



---

**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**  
**FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**  
**Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

# **Histologická stavba ledviny v porovnání s patologickým obrazem vybraných subtypů světlobuněčného renálního karcinomu**

## **Histological Structure of the Kidney in Comparison to the Pathological Image of Selected Subtypes of Clear Cell Renal Carcinoma**

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Studijní obor: -

Autor bakalářské práce: Lenka Bendová

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Daniela Obitková

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Bendová** Jméno: **Lenka** Osobní číslo: **491595**  
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**  
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**  
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

## II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

**Histologická stavba ledviny v porovnání s patologickým obrazem vybraných subtypů světlóbuňčného renálního karcinomu**

Název bakalářské práce anglicky:

**Histological Structure of the Kidney in Comparison to the Pathological Image of Selected Subtypes of Clear Cell Renal Carcinoma**

Pokyny pro vypracování:

Světlóbuňčný renální karcinom, pocházející z epitelálních buněk proximálního tubulu, tvoří 75 % karcinomů ledvin, čímž se řadí mezi nejčastější typ nádoru ledvin v populaci. Jeho výskyt evidujeme převážně v 6. dekádě života s převahou u mužského pohlaví. Teoretická část bakalářské práce bude zaměřena na anatomickou stavbu a funkce ledvin, charakteristiku a diagnostiku světlóbuňčného renálního karcinomu a jeho subtypů. Dále bude probírána léčba a problematika pozdního záchytu tohoto nádoru. Praktická část bude soustředěna především na průkaz vybraných variant světlóbuňčného karcinomu pomocí základních a speciálních barvicích metod v histologii a dále na jejich porovnání se zdravou tkání ledviny. K potvrzení patologického záchytu budou využity histologické a imunohistochemické techniky.

Seznam doporučené literatury:

- [1] BALKO Jan, Memorix histologie, ed. 2, Triton, 2017, ISBN 978-80-7553-249-7
- [2] BÜCHLER Tomáš, Karcinom ledviny, ed. 1, Farmakon Press, 2017, ISBN 978-80-906589-3-6
- [3] KOLEČKOVÁ, Markéta, TOMÁŠ TICHÝ, Bohuslav MELICHAR, Lucia VEVRKOVÁ, Ondřej HES, Vitězslav KOLEK a Zdeněk KOLÁŘ, Metastazující světlóbuňčný renální karcinom bez zjevného primárního ložiska v ledvině imitující pokročilé stadium plicní malignity, online, Klinická onkologie, ed. 2019, [Revidováno 2019], [Citováno 2019], ročník 32, číslo Supl 1, Přístupné z: <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2019-04-10-supplementum-1/metastazujici-svetlobuncny-renalni-karcinom-bez-zjevneho-primarniho-loziska-v-l-1/>, ISSN 0862-495X

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

**MUDr. Daniela Obítková**

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

**Aneta Sekaninová DiS.**

Datum zadání bakalářské práce: **14.02.2023**

Platnost zadání bakalářské práce: **20.09.2024**

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Histologická stavba ledviny v porovnání s patologickým obrazem vybraných subtypů světlobuněčného renálního karcinomu vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 11.05.2023

.....  
Lenka Bendová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych jako první chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce MUDr. Daniele Obitkové za její odborné vedení, rady, konstruktivní připomínky a za čas, který si vyhradila na mé dotazy a opravu práce. Ráda bych poděkovala i své konzultantce Anetě Sekaninové, Dis., za konzultace, výpomoc s výběrem tématu a realizaci praktické části. Poděkování patří též celému týmu na Patologicko-anatomickém oddělení Oblastní nemocnice Kladno za vyhrazení místa a poskytnutí prostředků ke zpracování praktické části.

## **ABSTRAKT**

Světlobuněčný renální karcinom představuje bezkonkurenčně nejčastější novotvar ledvin, a proto se má bakalářská práce zabývat právě tímto druhem nádoru ledviny. A jelikož se vyskytují i zvláštní varianty světlobuněčného karcinomu, je histologický průkaz zaměřen převážně na ně.

