcela mimo rámec bakalářské práce.

4. Poškození ledvin při systémovém lupusu (SLE)

Při onemocnění systémového lupusu dochází k poškození celé řady tělních soustav. V současné době se systémový lupus považuje za typické onemocnění autoimunitního charakteru. Systémový lupus postihuje kůži, klouby, srdce, plíce, ledviny, CNS a serózní membrány. Způsoben je protilátkami proti součástím jádra (Weening, 2008). Pacienti obvykle kromě jiných obtíží mívají proteinurii, hematurii, dochází k poklesu glomerulární filtrace a k rozvoji jejich významné renální dysfunkce. Histologický obraz je poměrně komplikovaný a v současné době se systémový lupus

podle své morfolgie a laboratorních nálezů rozděluje do několika tříd. V současné době rozpoznáváme pět tříd s několika podtypy (Haring, 2012). Morfolgie kolísá od slabě rozšířených mesangií až po difúzní nekrotizující glomerulonefritidu, někdy s tvorbou krescent, s tvorbou ztluštělých bazálních membrán apod. (Haring, 2012).

Diagnostiku systémového lupusu je vždy nutné opřít o imunofluorescenci. Typický pacient se systémovým lupusem má tzv. full-house pozitivitu, tzn. glomeruly reagují pozitivně se všemi sledovanými imunoglobuliny, s C3. Tato depozice je nápadná, významná a dobře patrná (Wilson, 2012).

Při vyšetření ultrastruktury narážíme rovněž na variabilitu onemocnění, v průběhu vývoje názorů na systémový lupus se věřilo na velmi charakteristická depozita typu otisku prstů (fingerprint), v současné době víme, že ani tato morfolgie není stoprocentně charakteristická pro systémový lupus. V ultrastruktuře pátráme po rozložení depozice, o jeho kvalitě a zastoupení v jednotlivých glomerulech (Dhingra, 2014).

5. Vaskulitidy

Glomerulonefritidy spojené s některým z typu vaskulitidy jsou v drtivé většině případů vysoce agresivní, rychle poškozující renální funkci a destruuující parenchym (Povýšil et Šteiner, 2007). V současné době rozlišujeme dva základní typy, tzv. Pauci-*imunní krescentní glomerulonefritidu*, která je zhruba nejčastějším typem krescentních glomerulonefritid (srpký na více než 50 % glomerulů) (Jenette et al., 2015). Obvykle se vyskytuje u dospělých pacientů, přes 70 % pacientů je starší 60 let věku. Většina pacientů s tzv. Pauci-*imunní krescentní glomerulonefritidou* jsou ANCA pozitivní (antineutrophil cell antibodies). Obvykle je spojeno se systémovou vaskulitidou (Ford, 2014). Pacienti s Pauci-*imunní krescentní glomerulonefritidou* se projeví velmi rychlou progresivní glomerulopatií s hematurií, proteinurií a se zvýšením kreatininu. Tyto pacienti mají typicky nekrotizující a krescentní glomerulonefritid (Povýšil et Šteiner, 2007). Pouze malé množství těchto pacientů má sklerotizující typ poškození. Imunofluorescence je typicky negativní (Colvin et Chang, 2016), jediný marker, který nacházíme, bývá fibrin, který se vychytává v srpcích a poškozených kličkách glomerulů. Velmi vzácně lze najít například IgG depozici v mesangiu (Krejčí et al., 2011) . V současné době je definice tzv. ANCA vaskulitid poměrně komplikovaná.

Jako ANCA asociovaná vaskulitida se označuje onemocnění s nekrotizující vaskulitidou bez imunodepozice, predominantně poškozuje malé cévy (kapiláry, venuly, arterioly a malé arterie). Ne všichni pacienti mají jasně definovatelnou prezenci ANCA protilátek (Jennette et al., 2011).

Další podskupinou je tzv. mikroskopická polyangiitida, která je charakteristická nekrotizující vaskulitidou s žádnými nebo minimem imunitních depozit, převážně poškozuje malé arterie (Jenette et al., 2015). Zde je velice častá nekrotizující glomerulonefritida, poškození plicního parenchymu. Granulomatóza s polyangiitidou je nekrotizující granulomatózní zánět, který postihuje horní a dolní respirační trakt a současně se vyskytuje nekrotizující vaskulitida, která poškozuje predominantně malé a střední cévy (Colvin et Chang, 2016).

Nekrotizující glomerulonefritida je zde velmi častá. Tzv. eozinofilní granulomatóza s polyangiitidou (Colvin et Chang, 2016). Jde o nekrotizující granulomatózní zánět bohatý na eozinofilní leukocyty. Poškozuje respirační trakt a současně jde o nekrotizující vaskulitidu postihující malé a střední cévy. Často je spojeno s asthma bronchiale s eozinofilií. U těchto pacientů jsou přítomny ANCA protilátky velmi často, pokud je současně přítomna glomerulonefritida (Tesař et Viklický, 2015).

Toto je základní dělení glomerulopatií podle nejčastějších etiologických či morfologických znaků. Existuje celá řada dalších poškození glomerulů, jejich výčet však stojí mimo rámec bakalářské práce.

6. Biopsie ledvin transplantovaných

Biopsie ledviny je jediný způsob, kterým lze dojít k přesné diagnóze rejekce, popř. nerejekčních procesů ovlivňující funkci transplantované ledviny. Punkční biopsie se indikuje v případě jakýchkoliv dysfunkcí štěpu, dále se ledviny bioptují tzv. protokolárně, tzn. nehledě na funkčnost po třech měsících od transplantace, po roce od transplantace a po třech letech od transplantace. Tyto tzv. protokolární biopsie slouží k zachycení subklinických rejekčních projevů a dalších možných problémů s ledvinou

(Třeška et al., 2008). Transplantovaný orgán (pokud nejde o autologní transplantaci), v případě ledviny by se muselo jednat o jednovaječné dvojče, není nikdy tělem přijat a rozbíhá se rejekční proces od první vteřiny kontaktu s příjemcem. Z tohoto důvodu naprosto zásadní je vedení imunosuprese tak, aby mohl fungovat alespoň zhruba normálně a aby byla potlačena snaha o vyloučení štěpu (Viklický et al., 2008).

6.1. Rejekce transplantované ledviny

Rejekci lze v podstatě dělit podle několika kritérií. Jednak je to kritérium časové, kdy se rozlišuje tzv. hyperakutní rejekce, rejekce akutní a rejekce chronická (Viklický et al., 2008). Tyto procesy nejsou nikterak, respektive jsou jen velmi málo ovlivněny časem, spíše se jedná o způsob, respektive mechanismus rejekce, než o časový údaj. Nejde tedy o paralelu zánětu. Rejekci dále můžeme dělit podle efektorů na tzv. humorální (detekovatelnou pomocí protilátek proti C4d) a rejekci celulární (Ruiz, 2009). Rejekční proces dále může postihovat všechny kompartmenty ledviny, rozeznáváme tedy rejekci intersticiální, tubulární, vaskulární a rejekci glomerulární. Rejekce glomerulární prakticky vždy souvisí s rejekcí vaskulární (Tesař et Viklický, 2015).

6.1.1. Hyperakutní rejekce

Hyperakutní rejekce je vždy rejekcí humorální (Hořejší, 2013), v současné době se s nimi prakticky nesetkáváme, jelikož existuje řada mechanismů, kterými se snažíme vzniku hyperakutní rejekce zabránit. Pro vznik humorální rejekce jsou důležité tzv. preformované protilátky u tzv. senzitivizovaných osob (Hořejší, 2013). Tyto senzitivizované osoby se již v minulosti setkaly s antigeny totožnými, popř. podobnými antigenům štěpu. Mezi ohrožené pacienty patří pacienti, kteří již podstoupili transplantaci ledviny, kteří někdy podstoupili transfuzi krve či krevních derivátů, vícerodičky, mladší lidé apod. (Tesař et Viklický, 2015). Pro zabránění vzniku tzv. hyperakutní humorální rejekce se rutinně dělá tzv. cross-match, kdy se vzájemně kříží antigeny příjemce a dárce a zkoumá se reaktivita oběma směry (Colovai et al., 2005). Tímto způsobem se odhalí event. preformované protilátky, respektive jejich část. Hyperakutní humorální rejekce nastává řádově několik vteřin po zpřístupnění krevního

toku příjemce do štěpu (Hořejší, 2013). Ledvina začne být edematózní, lividní, překrvená, nedojde k rozběhnutí renální funkce a štěp musí být tzv. explantován (odstraněn) (Krejčí et al., 2011).

6.1.2. Akutní rejekce

K rozvoji akutní celulární rejekce dochází řádově ve dnech po implantaci štěpu hostiteli. K rejkci dochází většinou kolem šest až sedm dní po transplantaci, což je z diferencíálně diagnostického pohledu období nejméně vhodné, jelikož obraz celulární rejekce lze snadno zaměnit za obraz akutní tubulární nekrózy, tj. nerejekční poškození ledviny při manipulaci před a v průběhu transplantace (Colovai et al., 2005).

6.1.2.1. Akutní intersticiální rejekce

Akutní rejekce může být intersticiální, kdy v intersticiu nacházíme edém a poměrně denzní monotónní lymfocytární či lymfoplazmocytární celulizaci. Tato celulizace může být difúzní, může být soustředěna poměrně do kompaktních okrsků, tyto kompaktní okrsky jsou většinou lokalizovány do okolí postkapilárních sinů (El Ters et al., 2013).

6.1.2.2. Akutní tubulární rejekce

Tubulární rejekce má několik podob. Nejvěrnější podoba je tvořena kulatobuněčnými rejekčními elementy, které přechází přes bazální membránu tubulů a nedochází u nich k významnější destruktivní aktivitě v tubulárním aparátu (Bonsib, 2000). Tento obraz může být velice vzácný, lymfocytů však může být větší množství, může docházet k destrukci epitelii či bazální membrány. Tento stav se označuje jako tzv. tubulitida (Ruiz, 2009). Tyto změny nejsou difúzně distribuovány v ledvinné kůře, často se vyskytují v jakýchsi skupinách či mozaikovitém vzorci (Colvin et Chang, 2016).

6.1.3. Vaskulární rejekce

Vaskulární rejekce postihuje v ledvině arterie (Povýšil et Šteiner, 2007). Nejmírnější, suspektní obraz je v okamžiku, kdy endotel arterií či arterioly je

hyperplastický, popřípadě edematózní s nasedajícími monocyty na povrch. V rozvinutých případech dochází již k transpolárním nekrotickým a k destrukci stěny arterie (Shimizu, 2012).

6.1.4. *Glomerulární rejekce*

Glomerulární rejekce má rovněž řadu podob, glomerulární rejekce začíná jako jakési voštinovité rozšíření mesangia glomerulů, celulizace v této fázi je prakticky normální. Tato fáze byla v dřívějších klasifikacích rozpoznávána, dnes je sice rozpoznávána, avšak není zanesena do oficiální BANFF-klasifikace (Ruiz, 2009). Glomerulární rejekce může mít podobu endovaskulární proliferace s nasedáním monocytů na endotel až po transmurní nekrózy kapilárních kliček (Sentís et al., 2015).

6.1.5. *Humorální rejekce*

Humorální rejekce je vzácnější (zejména díky profylaxi) (Tesař et Viklický, 2015). Nejmírnější fáze humorální rejekce se projevuje vychytáváním protilátek proti C4d komplementu v peritubulárních kapilárách (Sellarés et al., 2011). V peritubulárních kapilárách je toto imunohistochemické vychytávání lineární, je tzv. „obtažena“ endoteliální část kapilár. V okamžiku, kdy pozitivita má vzhled jednotlivých teček (není podstatný typ vizualizace rejekce), označuje se to jako tzv. granulární pozitivita, takovýto obraz je nutno považovat za falešně pozitivní (Salvadori et Bertoni, 2013). Skutečná pozitivní reakce s C4d na peritubulárních kapilárách je tzv. lineární (obraz obtažení bazální membrány) (Krejčí, 2011). Kromě barvení je možné zaznamenat projevy jasné morfologické znaky s edémem endotelu či s nekrotickou peritubulárních kapilár (Colvin et Chang, 2016).

6.1.6. *Chronický rejekční proces*

Banffská klasifikace dělí chronické rejekce na aktivní humorální a celulární rejekci, kterou zprostředkovávají T- lymfocyty (Solez et al., 2007). Chronická rejekce zapříčiňuje postupné selhávání funkce štěpu, což se projeví zvýšením proteinurie a hypertenzí (Viklický et al.,2008).