První část bakalářské práce obsahuje anatomický a histologický popis ledviny včetně funkcí ledvin a ostatních pochodů, kterých se ledviny účastní. Jsou zde popsány rizikové faktory, které mohou přispět k rozvoji tohoto onemocnění. Nechybí zmínka o metodách využívaných k diagnostice nádorů ledvin s tím, že velký důraz je kladen na bioptickou metodu s následnou histologickou analýzou vzorku. Probrána je i léčba, která se doporučuje pro jednotlivá stadia karcinomu a dále je zahrnuta problematika léčby u pokročilejších nádorů ledvin. Nemalá část teoretického oddílu je věnována charakteristice světlobuněčného renálního karcinomu a jeho multicystické a granulární variantě.

Praktická část práce je věnována kompletnímu zpracování fixované i nativní bioptické tkáně, speciálním barvicím metodám a pro lepší názornost je doplněna o fotodokumentaci.

Dosažené výsledky prokázaly, že pro stanovení histologické diagnózy světlobuněčného renálního karcinomu a jeho subtypů, je dostačující barvení preparátů základní metodou Hematoxylin-eozin. Naproti tomu na ověření a detekci buněčných komponent byly aplikovány speciální druhy barvení – Periodic acid Shiff reakce, Periodic acid Shiff reakce s  $\alpha$ -amylázou, modrý trichrom, olejová červeň. Doplňující informace poskytla také imunohistochemie.

## **Klíčová slova**

renální karcinom; světlobuněčný renální karcinom; renální funkce; diagnostika; histologická technika; základní a speciální metody barvení

## **ABSTRACT**

Clear cell renal carcinoma is by far the most common renal tumor and therefore my bachelor thesis deals with this type of renal tumor. And since there are also special variants of clear cell carcinoma, the histological evidence is mainly focused on them.

The first part of the bachelor thesis contains anatomical and histological description of the kidney, including the functions of the kidney and other processes in which the kidney is involved. Symptoms and conditions that may contribute to the development of this disease are described. The methods used for the diagnosis of renal tumors are discussed, with a strong emphasis on the biopsy method followed by histological analysis of the specimen. The following is discussed the treatment recommended for the various stages and the treatment of more advanced renal tumors. A significant part of the theoretical section is devoted to the characteristics of clear cell renal carcinoma and its multicystic and granular variant.

The practical part of the thesis is aimed at the complete processing of fixed and native biopsy tissue, both basic and special staining methods. The main staining techniques are supplemented with immunohistochemical staining procedures for better illustration.

The results obtained have shown that staining of the slides with the basic Hematoxylin-eosin method is sufficient for the histological diagnosis of clear cell renal carcinoma and its subtypes. On the other hand, special types of staining – Periodic acid Schiff reaction, Periodic acid Schiff reaction with  $\alpha$ -amylase, blue trichrome, oil red were applied for verification and detection of cellular components. Immunohistochemistry also provided additional information necessary for precise diagnosis.

## **Keywords**

renal cell carcinoma; clear cell renal carcinoma; renal function; diagnosis; histological technique; basic and special staining methods

## Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce .....	11
3	Přehled současného stavu.....	12
3.1	Anatomická a histologická struktura ledviny .....	12
3.1.1	Nefrony a kanálky .....	13
3.1.2	Intrarenální vývodní cesty.....	15
3.1.3	Krevní oběh ledvin.....	16
3.2	Fyziologie .....	17
3.2.1	Filtrace, sekrece, resorpce .....	17
3.2.2	Protiproudový mechanismus.....	18
3.2.3	Metabolické funkce .....	19
3.3	Renální karcinom.....	20
3.3.1	Epidemiologie .....	20
3.3.2	Klinické faktory .....	21
3.3.3	Etiologické faktory .....	22
3.3.4	Anatomické faktory.....	23
3.3.5	Histologické faktory.....	24
3.4	Diagnostika.....	25
3.4.1	Klinické metody .....	25
3.4.2	Laboratorní metody .....	25
3.4.3	Zobrazovací metody.....	25
3.4.4	Bioptické metody .....	26
3.5	Léčba .....	27
3.5.1	Parciální nefrektomie .....	27
3.5.2	Radikální nefrektomie.....	27
3.5.3	Aktivní sledování .....	27

3.5.4	Ablační léčba.....	28
3.5.5	Embolizace.....	28
3.5.6	Léčba metastazujícího RCC.....	28
3.6	Světlobuněčný renální karcinom.....	29
4	Metodika.....	32
4.1	Příprava bioptické tkáně pro zpracování.....	32
4.1.1	Příjem materiálu.....	32
4.1.2	Evidence a značení materiálu.....	32
4.2	Vlastní zpracování bioptické tkáně.....	33
4.2.1	Přikrojení orgánu.....	33
4.2.2	Fixace tkáně.....	34
4.2.3	Příprava tkáně pro zalití do parafínu.....	36
4.2.4	Zalévání tkáně do parafínu.....	37
4.2.5	Zhotovení histologických řezů.....	39
4.3	Barvení histologických preparátů.....	44
4.3.1	Hematoxylin-eozin.....	45
4.3.2	PAS reakce.....	46
4.3.3	Modrý Massonův trichrom.....	47
4.3.4	Olejová červeň.....	48
4.4	Montování histologických preparátů.....	49
4.5	Imunohistochemická analýza vzorku.....	50
5	Výsledky.....	52
5.1	Makroskopie zdravé ledviny a ledviny s ccRCC.....	52
5.2	Mikroskopie zdravé ledviny.....	56
5.3	Běžný ccRCC.....	60
5.3.1	Průkaz glykogenu.....	61
5.3.2	Průkaz lipidů.....	64



5.4	Multicystický ccRCC .....	65
5.5	Granulární ccRCC .....	68
5.6	Dediferenciace ccRCC .....	70
6	Diskuze.....	71
7	Závěr .....	76
8	Seznam použitých zkratk .....	77
9	Seznam použité literatury.....	79
10	Seznam použitých obrázků .....	89
11	Seznam použitých tabulek .....	91

# 1 ÚVOD

Renální karcinom je nejletálnějším urologickým maligním onemocněním, na které umírá až 40 % nemocných. Téměř ve všech případech se jedná o světlobuněčný renální karcinom, který může mít několik podob. Odlišuje se například barvitelností cytoplazmy, kdy má běžný světlobuněčný renální karcinom světlou cytoplazmu a jeho zvláštní subtyp cytoplazmu eozinofilní (granulární). Další subtyp má cytoplazmu světlou, ale navíc je tvořen cystami vystlanými světlobuněčným epitelem.

K výběru tohoto tématu mě přivedl především poznatek o tom, že nádorová onemocnění představují celosvětový problém. Dle nejnovějšího vydání klasifikace nádorů močových cest od rady Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2022 představují nádory ledvin závažný společenský problém a postihují 10 % populace. O to pozoruhodnější je fakt, že právě Česká republika má nejvyšší incidenci renálních karcinomů ve světě a bylo tomu tak již v roce 2000. Bohužel tento nepříznivý trend dále pokračuje a stále není objasněna hlavní příčina vzniku tohoto onemocnění. Nepříznivé okolnosti se týkají také asymptomie (bezpříznakovosti), která nádory ledvin doprovází. Z tohoto důvodu by měl být kladen větší důraz na podstupování preventivních prohlídek u svých lékařů.

Povzbuzujícím faktem však je, že diagnostické metody se neustále zlepšují, a tím je i větší šance na brzký záchyt a případnou léčbu nebo sledování karcinomu. Čím dál více se uplatňují různé neinvazivní metody vyšetření, ačkoliv konečnou diagnózu určí jedinec invazivní metoda biopsie a histologická technika, kterou se v této bakalářské práci podrobněji zabývám a zmiňuji její výhody. Léčba nádorů ledvin je komplikovaná a i přes neustálé zdokonalování molekulárně biologických léčebných metod zůstává stále nejlepší variantou radikální resekce neboli trvalé odstranění zasažené ledviny.

## 2 CÍLE PRÁCE

Má bakalářská práce s názvem „Histologická stavba ledviny v porovnání s patologickým obrazem vybraných subtypů světlobuněčného renálního karcinomu“ je soustředěna zejména na průkaz multicystické a granulární varianty světlobuněčného renálního karcinomu, a to pomocí základních a vybraných speciálních barvicích metod. Stejnou technikou budou zhotoveny preparáty zdravé ledvinné tkáně, které poslouží k porovnání histologické stavby zdravé a patologicky transformované ledviny.