Chronický proces rejekce se vyskytuje především v tubulointerstiální komponentě (Bhatti et Usman, 2015). Dochází k fibrózní přestavbě intersticia s různě

denzním lymfoidním infiltrátem, postupně dochází k zániku tubulů a k nahrazování funkčního renálního parenchymu fibrózní tkání (Moreso et al., 2006). Tubulární aparát postupně atrofuje, tubuly se z počátku tzv. nediferencují, tzn. není možné rozpoznat, zda se jedná o proximální či distální tubulus a později atrofují až vzniká např. obraz štítné žlázy v renálním parenchymu (Tesař et Viklický, 2015). Chronická vaskulární rejekce má částečně jiný vzhled, než akutní. V arteriích dochází k ztlušťování především medie, arterie, arterioly jsou denzní, rozšířené, s kolaterální proliferací fibroblastů. U některých zejména pokročilejších případu chronické vaskulární rejekce nacházíme skupiny pěníých histiocytárních elementů ve stěně tepny (Kozakowski, 2009).

6.1.6.1. Glomerulární rejekce

Chronická glomerulární celulózní rejekce má morfologický adekvát v rozštěpech bazálních membrán glomerulů. V optické mikroskopii jsou bazální membrány glomerulárního trsu širší, pokud použijeme barvením stříbrem nebo PAS, nacházíme tzv. rozštěp (Ruiz, 2009). Tento rozštěp se klasicky přirovnává k tramvajové či trolejbusové dráze (tzv. tram-tracking). Tyto dvojité kontury bazálních membrán se mohou vyskytnout buď difúzně v glomerulu, popř. segmentálně v glomerulu (Stegall et al., 2012). Tento typ rejekce může mít doprovodné C4d barvení. C4d vykazuje u části těchto případů typickou granulární pozitivitu na bazální membráně podél kapilárních kliček (Puttarajappa et al., 2012).

6.1.7. Barvení na C4d

Barvení na C4d je možno provádět dvěma způsoby. Jednak se provádí z nativní nefixované ledviny na zmrazeném řezu a vizualizuje se imunofluorescenčně (Viklický et al., 2008). Tato metodika má výhodu okamžitého poskytnutí výsledku, tzn. v průběhu cca 5 hodin od náběru vzorku máme k dispozici výsledek. Nevýhodou je, že vzorek je nutno rozdělit. Vzorek se rozděluje nativně, tzn. není nabarven, je tedy možné přehlédnout či neodebrat správnou část ledviny. Navíc se tento fragment vzorku provždy znehodnocuje pro další vyšetření. Je tedy vždy nutné zvážit, zda indikace imunofluorescenčního vyšetření na C4d je skutečně správně zadaná a zda nepřinese více škody než užitku (Tesař et Viklický, 2015). Preparáty jsou netrvalé, prohlíží se pod UV zářením a pozitivní vzorky svítí zeleně.

V současné době používáme histoscanning i u imunofluorescenčních preparátů, což má výhodu jednak možného vzdáleného přístupu a odečtení na dálku pomocí počítačového programu a dále je natrvalo uložena evidence o zpracování. Druhou možností je v současné době imunohistochemická reakce na parafinovém materiálu. V současné době jsou již protilátky natolik kvalitní, že není významného rozdílu v sensitivitě imunofluorescence či klasické parafinové imunohistochemie. Jakkoliv imunofluorescence je nepatrně citlivější. Výhodou je dobrý přehled o vzorku (i C4d pozitivita není většinou difúzní, bývá fokální a v drobném vzorku je možné ji minout – tzv. sample error) (Krejčí et al., 2011). Parafinovou imunohistochemii vidíme druhý den po odběru, prodlení tedy není vysoké. Přesto však existují indikace (před víkendem, skutečně vysoká suspekce a humorální rejekce, svátky apod.), kdy imunofluorescenční vyšetření zcela rutinně využíváme a je plně indikováno. Imunofluorescenční stanovení C4d je teoreticky citlivější, nepochybně rychlejší. Velkým limitem je zde velikost vzorku, s tzv. sample-error, který může významně ovlivnit diagnostický proces. Z tohoto důvodu i u pacientů, kde bylo provedeno imunofluorescenční vyšetření C4d indikujeme rovněž imunohistochemické vyšetření na celém vzorku. U transplantovaných pacientů se jen vzácně využívá celý panel imunofluorescenčního vyšetření, a to zejména u pacientů, kde hrozí rekurence, či de novo onemocnění původní ledviny apod. Většinou jde o pacienty s proteinurií větší než 1,5g za den.

6.2. Nerejekční poškození transplantované ledviny

Nejzásadnější, nejklassičtější a prakticky vždy alespoň v malé míře přítomné poškození ledviny nerejekčním systémem je tzv. akutní tubulární nekróza.

6.2.1. Akutní tubulární nekróza

Akutní tubulární nekróza vzniká v době tzv. teplé ischemie (Schiffl, 2006). Teplá ischemie je stav, kdy ledvinou neproudí krev, popř. proudí krev nedostatečně okysličená. Jedná se tedy o manipulaci se štěpem při vyjímání z dárce, transport štěpu a následná operace, tzn. vkládání štěpu do hostitele (Třeška et al., 2008). V případě dlouhých manipulačních časů mimo chladné prostředí dochází k poškození tubulární výstelky. Tubulární výstelka často vizuálně je poškozena minimálně, následně však

dojde k jejímu poškození při obnovení krevního proudu ledviny ve štěpu. Akutní tubulární nekróza se v maximální míře projevuje zhruba šestý až sedmý den po transplantaci. Je někdy velmi obtížně odlišitelná od celulární akutní tubulointersticiální rejekce. Rizikové štěpy se bioptují v tzv. nula hodinu, tzn. v období, kdy se vyjímají z dárce (Třeška, 2008). Zde se hodnotí stupeň akutní tubulární nekrózy a lze pak zareagovat na poškození v době těsně po rejekci (Krejčí et al., 2011). Akutní tubulární nekróza může nastat i v průběhu života štěpu v delším časovém odstupu po transplantaci a to v době kdy z jakýchkoliv důvodů dojde k poklesu krevního tlaku či saturace krve kyslíkem (pneumonie, hypotenze, hypovolemie apod.).

6.2.2. *Polyomaviróza*

Dalším standardně vyšetřovaným poškozením štěpu je polyomaviróza, resp. napadení štěpu polyomavirem SV40. Tento polyomavirus je běžně přítomen v populaci. Populace s normální imunitou tento vir snadno eliminuje. U pacientů v imunosupresi se uvádí, že zhruba od třetího až čtvrtého měsíce je prakticky každý pacient nakažen aktivní virózou, resp. se u něj aktivní vir replikuje (Třeška et al., 2008). V případě, že dojde k poškození štěpu, je možné tyto virem napadené buňky detekovat pomocí imunohistochemie. Rutinně se barví každý štěp na přítomnost polyomaviru. Používáme rutinně protilátku pro stanovení z parafinu proti polyomaviru SV40. Pozitivní případy se barví v jádře napadených epitelíí tubulů, popř. glomerulů. Vždy je zde přítomno poměrně malé množství pozitivních buněk, vždy existuje tzv. sample error a je tedy nutno přistupovat k diagnostice velice pečlivě (Colvin et Chang, 2016).

V naší Fakultní nemocnici imunohistochemické vyšetření doplňujeme rutinně vyšetřováním molekulárně-genetickým, kdy provádíme PCR z krve, moči a ze zbytku vzorku ledviny pacienta. Je to způsobeno tím, že neexistuje jasná kvantifikace nálože, resp. kvantifikovat nálož viru ve vzorku je možné, není však zcela jasné, kdy jde o patologii, kdy nikoliv (již jsme uvedli, že prakticky každý transplantovaný pacient má v sobě replikující se populaci polyomaviru). Z tohoto důvodu kombinujeme klinický obraz, imunohistochemické vyšetření parafinové tkáně a přítomnost a výšku nálože v moči, krvi pacienta. Po korelaci těchto pěti faktorů lze s velkou jistotou říci, zda jde o aktivní infekci ve štěpu či nikoliv.

7. Histoscanning

Scannování histologických preparátů je součástí telepatologie nebo digitální patologie, jejímž cílem je přenesení mikroskopického obrazu v digitální podobě z místa vzniku, tedy pracovního místa na počítačový monitor jiného, vzdáleného pracoviště. Tato technologie umožňuje získat digitální obraz histologického preparátu a dále jej pomocí počítačové sítě analyzovat, sdílet a ukládat do databází (Dee, 2009).

Telepatologie je možné rozdělit na dvě součásti: „real-time“ a „store-and-forward“. První směr, tedy „real-time“ probíhá v reálném čase a je využíván k určení dianózy na dálku za účasti více odborníků. Druhý směr, „store-and-forward“ využívá uložená data, ke kterým mají přístup další odborníci a přístup je možný kdykoliv (Ling, 2012).

Preparát pro telepatologii může vzniknout buď jako digitální preparát nebo pomocí slide scannerů, tedy pomocí histoscannu. Digitální preparát je vytvořen pomocí dálkově ovládaného mikroskopu a obraz se přenáší pomocí počítače a internetové sítě (Dee, 2009). Histoscanning histologických preparátů probíhá ve formátu 3D. Snímání skel je panoramatické pomocí dvou objektivů pro zvětšení 20x a 40x. Rychlost snímání skel závisí na počtu řezů na skle a velikosti snímaného preparátu. Při snímání fluorescenčních preparátů se používá jako světelný zdroj LED zdroj s proměnnou vlnovou délkou, takže např. pro FITC, TRITC, DAPI, tj. pro různé fluorescenční látky (DAPI se používá pro molekulárně genetické preparáty), plně postačuje multiband filtr. Pro odečítání preparátů, které jsou barvené protilátkou označenou FITC, se při prohlížení navolí vlnová délka 495 nm, pro imunofluorescenční preparáty se používá nejčastěji (Cibíček et al., 2014). Po spojení požadované vlnové délky, která je nastavena v servisním programu scanneru a multiband filtru se ukládá jako virtuální filtr. Scanner má možnost šesti dalších pozic speciálních filtrů. Z tohoto následně vychází výhoda obrovského zrychlení při scannování více barev, kdy se fyzicky nemění filtr, ale mění se pouze vlnová délka a lépe se pracuje s expozicí. Samotné zachycení obrazu pak řeší speciální UV kamera (Ling, 2012). Největší výhodou scannování imunofluorescenčních preparátů se stala možnost ukládání jejich digitálního obrazu, protože do této chvíle bylo uchování těchto preparátů nemožné. Další formou telepatologie je hybridní telepatologie. Hybridní telepatologie je kombinací systémů store-and-forward a real-time, kdy je celý soubor snímků spojen do jednoho formuláře a

následně přenášen. Tento systém je možný využívat při robotických operacích (Ling, 2012). Velké využití telepatologie spočívá hlavně v odečítání špatně uchovatelných preparátů, jako jsou cytologické a imunofluorescenční preparáty. U cytologických preparátů je problémem barevná nestálost, u imunofluorescenčních preparátů je problémem krátkodobá svítivost. Přínos dynamické telepatologie, tzn. systém real-time, spočívá hlavně v operačních konzultacích několika odborníků najednou během operace nebo v odečtu peroperačních biopsií. Velkou nevýhodou dynamické telepatologie je finanční náročnost na vybavení (Dee, 2009).

Telepatologie se stává velmi přínosnou i pro výuku. Díky histoscanningu je možné uchovávat i preparáty s krátkou trvanlivostí, hlavně imunofluorescenční preparáty. Nascannované preparáty je potom možné kdykoliv použít pro výuku (Ling, 2012) nebo pro konzultaci a nemusí se řešit otázka zničitelnosti preparátů a tedy i neustálého dokrajování, kterým se mnohdy přichází o velmi cenný histologický materiál. Telepatologie napomáhá řešit i otázku nedostatku zkušených patologů, hlavně v menších nemocnicích. Zde je však opět limitem finanční otázka potřebného vybavení (Dee, 2009). Histoscanning umožňuje přenos digitálního obrazu preparátů na jakoukoliv vzdálenost. Limitem je pouze kvalita internetového připojení a následného načtení preparátu.

8. Cíl práce

Porovnávání preparátů renálních biopsií, ledvin vlastních a transplantovaných, klasickou optickou mikroskopií a virtuální mikroskopií.

Porovnávání využití všech uvedených metodik a jejich následné modifikace pro převedení reálného obrazu do digitální podoby.

9. Hypotézy

H1: Odečítání digitálního obrazu histologických a imunohistochemických preparátů je kvalitativně stejné jako v optické mikroskopii.

H2: Odečítání fluorescenčních preparátů z digitálního obrazu je obtížnější než v optické mikroskopii.

10. Metodika

10.1. Materiál

Vzorky renálních punkcí byly získány od pacientů I.interní kliniky FN Plzeň a jsou zde zahrnuty vzorky od pacientů s vlastní ledvinou a od pacientů s transplantovanou ledvinou. Renální biopsie se zpracovává ihned pro všechny dále uvedené techniky na pracovišti ŠÚP FN Plzeň Lochotín. Data od každého vzorku byly zaznamenávány ihned po zpracování a následném odečtení vzniklého preparátu. Pro scannování jsou vzorky odesílány na externí pracoviště v Bioptické laboratoři v Plzni. Vzorky a data o zaznamenaných vzorcích byla sbírána téměř od úplného počátku zavedení histoscanningu histologických a hlavně imunofluorescenčních preparátů na ŠÚP FN Plzeň, tzn. v období od září 2015 do prosince 2016. Početní rozložení vzorků je uvedeno v tabulce (tab.1).