Nesmí být opomenut ani cíl týkající se pečlivého prostudování dostupné publikace, se kterou jsou následně porovnány námi dosažené výsledky. Doplňujícím úkolem je prokázat fibrotickou dediferenciaci světlobuněčného nádoru, které tento typ karcinomu ledvin mnohdy podléhá.

## 3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

### 3.1 Anatomická a histologická struktura ledviny

Ledviny jsou nedílnou součástí močového systému. Dorůstají do rozměrů cca 12 x 6 x 3 cm a váží 130–170 g. U mužů je váha i velikost ledvin větší. Tento párový orgán nalezneme v lidském těle v oblasti retroperitonea, a to na obou stranách bederní páteře v rozsahu posledního hrudního obratle až druhého bederního obratle. Větší část ledviny naléhá na čtyřhranný sval bederní a zbylá se přiklání k bránici. Každou ledvinu obalují dvě pouzdra. Je to vazivové pouzdro (*capsula fibrosa renis*), pokrývající povrch ledviny a tukové pouzdro (*capsula adiposa renis*), které plní ochrannou funkci před zevním, zejména mechanickým poškozením. Po sejmutí tukového pouzdra nalezneme červenohnědou ledvinu zaobleného fazolovitého tvaru. Póly ledvin mají rozdílnou šířku, kaudální pól je nižší, a to zapříčiňuje nepatrně nepravidelnou strukturu ledviny. Jak již bylo zmíněno, ledviny jsou uloženy retroperitoneálně a zajímavým faktem je, že pravostranná ledvina je posazena o úroveň jednoho obratle níž než levostranná ledvina. Je to z toho důvodu, že se přední plocha pravé ledviny kraniokaudálně opírá o játra. [1; 2].

Pokud provedeme podélný řez ledvinou, jsme schopni na první pohled rozeznat kůru a dřev. Pod hladkým vazivovým pouzdrům se nachází povrchová kůra (*cortex*), která přechází v dřev (medulla). Kůra je světlého a granulárního vzhledu o tloušťce 6 mm a dřev je naopak tmavého a žíhaného vzhledu, tvoří ji 8–18 ledvinných pyramid. Vystupují z ní ledvinné kanálky a intrarenální vývodní cesty močové. Existuje i část kůry, která pokračuje hlouběji do struktury ledviny, přesněji mezi každou pyramidu. Tyto struktury se nazývají ledvinné (Bertiniho) sloupce, oddělující od sebe jednotlivé pyramidy. Tato část kůry, spolu s příslušnou pyramidou, představuje ledvinný lalok (*lobus renalis*). V užším měřítku jsou tu ještě ledvinné lalůčky (*lobulus renalis*) obsahující dřevové paprsky (*radia medullares*). Na rozhraní mezi kůrou a dřev jsou báze ledvinných pyramid, které pokračují k hilu, a tam tvoří vrcholy (ledvinné papily). Z ledvinných papil (*area cribrosa papillae renalis*) putuje definitivní moč přes ledvinné kalíšky a kalichy až do ledvinné pánvičky a odtud do močovodu [1; 3; 4].

### 3.1.1 Nefrony a kanálky

Základní stavební jednotku ledvin představuje nefron. V ledvině se nachází zhruba 1–4 miliony nefronů. Mají precizní strukturu, která umožňuje veškeré funkční požadavky při tvorbě moči. Tvoří je vždy jeden glomerulus a tubulární systém. Podle lokalizace v ledvině rozlišujeme dva typy nefronů. Z větší části jsou to korové nefrony vyskytující se v povrchové kůře a hlouběji v kůře nalezneme zlomek juxtamedulárních nefronů, které disponují mnohem delšími Henleovými kličkami [4].

Nefron je komplex složený z:

- ledvinného tělíska,
- proximálního a distálního kanálku,
- Henleovy kličky.