Tab. 1 *Zpracované renální biopsie*

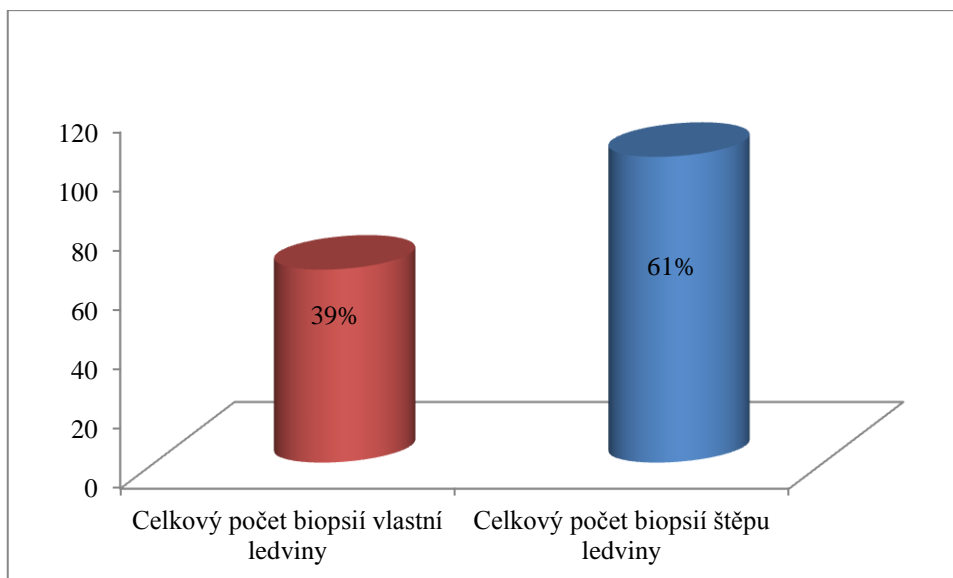
	Počet	V procentech
Biopsie 9. - 12. 2015	27	16%
Biopsie 1. - 12. 2016	141	84%
Celkem	168	100%

(Zdroj: ŠÚP FN Plzeň)

Tab. 2 *Biopsie vlastních a transplantovaných ledvin*

	Počet	V procentech
Celkový počet biopsií vlastní ledviny	65	39%
Celkový počet biopsií štěpu ledviny	103	61%
Celkem	168	100%

(Zdroj: ŠÚP FN Plzeň)



Obr. 1 *Procentuální vyjádření počtu vlastních a transplantovaných ledvin. (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň)*

10.2. Zpracování renální biopsie

Renální biopsie se v převážné většině odebírá core technologií, transkutánní punkcí a otevřená biopsie se v současné době prakticky nepoužívá, otevřenou biopsii používáme pouze při diagnostice dárcovských ledvin pro transplantaci.

Perkutánně získaný vzorek je transportován na vlhké gáze namočené ve fyziologickém roztoku, vše je nutné neustále chladit. Materiál po doručení na oddělení patologie je nativně prohlédnut pod mikroskopem a rozdělen následujícím způsobem: největší část se používá pro optickou mikroskopii, menší část pro imunofluorescenci a poslední díl pro ultrastrukturu. Vždy se snažíme dohledat v nativní nebarvené tkáni glomeruly, tak aby byly glomeruly přítomny ve všech třech vzorcích. V případě, že je vzorek méně kvalitní, upřednostňuje se optická mikroskopie a imunofluorescence. U ledvinového štěpu se punkce rozděluje pro vyšetření metodami z parafinového bloku, dále pro nepřímou a přímou imunofluorescenci v případě potřeby a na molekulárně genetické vyšetření.

Po rozdělení punkce se jednotlivé části fixují vhodným fixačním činidlem. Část punkce pro parafinový blok se fixuje pufrovaným formaldehydem a dále se zpracovává běžným histologickým procesem ve tkáňovém procesoru. Část pro elektronovou

mikroskopii se fixuje 4% paraformaldehydem, část na molekulárně genetické vyšetření se pouze zmrazí. Punkce na imunofluorescenci se nefixuje, stále však být musí vlhčena pufovaným fyziologickým roztokem.

Část vzorku, která je určena pro zpracování parafinovou metodou, se barví základním přehledným hematoxylin-eosinovým barvením a speciálními histologickými metodami - barvením na PAS, které prokazuje bazální membrány, impregnace stříbrem dle Jonese ke znázornění bazálních membrán, modrým trichromem na průkaz kolagenního vaziva a kongo červeň (AK) na průkaz amyloidu. Takto se barví standardně všechny vzorky.

Imunofluorescenční panel zahrnuje IgA, IgG, IgM, C3, C1q a Kappa a Lambda lehké řetězce. V současné době je praxe rychlého obarvení hematoxylin-eosinu a imunofluorescence v den odběru.

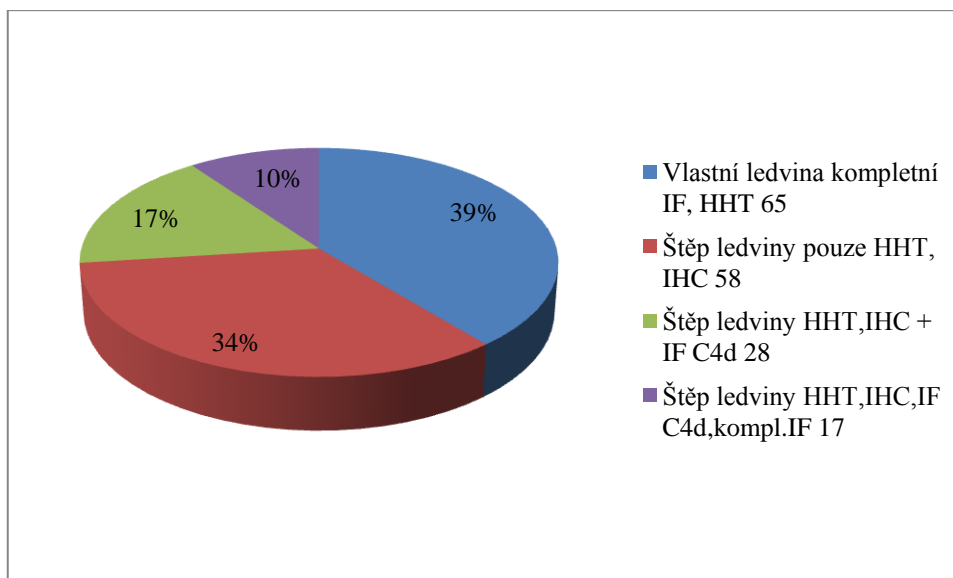
V den odběru se telefonicky konzultuje s klinickým lékařem možná diferenciální diagnóza. Zbytek preparátů je doručen druhý den. Druhý den je ve většině případů uzavřena diagnóza definitivně. Ultrastruktura většinou slouží k potvrzení diagnózy z optické mikroskopie a z imunofluorescence, pouze v některých případech je ultrastrukturální vyšetření naprosto zásadní. Např. u membranózní glomerulonefritidy, u membranózněproliferativní glomerulonefritidy či amyloidózy patří k zásadním sdělením.

U transplantovaných ledvin se kromě výše uvedené sady ještě barví imunohistochemická sada: zde vyšetřujeme přítomnost polyomaviru SV40, cytomegaloviru CMV a protilátek C4d a p53.

Tab. 3 *Požadovaná vyšetření*

Biopsie	Požadované vyšetření	Počet	V procentech
Vlastní ledvina	kompletní IF, HHT	65	39%
Štěp ledviny	pouze HHT, IHC	58	34%
Štěp ledviny	HHT,IHC + IF C4d	28	17%
Štěp ledviny	HHT,IHC,IF C4d,kompl.IF	17	10%
Celkem		168	100%

IF- imunofluorescence, HHT- histochemické metody, IHC- imunohistochemie, IF C4d- imunofluorescence pouze C4d protilátky(Zdroj: ŠÚP FN Plzeň)



Obr. 2 Procentuální vyjádření požadovaných vyšetření. (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň)

10.3. Metody

10.3.1. Zpracování punkce pro zhotovení parafinového bloku

Část nativní punkce, určenou pro histologické zpracování, fixovanou pufrovaným formaldehydem se odvodní a prosytí parafinem ve tkáňovém procesoru Leica ve zkráceném programu. Na zalévací lince se punkce zalije do parafinu a po vychlazení se parafinový blok upne do mikrotomu a krájí se řezy o síle 1 μ m na histologické metody a imunohistochemii, kromě metody AK, kdy se používají řezy o síle 5 μ m. Preparáty se posléze barví dle následujících postupů. (SOPV/SUP/001/VERZE 07)

Postup barvení Hematoxylin – Eosin:

1. odparafínování
 2. Gillův hematoxylin – 7 minut
 3. diferenciacce
 4. praní ve vodě 7 minut
 5. Eosin – 1 minut
 6. oplach ve vodě
 7. odvodnění a montování
- (PPZ/SUP/003/04)

Postup barvení na PAS:

1. odparafínování až do destil. vody
 2. 0,5% kys. jodistá – 9 minut
 3. oplach v destil. vodě
 4. Schifovo reagens – 9 minut
 5. praní ve vodě – 9 minut
 6. dobarvení jader Gillovým hematoxylinem
 7. odvodnění a montování
- (PPZ/SUP/019/04)

Postup barvení na modrý trichrom:

1. odparafínování až do 70% alkoholu
 2. Veigertův hematoxylin – 10 minut
 3. praní ve vodě – 10 minut
 4. kyselý fuchsin + Ponceau v poměru 1:2 – 20 s
 5. oplach destil. vodou
 6. kys. fosfomolybdenová – 5 minut
 7. anilinová modř bez oplachu – 5 minut
- obarvení anilinovou modří je nutné kontrolovat pod mikroskopem
8. odvodnění a montování
- (PPZ/SUP/052/03)

Postup impregnace dle Jonese:

1. odparafinování až do destil. vody
 2. 0,5% kys. Jodistá
 3. impregnační roztok stříbra – 90 + 30 minut (dále dle potřeby) v 60°C
 4. oplach v přehřáté destil. vodě
 5. oplach ve studené destil. vodě
 6. 2% chlorid zlatitý – 2 minuty
 7. oplach destil. vodou
 8. sirnatán sodný – 2 minuty
 9. oplach destil. vodou
 10. 0,5% kys. jodistá – 9 minut
 11. Schifovo reagens – 20 minut
 12. praní ve vodě – 20 minut
 13. dobarvení jader Gillovým hematoxylinem
 14. odvodnění a montování
- (PPZ/SUP/012/03)

Postup barvení na AK:

1. odparafinování a předbarvení Gillovým hematoxylinem
 2. oplach destil. vodou
 3. nasycený 80% alkohol + 0,2 ml NaOH – 20 minut
 3. Kongo červeně + 0,2 ml NaOH – 20 minut
 5. oplach 96% alkoholem – 3x
 6. po oschnutí preparátu montování
- (PPZ/SUP/050/02)

10.3.2. *Imunohistochemické vyšetření*

Imunohistochemické barvení se provádí v imunostieneru - Moderní barvicí systém Bench Mark ULTRA od firmy Ventana Medical Systems, Inc. Na každé barvení příslušnou protilátkou je zhotoven konkrétní protokol (SOPV/SUP/005/VERZE 06).

SV 40 (MRQ-4); Monoclonal Mouse od firmy Cell Marque

C4d Polyclonal Rabbit od firmy Cell Marque

CMV (CCH2+DDGG); Anti-Cytomegalovirus; Monoclonal Mouse od firmy Dako

P53 (DO-7); Anti-Human p53 Protein; Monoclonal Mouse od firmy Dako

10.3.3. *Imunofluorescenční vyšetření*

Část punkce určená k imunofluorescenčnímu vyšetření se nefixuje. Pro imunofluorescenci se z punkce zhotovují zmrazené řezy pomocí kryostatu. Punkce se položí do vrstvy tkáňového lepidla, které je naneseo na kryostatový stoleček. V tekutém dusíku se tkáň namrazí. V kryostatu se krájí zmrazené řezy o síle 3µm a nanášejí se na podložní skla.

U vyšetření vlastní ledviny se používá panel protilátek Anti- Human Ig A, Ig G, IgM, C3, C1q, Kappa, Lambda/FITC (Polyclonal Rabbit) od firmy Dako značené fluoresceinem. Na tyto protilátky se používá princip přímé fluorescence, kdy se značená protilátka přímo váže na specifický antigen ve tkáni. Takto vzniklý komplex je možné prohlížet ve fluorescenčním mikroskopu.

Při vyšetření ledvinového štěpu se používá metoda nepřímé imunofluorescence pro průkaz protilátky C4d. Nepřímá imunofluorescence probíhá ve dvou fázích. V první fázi, kdy vzniká komplex protilátky se specifickým antigenem, používáme protilátku Anti human C4d Antibody od firmy Biomedica (Polyclonal Rabbit). Ve druhé fázi se na vzniklý komplex se naváže protilátka značená fluorescenčním barvivem, používáme protilátku Alexa Fluor 488 (Goat Anti- Rabbit IgG Antibody) od firmy Thermo Fisher. Takto označený komplex je odečitatelný ve fluorescenčním mikroskopu. (SOPV/SUP/006/VERZE 05)

Postup přímé imunofluorescence:

1. oplach preparátů v PBS pufru min.- 10minut
2. aplikace naředěné protilátky v poměru 1:20 - 10 μ l protilátky + 200 μ l PBS pufru
3. inkubace protilátky 30min bez přístupu světla
4. oplach preparátů v PBS pufru min.- 20minut
5. montování a pokrytí preparátu vhodným činidlem pro fluorescenci

Postup nepřímé imunofluorescence:

1. oplach preparátů v PBS pufru min.- 10minut
2. aplikace naředěné protilátky antiC4d v poměru 1:20
3. inkubace protilátky 60minut bez přístupu světla
4. oplach preparátu v PBS pufru min.- 20minut
5. aplikace protilátky značené fluorescenčním barvivem v poměru 1:20
6. inkubace protilátky 60minut bez přístupu světla
7. oplach preparátu v PBS pufru min.- 20minut
8. montování a pokrytí preparátu

PBS pufr:

PBS pufr je používán jako ředící roztok pro protilátky používané při přímé i při nepřímé imunofluorescenci a jako oplachovací roztok.

Postu přípravy roztoku:

Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O	2,9g
KH ₂ PO ₄	0,2g
NaCl	8,0g
KCl	0,2g

Do 1l destilované vody.

(PPZ/SUP/044/02)

10.3.3.1. Výsledek imunofluorescenčního barvení

Jako pozitivní výsledek považujeme zelenou imunofluorescenční barvou (na temném pozadí) zvýrazněné struktury. Při hodnocení positivity nebo negativity je nutné sledovat histologické poměry v okolí, kdy je třeba znát morfologii pozitivních výsledků. Granulární pozitivita může být skutečným pozitivním výsledkem(např. IgG u membranózní glomerulonefritidy), u jiného případu nemusí být za skutečnou pozitivitu považována, nemá žádný diagnostický význam (např. C4d u humorální rejeckce). Vždy je nutné odlišit artefakty. Pro některá komplikovaná barvení (C4d) je většinou k dispozici vnitřní kontrola – mesangium glomerulů. Tento není přítomen u 100% renálních štěpů, takže posuzování je někdy komplikované.

10.4. Histoscanning

V naší pilotní studii jsme porovnávali hodnocení materiálu z biopsií ledvin nativních a transplantovaných pomocí klasické mikroskopie, tzn. optickou mikroskopií hodnotící základní barvení hematoxylin-eosin a speciální barvení, včetně imunohistochemického barvení. Dále jsme využili imunofluorescenční techniky hodnocené také v klasickém optickém mikroskopu.

V následujících tabulkách (tab.4 a tab.5.), jsou na deseti pilotních vzorcích transplantovaných ledvin, zaznamenány shody při hodnocení preparátů optickou mikroskopií a histoscanningu a početní vyjádření shody u imunofluorescenčních preparátů. V tabulkách 6. a 7. jsou záznamy deseti vzorků vlastních ledvin.

Tab.4 Porovnávání optických a digitálních preparátů transplantovaných ledvin

Číslo vzorku				
Porovnání opt./scan.	HHT	C4d IHC	C4d IF	IF: Protilátka / Shoda
Vz. 1	xxx	xxx	x	nepožadována
Vz. 2	xxx	xxx	o	nepožadována
Vz. 3	xxx	xxx	x	IgA xx, C3 x, C1q xx
Vz. 4	xxx	xxx	xx	nepožadována
Vz. 5	xxx	xxx	o	nepožadována
Vz. 6	xxx	xxx	x	nepožadována
Vz. 7	xxx	xxx	xx	vše xxx
Vz. 8	xxx	xxx	xxx	nepožadována
Vz. 9	xxx	xxx	xxx	nepožadována
Vz. 10	xxx	xxx	xx	C3 xx, C1q xx

Vyjádření shody u jednotlivých protilátek: úplná shoda xxx, shoda xx, méně shoda x, neshoda o.

HHT-histochemie; IHC-imunohistochemie; C4d IF-imunofluorescence na C4d; IF-název protilátky+vyjádření shody

V posledním sloupci jsou vyjádřené všechny ostatní shody než úplné shody.

(Zdroj: ŠÚP FN Plzeň).

Tab.5 Shody u imunofluorescenčních preparátů početně u identických 10 vzorků

	C4d IF	IF: Protilátka / Počet shod
Úplná shoda	2	IgA 2, IgG 3, IgM 3, C3 1, C1q 1, KpLb 3
Shoda	3	IgA 1, C3 1, C1q 2
Méně shoda	3	C3 1
Neshoda	2	0

(Zdroj: ŠÚP FN Plzeň)

Tab. 6 Porovnání optických a digitálních preparátů vlastních ledvin

Číslo vzorku							
Porovnání opt./scan.	HHT	IgA	IgG	IgM	C3	C1q	Kp + Lb
Vz. 1	xxx	x	x	xx	x	x	xx
Vz. 2	xxx	o	x	xx	o	o	xx
Vz. 3	xxx	o	x	xx	x	x	xx
Vz. 4	xxx	xx	xxx	xxx	xxx	xx	xxx
Vz. 5	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	xxx
Vz. 6	xxx	x	xxx	xx	o	o	xx
Vz. 7	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	xx	xxx
Vz. 8	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
Vz. 9	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
Vz. 10	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx

Vyjádření shody u jednotlivých protilátek: úplná shoda xxx, shoda xx, méně shoda x, neshoda o. (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň)

Tab. 7 Shody u imunofluorescenčních preparátů početně u identických 10 vzorků

	IgA	IgG	IgM	C3	C1q	Kp+Lb
Úplná shoda	5	7	6	5	3	6
Shoda	1	0	4	1	3	4
Méně shoda	2	3	0	2	2	0
Neshoda	2	0	0	2	2	0

(Zdroj: ŠÚP FN Plzeň)

Po odečtení preparátů v optickém mikroskopu a zaznamenání dat, byly histologické i fluorescenční preparáty ihned odeslány ke scannování. Scanner typu Panoramic Scan Midi od firmy 3D Histech, je vybaven zásobníkem na 250 skel. Zásobník se plní manuálně a obsluha zadává, který typ preparátů se bude scannovat. Zvolí typ programu pro běžné nebo imunofluorescenční preparáty. Zadává se velikost objektivu pro zvětšení 20x nebo 40x. U imunofluorescenčních preparátů je nutné zadat oblast prohlížení. Snímání preparátů probíhá lineárně, jednotlivé pásy se spojí

do jednotného obrazu. Rychlost scannování je úměrná velikosti řezu na skle. Scanny preparátů jsou pomocí speciálního programu od výrobce – Panoramic Viewer odeslány na příslušné pracoviště a program umožní jejich prohlížení, zvětšování a další manipulaci jako s obrazem v mikroskopu.

Získaná data z optické mikroskopie a z histoscanningu se porovnaly a zaznamenaly.

11. Výsledky

Získané soubory dat paralelně scannovaných pomocí histoscanningu 3D Histech, jsme porovnávali se souborem totožných biopsií hodnocených optickou mikroskopií.

Při hodnocení virtuální mikroskopie u klasických histologických a histochemických metod (HE, PAS, Jones, AK, modrý trichrom) nebylo výraznějšího rozdílu. Nepatrný rozdíl je při použití scannovacího objektivu. Menší rozlišení se získá při použití objektivu 20x, větší spolehlivost je při použití objektivu 40x. Výsledný efekt je však zanedbatelný a vzhledem k vyšší rychlosti scannování jsme zavedli objektiv zvětšující 20x.

Problematickou kapitolou bylo hodnocení imunofluorescenčních preparátů. Zde jsme hodnotili u nativních ledvin celou škálu vyšetření (IgA, IgG, IgM, C3, C1q, Kappa, Lambda) a vyšetření na C4d využívané pro vyšetření transplantovaných ledvin. Největším technologickým problémem u imunofluorescenčních preparátů jsou nečistoty vznikající při barvení. Tyto nečistoty jsou lidským okem snadno rozlišitelné a do hodnocení je nezapojí. Strojové hodnocení světelnosti a síly signálu u histoscanningu však neumí rozlišit jasnou nečistotu od skutečné struktury, kterou je třeba hodnotit. Přístroj kalibruje své snímání právě na světelnost nejjasnějšího, a tedy pro přístroj nejostřejšího bodu.

Problémy s nečistotami se z počátku objevovali při používání klasického spotřebního materiálu, tzn. podložních skel a montovacího média připravovaného v naší laboratoři za 3dílu glycerinu a 1dílu pufovaného fyziologického roztoku. Porovnáváním hodnocení z optického mikroskopu a z histoscannu jsme došli k závěru nutného použití speciálních, pozitivně nabitých skel TOMO- IHC Adhesive Glass Slide a montovacího média Dako Fluorescence Mounting Medium určeného výhradně pro fluorescenční preparáty. Další změnou, která vedla k odstranění problému s artefakty, bylo dvojnásobné prodloužení oplachů po každé aplikaci protilátek.

Po zavedení kvalitnějšího typu podložních skel a změně montovacího média se nám podařilo významně redukovat množství drobných artefaktů, které matou kalibraci scannování. Po kontrolním testování lze konstatovat, že bylo dosaženo optimálního výsledku a hodnocení imunofluorescenčních vyšetření je stejně spolehlivé v optickém

mikroskopu i z histoscannu. Je nutno zdůraznit, že kvalita a uživatelská vlídnost histoscanningu je významně ovlivněna internetovým připojením. U rychlého připojení (ideálně optický kabel) je prodlení odezvy programu minimální a odečtení biopsie je tedy v celku komfortní

11.1. Vyhodnocení záznamů

Tabulky 8. a 9. ukazují záznamy všech dalších vzorků početně. U transplantovaných ledvin jsou v tabulce 8 vyjádřeny záznamy zbývajících 93 vzorků z celkového počtu porovnávaných biopsií. V tabulce 9 jsou záznamy 55 vzorků nativních ledvin.

Záznamy dokazují, že po odstranění všech nežádoucích vlivů, které byly zjištěny při zpracovávání prvních vzorků, je odečítání histochemických, imunohistochemických i imunofluorescenčních preparátů z histoscanningu více než spolehlivé. Ve všech případech bylo porovnání optické mikroskopie a histoscanningu v úplné shodě 80% a více procent. (poslední sloupec tabulky)

Tab. 8 Shody porovnávání opt./scan. ostatních 93 vzorků biopsií transplantovaných ledvin – vyjádřeno početně:

		Úplná shoda	Shoda	Méně shoda	Neshoda	V procentech
Shoda IHC preparátů		93	0	0	0	100%
Shoda preparátů se spec. HHT		93	0	0	0	100%
Shoda IF preparátů	C4d	16	2	1	2	88%
	C4d + kompl.IF	8	3	1	1	82%

IHC- imunohistochemie, HHT- histochemie; IF- imunofluorescence; IF C4d- imunofluorescence na C4d; C4d+kompl.IF- C4d+kompletní imunofluorescenční řada; procentuální vyjádření úplné shody. (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň)

Tab. 9 Shody porovnávání opt./scan. ostatních biopsií vlastních ledvin – vyjádřeno početně:

		Úplná shoda	Shoda	Méně shoda	Neshoda	V procentech
Shoda preparátů se spec. HHT		55	0	0	0	100%
Shoda IF preparátů						
	IgA	46	5	2	2	83%
	IgG	48	5	2	0	87%
	IgM	53	1	1	0	96%
	C3	49	4	1	1	89%
	C1q	45	5	1	3	81%
	Kappa	54	1	0	0	98%
	Lambda	54	1	0	0	98%

HHT-histochemie; IF- imunofluorescence; procentuální vyjádření úplné shody.

(Zdroj: ŠÚP FN Plzeň)

11.2. Využití scannu

V současné době máme k dispozici tzv. 3D histoscanning. Jedná se o technologii, která je schopna v poměrně rychlém časovém intervalu přenést optický obraz do digitálního obrazu v podobě tzv. virtuálního mikroskopu. Prakticky tedy okamžitě po odečtení biopsie jsou skla scannována, a to včetně skel imunofluorescenčních. Největší výhodou této technologie je kromě archivace netrvalých imunofluorescenčních preparátů zejména možnost odečtení tzv. na dálku.