Ledvinné tělísko (*corpusculum renis*) kulovitého tvaru o průměru 200  $\mu\text{m}$  se vyskytuje v kůře a je vystlané jednovrstevným epitelem. Kapilární úsek ledvinného tělíska utváří glomerulus. Ten je obalen Bowmanovým pouzdrem, který obsahuje dva listy. Viscerální list (*stratum viscerale*) obklopuje glomerulové vlasečnice z vnitřní strany. Zde se vyskytují buňky hvězdicovitého tvaru zvané podocyty. Svým tělem (primárními výběžky) a pedikly (sekundárními výběžky) obklopují vlasečnice. Mezi přítomnými pedikly jsou k vidění póry neboli filtrační štěrby široké 25–30 nm. Parietální list (*stratum parietale*) je na vnější straně glomerulu a vystýlá ho jedna vrstva plochých epitelových buněk. Součástí ledvinného tělíska je i močový prostor vyplňující plochu mezi viscerálním a parietálním listem Bowmanova pouzdra. Cévní zásobení do glomerulu vstupuje vaskulárním pólem. Aferentní arteriola krev do glomerulu přivádí, eferentní arteriola krev z glomerulu odvádí. Parietální list přechází v močový pól, kde nalezneme první z kanálků, a tím je proximální stočený kanálek [4; 5; 6].

Proximální kanálek (*tubulus proximalis*) je dlouhý 15 mm s průměrem dosahujícím až 60  $\mu\text{m}$ . Tvoří jej jednovrstevný kubický epitel. Uvnitř kanálku se vyskytují buňky s centrálně uloženým jádrem a mitochondriemi na bazální straně buněk. Mitochondrie nalezneme ve velkém počtu stejně jako mikrokilky na apikálním povrchu buňky, které zde utváří kartáčový lem. Bazolaterální záhyby přítomné na buněčné membráně

představují bazální labyrint plnicí transportní funkci a okolní buňky k sobě lépe přiléhají díky laterální interdigitaci. Průsvit proximálních kanálků bývá částečně vyplněný, hvězdovitý. Přítomny jsou dvě části proximálního kanálku, delší stočená (*pars convoluta*) a kratší přímá část (*pars recta*). Z ledvinného tělíska, přesněji z Bowmanova parietálního listu, vychází jako první proximální kanálek stočený, lokalizovaný v kůře. Podílí se například na resorpci látek, jako jsou proteiny a ionty, které tělo stále dokáže využít. Na stočený proximální kanálek navazuje přímý proximální kanálek, který pokračuje z kůry do vnější vrstvy dřene [5; 6].

Další funkční jednotku nefronu zaujímá Henleova klička (*ansa nefroni*). Začíná přímou částí proximálního kanálku (*pars recta tubuli proximalis*) a končí též přímou částí, ale distálního kanálku (*pars recta tubuli distalis*). Tyto úseky jsou označovány jako silné segmenty Henleovy kličky a vystýlá je jedna vrstva kubického epitelu. Mezi těmito segmenty nalezneme tenký segment tubulů, dlouhých 10 mm s průměrem 10  $\mu\text{m}$ , tvořených jednovrstevným plochým epitelem, zvané intermediální kanálky (*tubulus intermedius*). V případě juxtamedulárního nefronu v dolní kůře (u Bertiniho sloupců) má tenký segment sestupné i vzestupné raménko. Přímý úsek silného segmentu vzestupného raménka na něj navazuje až po zákrutu a míří zpět do kůry. U kortikálního nefronu má tenký segment pouze sestupné raménko, jelikož se napojuje na přímou část distálního kanálku ještě před ohybem. Společně tak sestupné (*crus descendens*) a vzestupné raménko (*crus ascendens*) Henleovy kličky napodobují tvar písmene U. V Henleově kličce probíhá pasivní i aktivní resorpce látek [5; 6].

Distální kanálek (*tubulus distalis*) zakončuje stavbu nefronu. Svou *pars convoluta* se napojuje na cévní pól ledvinného tělíska. Epitelové buňky mají kubický tvar, ale nejsou tak velké, jako u proximálního kanálku. K modifikaci na vyšší buňky, ve stočené části distálního kanálku, dochází jen v oblasti přezdívané tmavá skvrna neboli *macula densa*, jejíž buňky mají jádro umístěné vždy na apikálním konci buňky. Jádra se zde shromažďují blíž k sobě a v mikroskopu tuto juxtaglomerulární stranu kanálku můžeme vidět sytější zbarvenou než tu druhou. Buňky distálního kanálku jsou dále charakteristické ojedinělými mikrokly na apikální straně buněk čili jeho lumen je prázdné a dále přítomností bazálního labyrintu kvůli neustálému transportu elektrolytů [5; 6].