Kvalita a celková vlídnost k uživateli je velmi závislá na internetovém připojení. Jelikož scann ve své celkové podobě je tvořen až 1,5 GB je práce s takto velkým souborem poměrně komplikovaná a časově náročná. V místě, kde je kvalitní internetové připojení (zejména optický kabel), je však práce poměrně jednoduchá a od klasického optického mikroskopu se příliš neliší. Časové prodloužení je minimální, histoscanning včetně transportu trvá většinou několik hodin.

12. Diskuse

Diagnostika renálních onemocnění se v současné době rozděluje do dvou velkých skupin. Obě skupiny spolu úzce souvisí a není možné jednoznačně oddělovat obě skupiny. Jednu velkou skupinu tvoří primární či sekundární postižení ledvin a druhou skupinu tvoří problematika transplantační medicíny ledvin. Diagnostika renálních nemocí byla dlouho omezena na nepříliš často prováděné otevřené biopsie ledviny, kdy patolog obdržel velké množství materiálu, ale klinické údaje, čistá morfologie bez imunofluorescence a bez ultrastruktury nepřinášely detailní informaci o povaze onemocnění (Ruiz, 2009). Přesto v této době bylo vytyčeno, alespoň základní rozdělení renálních onemocnění. Maximum vědomostí v těchto počátečních obdobích diagnostiky renálních nemocí byly získávány pomocí klasické světelné mikroskopie na sekčním materiálu. Autoři jako Ellis, Fahr či Kleps jsou autory, kteří položili základy moderní diagnostiky renálních nemocí (Jennete et al., 2015). Otevřené biopsie byly prováděny v 50. letech 20. století, autoři jako Alwall, dále dánští lékaři Brun a Iversen, kteří provedli renální biopsii jako modifikaci již rutinně prováděné jaterní biopsie (Iversen et Brun, 1951). Američani Kark a Muehrcke položili základy diagnostiky u živých pacientů, které bylo možno využít v klinické praxi (Kark et Muehrcke, 1954) . V 60. letech 20. století renální patologové jako Bergstrand, Furck, Germuth, Habib, McClusky či Spargo položili základy imunofluorescenční technologie a ultrastruktury (Jennete et al., 2015).

Od druhé poloviny 20. století se začaly rutinně používat punkční biopsie ledviny (transkutánní) a došlo k prudkému rozvoji patologických klasifikací, klinického využití daných poznatků a renální patologie se stala vysoce specializovanou součástí diagnostiky (Ruiz, 2009). V současné době je transkutánní biopsie ledviny standardní a rutinní úkon, samozřejmě nese svá rizika. Zhruba 35 % pacientů může mít mikroskopickou hematurii, makroskopická hematurie je však vzácná a vyskytuje se zhruba u poloviny procenta případů. Perirenální hematomy bývají přítomny až u 65% pacientů, běžně se však toto nevyšetřuje, jelikož klinický význam je minimální (Viklický, 2008). Pouze zcela výjimečně (zhruba 1% případů) je vyžadována renální

transfuze, nefrektomie na základě nezvladatelného krvácení bývá prováděno v 0,1% případech. Mortalita je výjimečná a prakticky se nevyskytuje (Shidham et al., 2005).

Rozvoj diagnostiky transplantovaných ledvin šel ruku v ruce s rozvojem diagnostiky nativních ledvin a s rozvojem transplantací, respektive transplantační medicíny jako celku (Viklický et al., 2008). V současné době většina renálních vzorků, které vyšetřujeme, jsou transplantované ledviny a to jednak díky zvyšujícímu se počtu transplantovaných pacientů, díky tzv. protokolárním biopsiím (Třeška et al., 2008) (biopsie odebírané bez ohledu na klinický stav pacienta po třech měsících, po jednom roce a po třech letech od transplantace).

Zcela první transplantací ledviny je uváděna transplantace provedená MUDr. Ullmannem 7. března 1902 ve Vídni. Provedl transplantaci ledviny u psa, jednalo se však o tzv. autotransplantaci (Ullmann, 1902). Stejný autor se pokoušel transplantovat ledvinu z prasete pacientovi, technicky se však toto nepodařilo a další rozvoj transplantací nastal až po technickém zvládnutí sutury cév (Carrel, 1902). V roce 1906 existovaly pokusy transplantace xenograftu z prasete nebo kozy pro pacienty s chronickým renálním selháním. Samozřejmě tyto pokusy byly neúspěšné (Jaboulay, 1906). Stejně tak jako další pokusy transplantovat ledvinu z opice člověku. V roce 1936 byl proveden pokus na Ukrajině, kde byla pravděpodobně transplantovaná vůbec první lidská ledvina od dárce s traumatem hlavy, pacientovi po otravě chloridem rtuťnatým. Ledvina byla AB0 inkompatibilní a ledvina nikdy nebyla schopna funkce, avšak dva dny po pitvě pacienta, který bohužel zemřel, byly cévy stále latentní (Voronov, 1936). V roce 1945 MUDr. Hume, Hafnagell a Landstainer v Bostonu poprvé transplantovali lidskou kadaverózní ledvinu mladé ženě, která byla komatózní pro akutní renální insuficienci kvůli septikemii. Ledvina pracovala po několik dní a došlo k úplné nápravě poškození ledviny septickým stavem a pacientka se uzdravila (Hume et al., 1955).

MUDr. Hume pokračoval v transplantaci ledvin u devíti pacientů, v té době ale nebyla prováděna žádná imunosuprese. Jeden ze štěpů fungoval šest měsíců. V roce 1952 byla provedena první transplantace od živého dárce, kdy matka darovala ledvinu svému synovi s kongenitální jednou ledvinou, o kterou přišel při nehodě. Ledvina pracovala bez jakékoliv imunosuprese 21 dní (Hume et al., 1955). V roce 1954 byla úspěšně provedena transplantace u jednovaječných dvojčat a pacient přežil 8 let, poté došlo k rekurenci původního renálního onemocnění (Merčilo et al., 1956). V roce 1959 provedeny první úspěšné pokusy s imunosupresí, které pokračovaly až do dalších let

(Murray, 1963). Autoři těchto pokusů (Dr. Elion a Hitchings, stejně tak jako dr. Murray) obdrželi Nobelovy ceny v roce 1988 a 1992. Od této doby se datuje éra stále úspěšnějších transplantací od kadaverózních či živých dárců u lidí. Rovněž s rozvojem technologie transplantací dochází k rozvoji diagnostiky jednotlivých typů rejekcí, toxických poškození, rekurencí apod. (Jennette et al., 2015).

V Československu byl proveden první neúspěšný pokus o příbuzenskou transplantaci v roce 1961 v Hradci Králové. V roce 1966 se v Praze uskutečnila další transplantace, kdy darovaná ledvina od matky synovi pracovala jedenáct měsíců za podpory imunosuprese (Viklický, 2008).

Renální transplantace ve FN Plzeň se začaly provádět v 80. letech, na počátku 90. let došlo zejména díky aktivitám tehdejšího předsedy transplantační společnosti ČR MUDr. Vojty Martínka k zavedení moderních technologií, moderní diagnostiky a moderní imunosuprese (Třeška et al., 2008). Od této doby se datuje velmi aktivní a velice úspěšná éra transplantací ledvin, a to jak od kadaverózních, tak od živých dárců v plzeňské Fakultní nemocnici. V současné době na oddělení patologie vyšetřujeme zhruba 90-100 vzorků ročně od transplantovaných ledvin. Stejně tak vyšetřujeme zhruba okolo 50 vzorků ročně od ledvin nativních.

Telepatologie poskytuje možnost prohlížení histologických a patologických preparátů na pracovištích ve větších vzdálenostech. Obsahuje technologie, které získáním digitálního obrazu histopatologického preparátu umožní jeho další analýzu a sdílení pomocí počítačové sítě. Tento typ je nazýván statickou telepatologií nebo store and forward systém (Ling, 2012) a označuje se jako asynchronní. Umožňuje konzultace specialistů u preparátů, kde není uzavřená diagnóza, dále určování diagnóz u peroperačních biopsií, kde se využívá dynamická telepatologie a diagnóza je určena na dálku, ale v reálném čase (Liang et al., 2008). Telepatologie v reálném čase je označována jako synchronní. Technologie telepatologií mimo jiné umožňuje provedení virtuálních pitev.

Telepatologie se stává velkou součástí výuky, kdy se dají shromažďovat potřebné preparáty vhodné pro výuku, aniž by se musely preparáty neustále překrajovat a doplňovat, čímž se mnohdy ztrácí velmi vzácný histologický materiál (Dee, 2009). U digitálních preparátů odpadá starost s jejich křehkostí, tedy snadnou zničitelností. Na některých pracovištích se začínají vytvářet registry s různými druhy histologických preparátů (Madabhushi et Lee, 2016).

Termín telepatologie je složen ze dvou řeckých slov: *tele* – vzdálené a *pathos* – trpět, další používané termíny jsou digitální patologie nebo počítačová patologie. Je součástí velmi širokého oboru telemedicíny (Ling, 2012) .

Termín „telepatologie“jako první použil patolog Ronald S. Weinstein, MD v roce 1986 v lékařském časopise, a tím jej zavedl do anglického jazyka. Stal se průkopníkem telemedicíny i telepatologie, kdy během rezidentury na Massachusetts General Hospital (MGH) se podílel na jednom z prvních telemedicínských případů z programu MGH , kdy byl poslán snímek krevního nátěru z Logan International Airport během Telemedicine Program na jaře 1968 (Ling, 2012). Dále se inicioval, patentoval a podílel se na komercializaci robotické telepatologie. Stal se prezidentem šesti profesionálních organizací včetně American Telemedicine Association (ATA). ATA definovala telemedicínu následovně: *„Telemedicína je použití zdravotnických informací vyměněných z jednoho místa na druhé prostřednictvím elektronických komunikací pro zdravotnictví a vzdělávání pacientů nebo poskytovatele zdravotní péče a pro účely zlepšení péče o pacienty“*.(ATA, 2015).

První klinická telepatologická služba byla zavedena v Norsku v roce 1989, kde byly poskytnuty histopatologické preparáty k diagnostice na dálku (Ling, 2012). Telepatologie je tvořena dvěma technologiemi. První možností je použití dálkově ovládaného mikroskopu, kdy obraz přenáší přes internet do počítače. Druhý typ využívá histoscanning, tzn. snímání histologických preparátů ve slide scanneru. Slide scannery digitální obraz převádí do počítačového programu, kde se obraz uloží a umožní prohlížení v počítači (Ling, 2012). Velkou výhodou telepatologie, pro kterou je stále více využívána, rychlejší diagnostika a možnost konzultace, kde odpadá zdržení tradičních poštovních zásilek. Naopak nevýhodou jsou velké pořizovací náklady všech součástí technologie (Meyer et Paré, 2015).

Tato práce se hlavně zabývala porovnáváním kvalitou digitálních preparátů z imunofluorescence a možností jejich odečítání na dálku, tzn. mimo pracoviště ŠÚP FN Plzeň. Odečítání imunofluorescenčních preparátů ve fluorescenčním mikroskopu má svá specifika, kdy hlavními limity jsou velikost vzorku, který je možné si odebrat z punkce dodané kliniky, a tím tedy i vytvoření dostatečně kvalitního imunofluorescenčního preparátu. Dalším limitem bylo hlavně u preparátů ze štěpu ledviny, kde je prováděna složitější nepřímá imunofluorescence. Ta prochází dvěma fázemi a výsledek je ovlivněn použitím dvou odlišných protilátek a více kroky při

vytváření preparátu. Při celém procesu může dojít k nechtěnému vzniku nežádoucích artefaktů. Ty potom ruší samotný odečet ve fluorescenčním mikroskopu, ale lidské oko, tzn. zkušený odečítající lékař umí tyto artefakty odlišit a z výsledku je vyloučit. Scanner, který se zaměřuje na nejostřejší bod preparátu, může takto zaznamenat do digitálního preparátu artefakt a ne zvýraznění poškozené struktury ve vzorku, která je obarvena protilátkou značenou imunofluorescenčním barvivem. Tento fakt se stává velkým problémem při odečtu na velkou vzdálenost, kdy kvalita navíc klesá s kvalitou internetového připojení. Digitální preparát nebo sada preparátů (např. u kompletní fluorescence u nativní autologní ledviny) je třeba velké datové paměti, až několik GB, což kvalita připojení také velmi ovlivňuje (hlavně pomalé načítání a skládání snímků). Tímto shrnutím se potvrzuje hypotéza H2, tj. digitalizace imunofluorescenčních preparátů je složitější a náročnější na vznik i odečet preparátu.

U histochemických a imunohistochemických preparátů problém s artefakty nebyl zaznamenán a ani žádný problém s digitalizací těchto preparátů a hypotéza H1 nebyla vyvrácena. K zavedení digitalizace všech preparátů z nativních vzorků autologních i transplantovaných ledvin vedl fakt potřeby vytvoření archivu nejen imunohistochemických a histochemických preparátů, kde nebyl problém s fyzickým skladováním, ale hlavně imunofluorescenčních preparátů. Životnost fluorescenčních preparátů je velice krátká a z tohoto důvodu nemohly být použity k edukačním účelům. Další výhodou je možnost odečtu při nepřítomnosti patologa nebo při potřebě konzultace se zkušenějším kolegou (Madabhushi et Lee, 2016).

U běžného histoscanningu se používá preparát s dvoustnásobným zvětšením, pro detailnější znázornění je vhodné čtyřsetnásobným zvětšení.

13. Závěr

Porovnávání odečítání preparátů běžnou optickou mikroskopií a identických preparátů metodou histoscanningu ukázalo, že s preparáty vytvořenými z parafinového bloku nebyl problém ani při jedné z technik. Z parafinového bloku se připravují imunohistochemické a histochemické preparáty a přehledné barvení hematoxylin-eosin. Komplikace se objevily u imunofluorescenčních preparátů, a to u preparátů z histoscanningu. Imunofluorescenční preparáty se připravují ze zmrazených řezů. Při odečítání scanner na rozdíl od lidského oka, neumí rozlišit případný artefakt a zaměří snímání právě na artefakt. Tím potlačí snímání tkáňových struktur.

V předkládané práci jsou zmapovány shody a neshody při odečtech oběma technikami a proces odstranění vlivů, které kvalitu digitálních preparátů ovlivňovaly. Výsledky práce ukazují, že po odstranění všech vlivů, které ovlivňovaly kvalitu digitálních preparátů z imunofluorescence, je histoscanning spolehlivou metodou pro odečítání imunofluorescenčních preparátů i na delší vzdálenosti, což bylo podstatou zavedení této techniky.

Naše práce tímto prokázala možnost využití histoscanningu k rutinnímu hodnocení komplikovaných diagnostických případů biopsií ledvin.

14. **Obrazové přílohy**

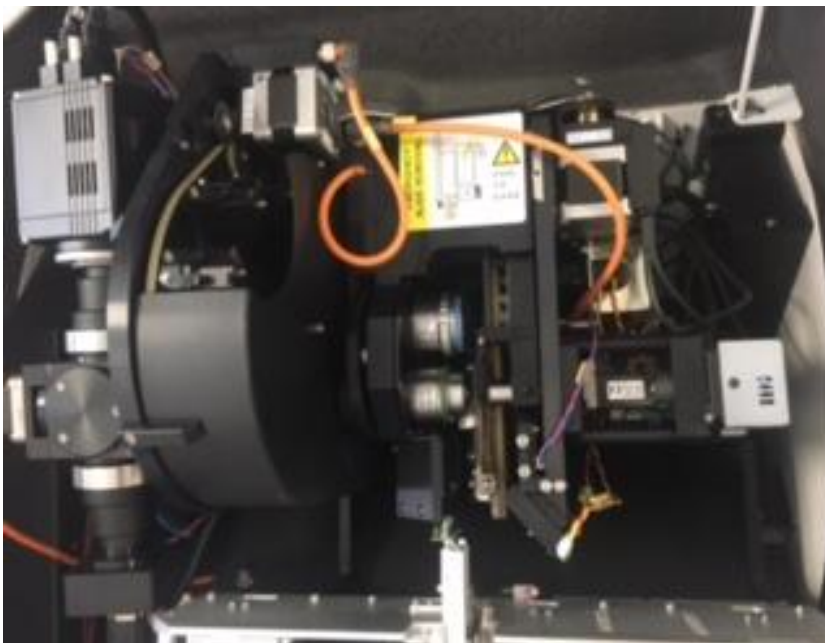
Obrázky Panoramic Scan Midi od firmy 3D HISTECH



Obr. 3 *Panoramic Scan Midi* od firmy 3D HISTECH (Zdroj: BL Plzeň).

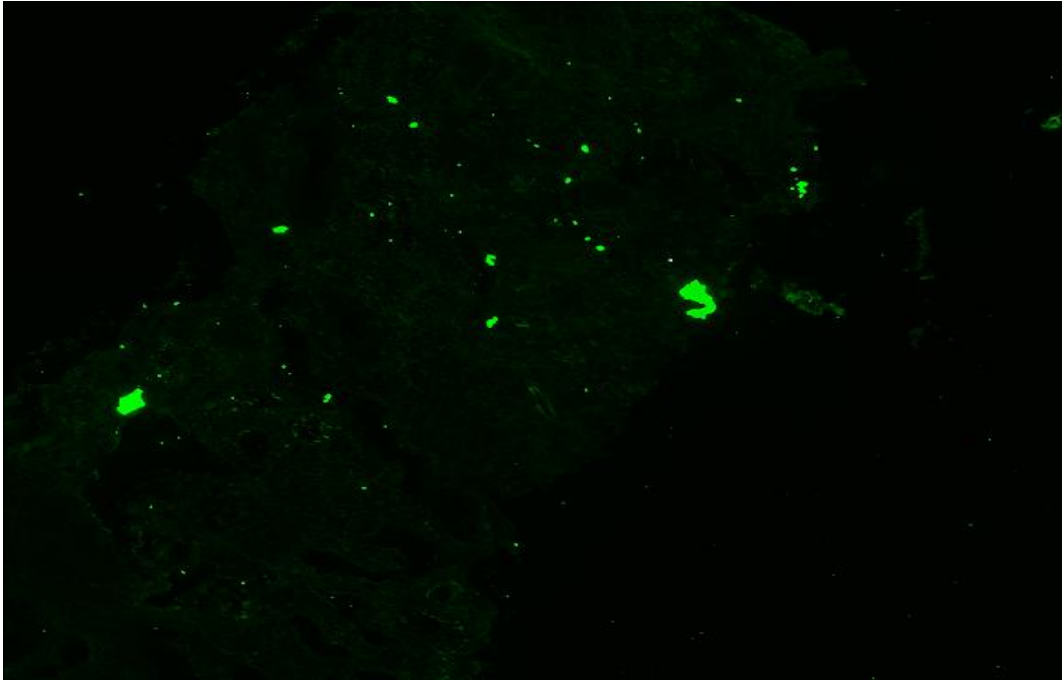


Obr. 4. Vnitřní prostor Panoramic Scan Midi (Zdroj: BL Plzeň).

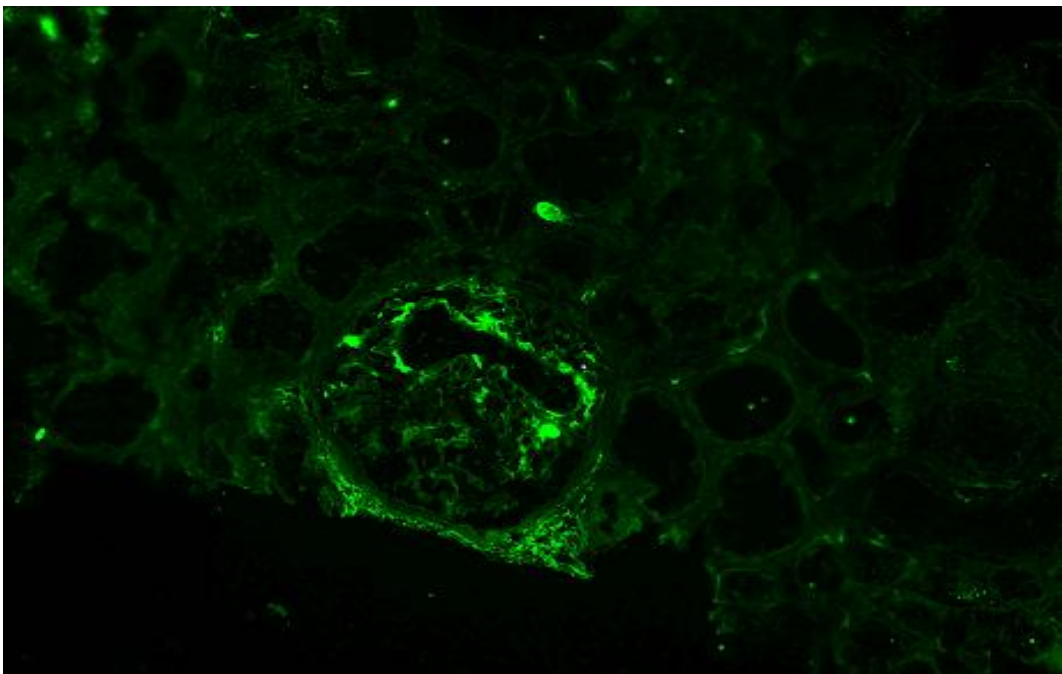


Obr. 5. Detail objektivů 20x (zelený) a 40x (modrý) (Zdroj: BL Plzeň).

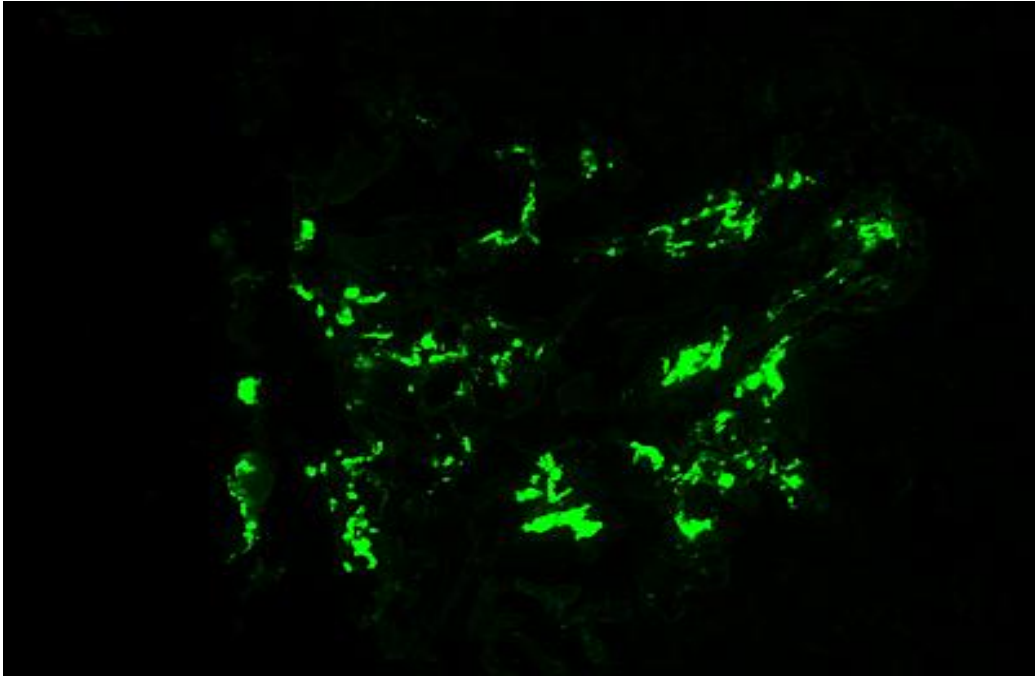
Obrázky z histoscannu:



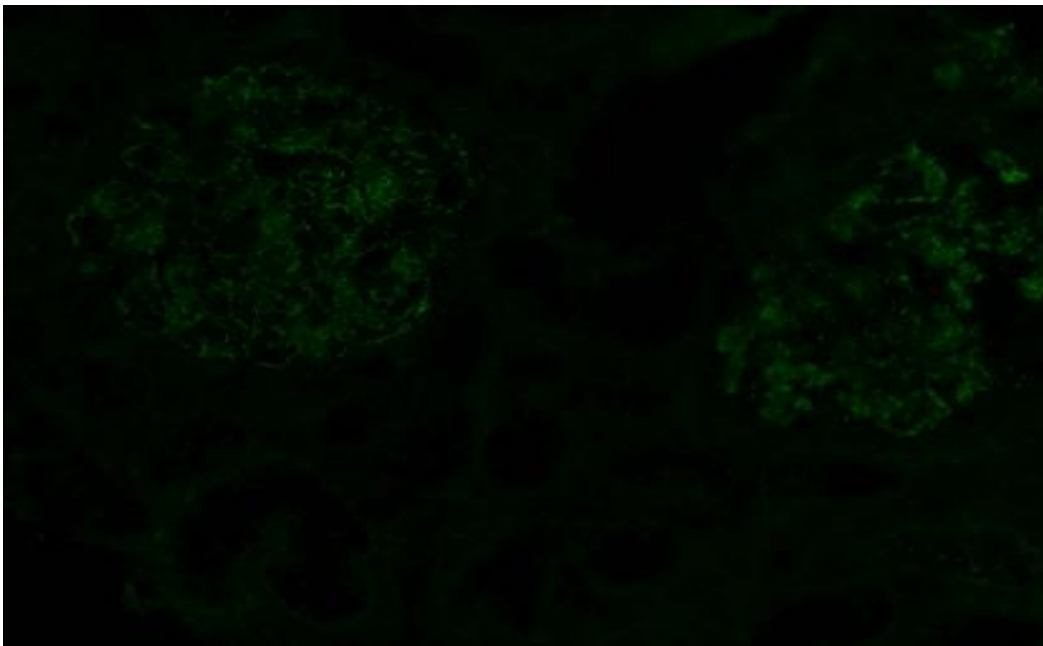
Obr. 6 *Artefakty přibarvení na C4d (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň).*