### 3.1.2 Intrarenální vývodní cesty

Tyto cesty zahrnují 3 kanálky:

- spojovací kanálek,
- sběrací kanálek,
- papilární kanálek.

Poté, co se stočená část distálního kanálku dostane zpět do kůry, naváže se na intrarenální úsek močových cest. První z kanálků intrarenálních vývodních cest je kanálek spojovací (tubulus reuniens) a jak již jeho název napovídá, napojuje na sebe distální a sběrací kanálek. Spojovací kanálek je uzpůsobený tak, aby přes něj mohlo docházet ke zpětnému vstřebávání vody z filtrátu, který přenáší z nefronu. Vystýlá ho jednovrstevný kubický epitel a jako jediný ze skupiny intrarenálních vývodních kanálků se vyskytuje v kůře [5; 6].

Spojovací kanálky také odstupují z každého nefronu do okolí, kde se spojují s ostatními spojovacími kanálky dalších nefronů a vytvářejí sběrací kanálky (ductus colligens), které putují nejprve do dřevných paprsků. Zde dosahují průměru 40  $\mu\text{m}$  a vystýlá je jednovrstevný kubický epitel. Čím hlouběji do dřene pokračují, tím více kanálku se sbíhá za účelem vzniku větších vývodů. Tyto vývody mohou nabýt průměru až 200  $\mu\text{m}$  a vystýlá je jedna vrstva cylindrického epitelu [5; 6].

V oblasti area cribrosa ledvinných papil se dalším spojováním sběracích kanálků vytvoří papilární vývody (ductus papillaris Bellini) a ty následně směřují do ledvinných kalíšků, kam skrz otvory v papilách odvádí moč pryč z ledviny [6].

Pod mikroskopem se výstelka sběracích kanálků jeví jako světle zbarvené buňky (hlavní) obklopené nepravidelně rozprostřenými tmavě zbarvenými buňkami (vmezeřené). Důvodem, proč jsou hlavní buňky barvitelné s nižší intenzitou, je malá přítomnost organel. Snáze rozpoznatelné jsou díky velkému množství akvaporinů v jejich membráně na apikální straně. Akvaporiny jsou membránové proteiny řízené antidiuretickým hormonem hypotalamu, který reguluje absorpci a resorpci vody podle potřeby organismu. Jeho aktivace nastává při úbytku vody v těle. Po zachycení signálu akvaporiny v membráně vstřebávají vodu z filtrátu do intersticiálního vaziva dřene a odtud

do vasa recta. Zabrání se tak ztrátě vody, která by se jinak vyloučila spolu s močí a organismus by byl dehydratovaný. Vmezeřené buňky se podílejí na udržování acidobazické rovnováhy, neboť do filtrátu secernují bikarbonátové ionty nebo  $H^+$  [5].

### 3.1.3 Krevní oběh ledvin

Navzdory jejich nevysoké hmotnosti jimi proudí velké množství krve (20–25 % srdečního výdeje). Každá renální céva nese svůj název podle jejího tvaru nebo polohy v ledvině. Tepenné zásobení začíná delší pravou a níže uloženou levou renální arterií. Tepny přinášejí krev z břišní aorty (aorta abdominalis). Renální arterie se při vstupu do hilu dělí na ramus anterior a posterior. Z těchto větví vychází několik segmentových tepen, které se v ledvině dále člení [6; 7; 8].

Prvními segmentovými tepnami jsou v hojném počtu 15–20 aa. lobares zásobující ledvinné laloky. Arteriae lobares se větví v interlobární tepny, které přivádějí krev mezi pyramidy ledvin až k jejich bázím na rozhraní mezi dřeví a kůru. Tam přecházejí v obloukové tepny (aa. arcuatae). Kopírují tvar této hranice a hlouběji do kůry vydávají větve mezilalúčkových tepen (aa. corticales radiatae). Z nich laterálně odstupují přírodní tepénky (aa. glomerulares afferentes), které vedou krev do ledvinného tělíska ke klubičku kapilár. Rate capillare glomerulare představuje nerozvětvenou kapilární síť glomerulus, ze kterého odvádí krev aa. glomerulares efferentes [5; 6].