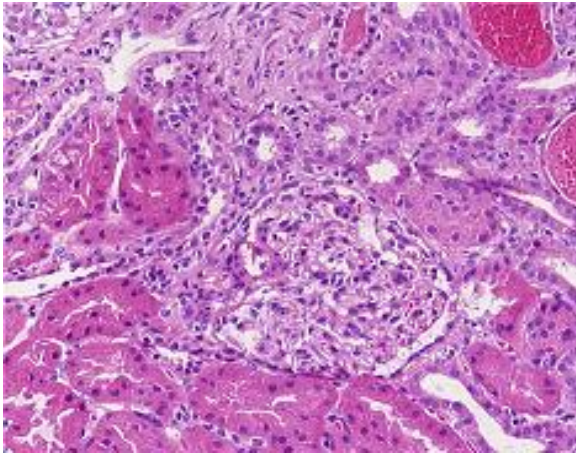
Obr. 7 *Negativní C4d - bez artefaktů (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň).*



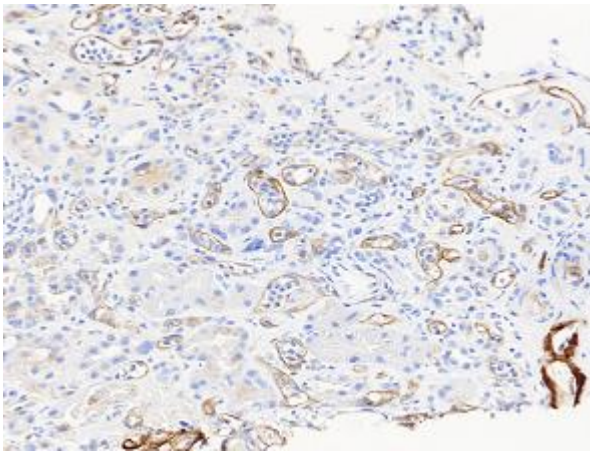
Obr. 8 *Detail pozitivita IgA - bez artefaktů (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň).*



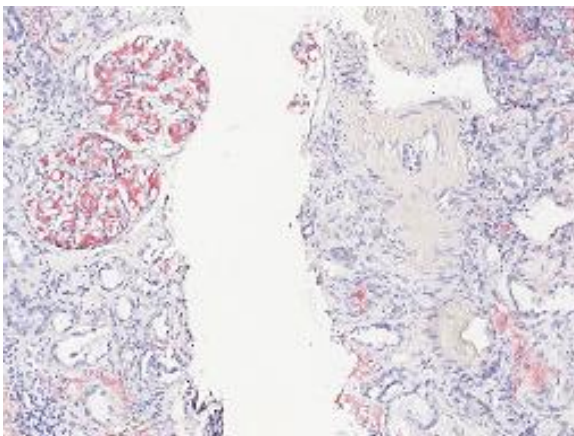
Obr.9 *Jemná pozitivita C1q při SLE - bez artefaktů (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň).*



Obr.10 *Detail glomerulu při IgA nefropatii ze scanu (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň).*



Obr.11 *Scan IHC pozitivity na C4d (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň).*



Obr. 12 *Scan pozitivního barvení na AK (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň).*

15. Seznam literatury

1. ALINE-FARDIN, A. et al., 2009. Recurrent and de novo membranous glomerulopathy after kidney transplantation.[online] *Transplant. Proc.*, 41 (2): 669-671[cit. 2017-03-26]. Dostupné z:<http://dx.doi.org/10.1016/j.transproct.200901.042>
2. AUBERT, O. et al., 2014. Risk of antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with anti-HLA-C donor specific antibodies.[online] *Am J Transplant*; 14(6):1439-45[cit. 2017-03-26]. Dostupné z:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24804568>
3. BALWANI, M.R. et al., 2015. Biopsy in native kidney diseases.[online] *Clinical Queries: Nephrology*. Volume 4, Issues 3-4: 28-31[cit. 2017-03-26]. Dostupné z:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cqn.2016.01.001>.[sciencedirect.com/science/article/pii/S2211947716300012](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211947716300012)
4. BARTUŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.
5. BHATTI, A.B. et USMANN, M., 2015. Chronic Renal Transplant Rejection and Possible Anti-Proliferative Drug Targets.[online] *Cureus*; 7(11):e 376. DOI:10.7759/cureus.376[cit.2017-03-26]. Dostupné z:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4671911/>
6. BONSIB, S.M. et al., 2000. Acute rejection-associated tubular basement membrane defects and chronic allograft nephropathy.[online] *Kidney International*; Vol.58: 2206-2214.[cit. 2017-04-02]. Dostupné z:[www.kidney-international.com/article/S0085-2538\(15\)47331-4](http://www.kidney-international.com/article/S0085-2538(15)47331-4)
7. CATTRAN, D.C. et al., 2012. Kidney disease: Improving global outcomes glomerulonephritis work group. KDIGO clinical practice for glomerulonephritis.[online] *Kidney international Supplements*; 2(2): 139-274.[cit. 2017-03-26]. Dostupné z:<https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84884315497-origin=inward-txGid=DA4DFB5AD98B30C>

8. CIBIČEK, Norbert a Jan VACEK. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8
9. COLOVAI, Al et al., 2005. Acute and hyperacute humoral rejection in kidney allograft recipients treated with anti-human thymocyte antibodies. *Hum Immunol.*; 66(5): 501-12, 2005
10. COLVIN, R.B. et CHANG, A. *Diagnostic Pathology: Kidney Diseases, 2nd Edition*. Canada: Elsevier, 2016. 1144 s. ISBN: 978-0-323-37707-2
11. CORNELL, L.D. et al., 2008. Kidney transplantation: mechanism of rejection and acceptance. [online]. *Annu. Rev. Pathol.*; 3, 189-220 [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://doi.10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151508>
12. ČIHÁK, Radomír a Miloš GRIM. *Anatomie*. 2., upr. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2002. ISBN 80-247-0143-x.
13. D'AGATI, V.D. et al., 2011. Focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med*; 365: 2398-411 In: KUMAR, Vinay, Abul K. ABBAS a Jon C. ASTER. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Ninth edition. ISBN 978-1-4557-2613-4.
14. DAVIN, J.C. et al., 2014. Henoch – Schonlein purpura nephritis in children. *Nat Rev Nephrol.*; 10 (10): 563-73. In: JENNETTE, J. Charles. a Robert H. HEPTINSTALL. *Heptinstall's pathology of the kidney*. 6th ed. / Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, c2007. ISBN 9780781747509.
15. DEE, F.R., 2009. Virtual microscopy in pathology education. [online]. *Hum Pathol*; 40 (8): 1112-1121 [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://doi.10.1016/j.humpat.2009.04.010/PMID19540551>
16. DHINGRA, S. et al., 2014. Tubulointerstitial nephritis in systemic lupus erythematosus: innocent bystander or ominous presage. *Histol Histopathol.*; 29 (5): 553-65. In: COLVIN, R.B. et CHANG, A. *Diagnostic Pathology: Kidney Diseases, 2nd Edition*. Canada: Elsevier, 2016. 1144s. ISBN: 978-0-323-37707-2

17. DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4
18. EDDY, A.A., 2014. Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis.[online]. *Kidney International Supplements*; 4(1): 2-8[cit. 2017- 03-26]. Dostupné z: <https://www.scopus.com/record/display.uri.eid=2-s2.0-84908555761=origin=inward=txGid=DAUDFB5AD98B30C>
19. EL TERS, M. et al., 2013. Kidney allograft survival after acute rejection, the value of follow-up biopsies. *Am J Transplant*; 13 (9): 2334-41
20. FIJTER, J.W., 2010. Rejection and function and chronic allograft dysfunction. *Kidney Int. Suppl.*, 119: 38-41. DOI: 10.1038/ki.2010.421
21. FORD, S.L. et al., 2014. Histopathologic and clinical predictors of kidney outcomes in ANCA- associated vasculitis. *Am J Kidney Dis.*;63(2): 227-35
22. FÖLSCH, Ulrich R., Robert F. SCHMIDT a Kurt KOCHSIEK. *Patologická fyziologie*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0319-x.
23. GANONG, William F. *Přehled lékařské fyziologie: dvacáté vydání*. Praha: Galén, c2005. ISBN 80-7262-311-7.
24. GUBLER, M.C., 2008. Inherited diseases of the glomerular basement membrane. *Nat Clin Pract Nephrol*; 4: 24-37. In: KUMAR, Vinay, Abul K. ABBAS a Jon C. ASTER. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Ninth edition. ISBN 978-1-4557-2613-4.
25. GUYTON, Arthur C. a John E. HALL. *Textbook of medical physiology*. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, c2006. ISBN 978-0-7216-0240-0
26. HARING, C.M. et al.,2012. Segmental and global subclasses of clas IV lupus nephritis have similar renal outcomes. *Am J Nephrol.*; 23(1): 149-54
27. HERLITZ, L.C. et al., 2014. IgA nephropathy with minimal change disease. *Clin J Am Soc Nephrol.*; 9 (6): 1033-9
28. HONG Ma et al., 2013. The role of complement in membranous nephropathy.[online] *Semin Nephrol*; 33(6): 531-542 [cit. 2014-04-11]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4274996/> DOI:10.1016/j.semnephrol.2013.08.004
29. HOŘEJŠÍ, Václav. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.

30. HUDSON, B.G. et al., 1994. Structure and organization of type IV collagen of renal glomerular basement membrane. *Contrib nephrol.*; 107: 163-7
31. HUME, D.M. et al., 1955. Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. *J Clin Invest*; 34: 327. In: JENNETTE, J. Charles. a Robert H. HEPTINSTALL. *Heptinstall's pathology of the kidney*. 6th ed. /. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, c2007. ISBN 9780781747509.
32. IWABUCHI, Y. et al., 2014. Long-term prognosis of adult patient with steroid-dependent minimal change nephrotic syndrome following rituximab treatment. *Medicine Baltimore*; 93(29): e 300
33. IVERSEN, P. et BRUN, C., 1951. Aspiration biopsy of the kidney. *Am J Med*; 11: 324-330. In: JENNETTE, J. Charles. a Robert H. HEPTINSTALL. *Heptinstall's pathology of the kidney*. 6th ed. /. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, c2007. ISBN 9780781747509.
34. JABOULAY, M., 1906. Greffe de reins au pli du coude par soudures arterielles et veineuses. *Bulletin du Lyon Medicale*; 107: 575-77. In: JENNETTE, J. Charles. a Robert H. HEPTINSTALL. *Heptinstall's pathology of the kidney*. 6th ed. /. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, c2007. ISBN 9780781747509.
35. Jennette, J.C. et al., 2011. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody vasculitis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*; 20: 263-70.
36. JENNETTE, J. Charles. a Robert H. HEPTINSTALL. *Heptinstall's pathology of the kidney*. 6th ed. /. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, c2007. ISBN 9780781747509.
37. JOHN, R. et HERZENBERG, A.M., 2009. Renal toxicity of therapeutic drugs. *J Clin Pathol*; 62: 505-15. In: GREAVES, P. *Histopathology of preclinical toxicity studies: interpretation and relevance in drug safety studies*. 4th ed. Boston: Elsevier/AP, 2012. ISBN 978-0-444-53856-7.
38. KAMBHAM, N., 2012. Crescentic Glomerulonephritis: an update on Pauciimmune and anti-GBM diseases. *Adv Anat Pathol*; 19(2): 111-24. In: KUMAR, Vinay, Abul K. ABBAS a Jon C. ASTER. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Ninth edition. ISBN 978-1-4557-2613-4
39. KARK, R.M. et MUEHRCKE, R.C., 1954. Biopsy of the kidney in pronephritis. *Lancet*; 1: 1047-1049. In: JENNETTE, J. Charles. a Robert H. HEPTINSTALL. *Heptinstall's pathology of the kidney*. 6th ed. /. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, c2007. ISBN 9780781747509.
40. KIM, CH. et al., 2014. Using the Oxford classification of IgA nephropathy to predict long-term outcomes of Henoch-Schonlein purpura nephritis in adults. *Mod. Pathol.*; 27(7): 972-82

41. KOBORI, H. et al., 2007. The intrarenal renin-angiotenzin systém. From physiology to the pathology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.*; 59: 251-287
42. KOZAKOWSKI, N. et al., 2009. Monocytes/macrophages in kidney allograft intimal arteritis: no association with markers of humoral rejection or with inferior outcome.[online] *Nephrol Dial Transplant*; 24: 1979-1986[cit. 2017-04-11]. Dostupné z:<https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backlife/conect-public/Journal/ndt/24/6/10.1093-ndt-gfp045/3/gfp045>. DOI: 10.1093/ndt/gfp045
43. KREJČÍ, Karel, Josef ZADRAŽIL a Tomáš TICHÝ. *Nefropatie v ultrazvukovém a histologickém obraze*. Praha: Maxdorf, c2011. Jessenius. ISBN 978-80-7345-258-2.
44. KUMAR, Vinay, Abul K. ABBAS a Jon C. ASTER. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Ninth edition. ISBN 978-1-4557-2613-4.
45. LIANG, W.Y. et al., 2008. Low-cost telepathology systém for intraoperative frozen-section consultation: our experience and review of literature. *Human Pathol*; 39: 56-62
46. LIM, CH.L. et KRISHNAPPA,P., 2012. Telepathology – An Update.[online] *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine and Public Health*; 4(12)[cit. 2017-04-11]. Dostupné z: internalmedicine.imedpub.com/telepathology—an update.pdf
47. LIU, X.J. et al., 2014. Ultrastructural changes of podocyte foot processes during the remission phase of minimal change disease of human kidney. *Nephrology (Caltron)*; 19(7): 392-7
48. LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.
49. MA, H.et al., 2013. The role of complement in membranous nephropathy.[online] *Semin. Nephrol.*; 33(6): 531-542[cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4274996>. DOI:10.1016/j.semnephrol.2013.08.004
50. MADABHUSHI, A. et LEE, G., 2016. Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities.[online] *Medical Image Analysis*; 33: 170-75[cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.media.2016.06.037>
51. Mc CROSKEY,L. et al., 2014. Subclassifying atypia in urine cytology: What are the helpful features?[online][cit. 2017-04-02]. Dostupné z: scopus.com/record/display.uri?id=2-s2.0-84937959904=inward=tx.Gid.DOI: 10.1016/j.jasc.2014.11.002
52. MERČILO, J.P. et al.,1956. Successful homotransplantation of the kidney between identical twins. *J Am Med Ass*; 160: 277-282
53. MEYER, J. et PARÉ, G., 2015. Telepathology Impacts and Implementation Challenges.[online] *Arch Pathol Lab Med*; 139:1550-57[cit. 2017-04-02].Dostupné z: <https://doi.10.5858/arpa.2014-0606-RA>

54. MORESO, F. et al., 2010. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J transplant*; 6(4): 747-52.
55. MURRAY, J.E. et al., 1963. Prolonged survival of human kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N Engl J Med*; 268: 1315
56. NAŇKA, Ondřej a Miloslava ELIŠKOVÁ. *Přehled anatomie*. Třetí, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-206-0.
57. NANKIVELL, B.J. et al., 2010. Rejection-Kidney-Allograft.[online] *N Engl J Med*; 363: 1451-62[cit. 2017-04-02]. Dostupné z: stritch.luc.edu/lumem/MedEd/hostdef
58. NIAUDET, P. et al., 2017. Renal manifestation of Henoch- Schonlein purpura Iga vasculitis.[online][ci. 2017-04-02]. Dostupné z: <https://www.uptodate.com/contents/renal-manifestation-of-henoch-schonlein-purpura-iga-vasculitis>
- 59 . NOVÁK, Ivan, Martin MATĚJOVIČ a Vladimír ČERNÝ. *Akutní selhání ledvin a eliminační techniky v intenzivní péči*. Praha: Maxdorf, c2008. Jessenius. ISBN 978-80-7345-162-2.
60. OKAY, G.U. et al., 2012. Remission of de novo membranous nephropathy in a kidney allograft recipient: a case report.[online] *Ren.Fail.*; 34(10)[cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <http://doi.10.3109/0886022X.2012.718952>
61. PATEL, H.D. et PIERORAZIO, P.M., 2015. Small Renal Mass- To Biopsy or Not? The Role of Biopsy in Evaluation.[online][cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://doi.10.1016/j.euf.2015.09.008>
62. PERAZELLA, M.A. et MARKOWITZ, G.S., 2010. Drug-induced acute interstitial nephritis. *Nat Rev Nephrol*; 6: 461-70. In: KUMAR, Vinay, Abul K. ABBAS a Jon C. ASTER. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Ninth edition. ISBN 978-1-4557-2613-4.
63. PICKERING, M. et COOK, H.T., 2011. Complement and glomerular disease. New insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens*; 20: 271-7. In: KUMAR, Vinay, Abul K. ABBAS a Jon C. ASTER. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Ninth edition. ISBN 978-1-4557-2613-4
64. PUTTARAJAPPA, CH. et al., 2012. Antibody- Mediated Rejection in Kidney Transplantation: A Review.[online] *Journal of Transplantation*; 2012:9[cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <https://www.hindwi.com/journals/j.trans/2012/193724/>
65. POVÝŠIL, Ctibor a Ivo ŠTEINER. *Speciální patologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-494-2.

66. REMINGTON, R.S. et al., 2017. Coumpound effects of again and experimental FSGS on glomerular epithelial cells.[online] *Aging (Albany Ny)*;9(2): 524-45[cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5361679/>
67. Roberts, I.S., 2014. Pathology of IgA nephropathy. *Nat Rev Nephrol*; 10(8): 445-54. In: JENNETTE, J. Charles. a Robert H. HEPTINSTALL. *Heptinstall's pathology of the kidney*. 6th ed. /. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, c2007. ISBN 9780781747509.
68. RONCO, P. et DEBIEC, H., 2012. Pathogenesis of membranous nephropathy: recent advances and future challenges. *Nat Rev Nephrol*; 8: 203-13.
69. RUIZ, Phillip. *Transplantation pathology*. New York: Cambridge University Press, 2009. ISBN: 978-0-521-87995-8
70. SALVADORI, M. et BERTONI, E., 2013. Acute Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation: Clinical and Therapeutic Aspects.[online] *J Nephrol Ther*; 2013[cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0959.1000146>
71. SELLARÉS, J. et al., 2011. Undrstanding the Causes of Kidney Transplant Failure: The Dominant Role of Antibody- Mediated Rejection and Nonadherence.[online] *American Journal of Transplantation*; 12(2)[cit. 2017-04-09]. Dostupné z: onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-6143.2011.03840x/full
72. SENTÍS, A. et al., The prognostic signifiacnce of glomerular infiltrating leukocytes during acute renal allograft rejection.[online] *Transpl Immunol.*; 33(3): 168-75[cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26494157>
73. SETHI, S. et FERVENZA, F.C., 2012. Membranoproliferative glomerulonephritis-a new look at old entity. *N Engl J Med*; 366: 1119-31. In: KUMAR, Vinay, Abul K. ABBAS a Jon C. ASTER. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Ninth edition. ISBN 978-1-4557-2613-4.
74. SHIDHAM, B. et al., 2005. Clinical risk factors associated with bleeding after native kidney biopsy. *Nephrology (Calrton)*; 10: 35.
75. SHIMIZU, T. et al., 2012. Acute vascular rejection after renal transplantation and isolated v- lesion.[online] *Clin Transplant*; 26(24): 2-8[cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22747468>.DOI:10.1111/j.1399-0012.2012.01673.x.
76. SCHIFFL, H., 2006. Renal recovery from acute tubular necrosis requiring renal replacement therapy: a prospective study in critically ill patients.[online] *Nephrol Dial Transplant*; 21: 1248-52[cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/conect-public/journal/ndt/21/5/10.1093.DOI: 10.1093/ndt/gfk069>
77. SILBERNAGL, Stefan a Agamemnon DESPOPOULOS. *Atlas fyziologie člověka*. 6. vyd., zcela přeprac. a rozš., Vyd. 3. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0630-x

78. SOLEZ, K. et al., 2007. Banff'05 meeting report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy. *Am J Transplant*; 2007: 518-26
79. STEGALL, M.D. et al., The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation.[online] *Nature Reviews Nephrology*; 8: 670-78[cit. 2017-04-02]. Dostupné z: www.nature.com/nrneph/journal/v8/n11/full_nrneph.2012.212.html.DOI: 10.1038/nrneph.2012.212
80. STOKES, M.B. et al., 2014. Morphologic variants of focal segmental glomerulosclerosis and their significance. *Adv.Chronic Kidney Dis.*; 21(5): 400-7
81. STRASSHEIM, D. et al., 2013. IgM contributes to glomerular injury in FSGS. *J Am. Soc Nephrology*; 24(3): 393-406
82. SUZUKI, H. et al., 2011. The pathophysiology of IgA nephropathy. *Am Soc Nephrol*; 22: 1795-803. In: KUMAR, Vinay, Abul K. ABBAS a Jon C. ASTER. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Ninth edition. ISBN 978-1-4557-2613-4.
84. ŠIMEK, Jiří. *Lékařská etika*. Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-5306-5.
85. TAAL, Maarten W., Barry M. BRENNER a Floyd C. RECTOR. *Brenner & Rector's the kidney*. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, c2012. ISBN 978-1-4160-6193-9.
86. TARZI, R.M. et al., 2011. Crescentic glomerulonephritis: new aspects of pathogenesis. *Semin Nephrol*; 31: 361-8. In: KUMAR, Vinay, Abul K. ABBAS a Jon C. ASTER. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Ninth edition. ISBN 978-1-4557-2613-4.
87. TEPLAN, Vladimír. *Akutní poškození a selhání ledvin v klinické medicíně*. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-1121-8
88. TESAŘ, Vladimír a Ondřej VIKLICKÝ, ed. *Klinická nefrologie*. 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-4367-7.
89. TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.
90. TŘEŠKA, Vladislav. *Transplantace ledvin od nebijících dárců*. Praha: Maxdorf, c2008. Jessenius. ISBN 978-80-7345-167-7.
91. ULLMANN, E., 1902. Experimentelle Nierln-transplantation. *Wien Klin Wochenschr*; 15: 281.

92. VARYANI, U.T. et al., 2016. Distal renal tubular acidosis with hypokalemie paralysis as primary presentation of Sjorgen's syndrome without sicca symptoms. An unusual case presentation.[online] *Clinical Queries: Nephrology*; 5(2): 46-48[cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cqn.2016.09.001sciencedirect.com/science/article/pii/S2211947716300383>.
93. VIKLICKÝ, Ondřej, Libor JANOUŠEK a Peter BALÁŽ. *Transplantace ledviny v klinické praxi*. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2455-3.
94. WEENING, J.J. et al., 2008. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Rheumatology (Oxford)*; 47(5): 702-7
95. WEI, L.L. et al., 2014. Membranous nephropathy: A review on the pathogenesis, diagnosis and treatment.[online][cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2014.11.002>
96. YUSTE, C. et al., 2015. Pathogenesis of glomerular hematuria.[online] *World J Nephrol*; 4(2): 185-195[cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4419128/>. DOI: 10.5527/wjn.v4.i2.185
97. ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2013. ISBN 978-80-7492-062-2.

16. Seznam obrazové přílohy

Obr.1 Procentuální vyjádření počtu vlastních a transplantovaných ledvin.

Obr.2 Procentuální vyjádření požadovaných vyšetření.

Obr.3 Panoramic Scan Midi od firmy 3D HISTECH (Zdroj: BL Plzeň).

Obr.4 Vnitřní prostor Panoramic Scan Midi (Zdroj: BL Plzeň).

Obr.5 Detail objektivů 20x a40x (Zdroj: BL Plzeň).

Obr.6 Artefakty při barvení na C4d (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň).

Obr.7 Negativní C4d – bez artefaktů (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň).

Obr.8 Detail positivity IgA – bez artefaktů (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň).

Obr.9 Jemná pozitivita C1q při SLE – bez artefaktů (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň).

Obr.10 Detail glomerulu při IgA nefropatii ze scanu (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň).

Obr.11 Scan IHC positivity na C4d (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň).

Obr.12 Scan pozitivního barvení na AK (Zdroj: ŠÚP FN Plzeň).

17. Seznam zkratek

AK – Kongo Red barvení

ATA – American Telemedicine Asociation

BL – Bioptická Laboratoř Plzeň

DAPI – 4,6-diamidin -2-fenylindol

FITC – Fluoresceinisothiocyánát

FSGS – Fokálně segmentální glomeruloskleróza

HBD – Heart – beating – donor

HE – Haemotoxylin-eosin

HHT – Histologické histochemické metody

HSN – Henoch- Schenleinova nefropatie

IF – Imunofluorescence

IHC – Imunohistochemie

NHBD – Non-heart-beating-donor

PAS – Barvení na průkaz polysacharidů

SLE – Systémový lupus erythemathodes

ŠÚP – Šiklův ústav patologie

TRITC - Tetramethylrhodamine