Odvodná tepénka se dále dělí podle toho, zda bude vyživovat kanálky ledvinné kůry či dřeví. Rate capillare peritubulare corticale je síť kapilár v povrchové části kůry. Její hustá oblast obemyká proximální, distální a spojovací kanálky a řídká zase intermediální kanálky. Druhá část odvodné tepénky pokračuje ke dřeví, kde vytváří peritubulární kapilární síť kolem kanálků juxtamedulárních nefronů. Hlouběji ve dřeví z ní odstupují tenké a dlouhé sítě 15–23 arteriolar rectae (vasa recta). Jsou to přímé tepénky, jelikož se rovnoběžně linou podél Henleových kliček. Architektonika přímých tepének má spolu s uspořádáním ramének Henleovy kličky velký význam pro protiproudový systém. Rate capillare peritubulare medullare zásobuje intrarenální vývodní cesty ve dřeví [6; 7].



Žilní odtok má podobné uspořádání a názvy jako tepny. Krev odtéká hvězdicovými žilami *venulae stellatae* do *aa. interlobulares*. Tyto venuly kopírují průběh pouzdrových větví (*rami capsulares*), což jsou větve interlobulárních tepen [6].

## 3.2 Fyziologie

Ledviny zaujímají počáteční a důležitou část močového systému, a to hned z několika důvodů.

1. Podílejí se na regulaci objemu tělesných tekutin, solí a regulaci krevního tlaku.
2. Vylučují odpadní a cizorodé látky z organismu prostřednictvím moče, čímž udržují acidobazickou a elektrolytovou rovnováhu.
3. Rovněž mají endokrinní funkci a upravují vitamin D<sub>3</sub> v jeho konečnou formu.

Glomerulárním a tubulárním systémem je krev přetvářena na moč. Moč je takový biologický materiál, který když podrobíme laboratornímu vyšetření, jsme schopni zachytit počínající či probíhající onemocnění ledvin nebo ostatních orgánů močového ústrojí [6; 9].

### 3.2.1 Filtrace, sekrece, resorpce

Filtrace krve probíhá přes glomerulární filtrační bariéru. Ta je složená z endotelu kapilár, jenž je pokryt 300–360 nm silnou glomerulární bazální membránou, která vznikla spojením bazální laminy endotelu a podocytů. Tímto splnutím se zúží prostor pro průchod některých látek z krve jako jsou například proteiny s velkou molekulou. Endotelové buňky kapilár jsou fenestrovány, v těchto otvorech zachycují krevní elementy. Krev se dále filtruje přes štěrbinové membrány (diafragmy) pokrývající filtrační štěrbinu mezi jednotlivými pedikly. Zde se zadržují proteiny s malou molekulou. Vzniklý filtrát obsahující vodu, glukózu, aminokyseliny, ionty, močovinu, hormony, vitamíny, ketolátky a stopové množství proteinů prostupuje do močového prostoru Bowmanova pouzdra. Tyto proteiny jsou následně vychytávány buňkami proximálních tubulů, které je rozloží na aminokyseliny [5; 8].

Filtrace je umožněna působením proteinů typu nefrinů (vznik štěrbinových membrán) a glykoproteinů s proteoglykany obsaženými v podocytech (tvorba otvorů ve štěrbinové membráně). Glomerulární filtrací projde 125 ml krevní plazmy za 1 minutu, což odpovídá 180 litrům za den. Na udržení filtračního tlaku se podílejí mezangiální buňky v ledvinném tělisku. Umí se svým tvarováním přizpůsobit krevnímu tlaku [5; 9].

Filtrát dále podléhá úpravám pomocí sekrece a resorpce v tubulárním systému renální kůry. Kubický epitel proximálních a distálních kanálků zajistí větší plochu pro rychlejší vstřebávání a vylučování látek, které v tubulech probíhá neustále. V proximálním kanálku se primární moč začíná přeměňovat v moč definitivní. Resorbují se v něm všechny proteiny prošlé filtrací peptidázami uvnitř průsvitu kanálku, většina vody kvůli zahuštění moči a veškeré organické živiny pro tělo potřebné (glukóza, vitamíny, aminokyseliny aj.). Má i funkci tubulární filtrace, kdy do filtrátu vylučují léky a kreatinin. Distální kanálky kvůli své chudší výbavě resorbují pouze elektrolyty. K posouzení schopnosti ledvin vykonávat glomerulární filtraci slouží množství kreatininu vyloučeného močí [5; 9].

Některé látky se naopak do filtrátu secernují, aby se odstranily z organismu (organické anionty a kationty). Látky, které neprošly glomerulární filtrací se do kanálků transportují z peritubulární kapilární sítě okolo kanálků přes jejich kubický epitel [5].

### **3.2.2 Protiproudový mechanismus**

Henleova klička je známa svou schopností hospodařit s vodou a upravovat množství osmoticky aktivních látek v moči za účelem udržení hyperosmolarity dřeně. Vše je založeno na principu protiproudového multiplikačního systému., který tvoří Henleova klička, vasa recta a intersticiium. Aby z organismu neodešlo přebytečné množství vody spolu s močí a nenarušila se stabilita vnitřního prostředí organismu, sestupné raménko Henleovy kličky ji část pasivně resorbuje do intersticia, čímž ho osmoticky nasytí a filtrát bez vody se zkoncentruje. Voda i ostatní látky jsou vyloučené do intersticia z důvodu rozložení osmoticky aktivních látek mezi tekutinu v tubulech a intersticiium. Posléze jsou vstřebány tepénkou vasa recta a odvedeny pryč. Tlustý úsek vzestupného raménka má zde významnou funkci jako je aktivní transport NaCl do intersticia a nepropustnost pro vodu. Vytvoří se vysoký osmotický tlak ve dření a hypoosmolární

tekutina v Henleově kličce. Postupným tokem v distálním tubulu se stává izotonickou a ve sběracích kanálcích hypertonickou. Gradient hyperosmolarity dřeně závisí na rychlosti průtoku krve. Medulární gradient se zvyšuje směrem hlouběji do dřeně a maxima dosahuje u ledvinných papil [5; 10; 11].

Přítomnost přímé tepénky (vasa recta) v Henleově kličce je relevantní, zajišťuje protiproudovou výměnu látek. Při její absenci by se chloridové a sodné ionty vrátily kanálky do kůry ledvin a stejně tak i voda, která byla resorbovaná do intersticia. Z toho plyne, že tekutina v tlustém úseku vzestupného raménka by měla stejné složení jako tekutina na konci proximálního tubulu. Moč by nebyla koncentrovaná a dřeň hypertonická [10; 11].

### 3.2.3 Metabolické funkce

Ledviny mají účast na úpravě vitamínu D<sub>3</sub> v jeho konečnou aktivní formu. Metabolismus tohoto vitamínu začíná jeho příjmem z potravy nebo syntézou v kůži poté, co je vystavena UV záření. Nejprve podléhá hydroxylaci v játrech a poté v epitelech proximálních kanálků, kde proběhne jeho konečná aktivace na kalcitriol, účinný metabolit vit. D. Díky němu se zvýší resorpce fosfátů v ledvinách, které jsou nezbytné pro správnou stavbu kostí [12].

Erythropoetin a renin jsou hormony produkované ledvinami. Za tvorbu erytrocytů v kostní dřeni zodpovídá erythropoetin vznikající v buňkách ledvinného intersticia. Při poklesu krevního tlaku se do krevního oběhu uvolní proteolytický enzym renin, pocházející z juxtaglomerulárních buněk, čímž dává impulz ke spuštění kaskády tak zvaného renin-angiotenzin-aldosteron systému (RAAS). Renin štěpí angiotenzinogen produkovaný játry na neaktivní angiotenzin I. Tento hormon je v cévním endotelu plic přeměněn na aktivní formu angiotenzin II enzymem konvertující angiotenzin (ACE). Účinek angiotenzinu II spočívá ve vazokonstrikci arteriol, aby se snížil průtok krve ledvinami, a také přiměje buňky nadledvin k vyplavení aldosteronu. Při dehydrataci organismu stimuluje neurohypofýzu k uvolnění antidiuretického hormonu. Steroidní hormon aldosteron působí na stočenou část distálního kanálku, kde vybízí ke zvýšení zpětného vstřebávání sodíku. Má vliv i na resorpci vody ve spojovacích kanálcích. Těmito procesy RAAS systém reguluje systémový krevní tlak a objem krve. Jestliže je krevní tlak stabilizován, juxtaglomerulární buňky ukončí vylučování reninu [12; 13].

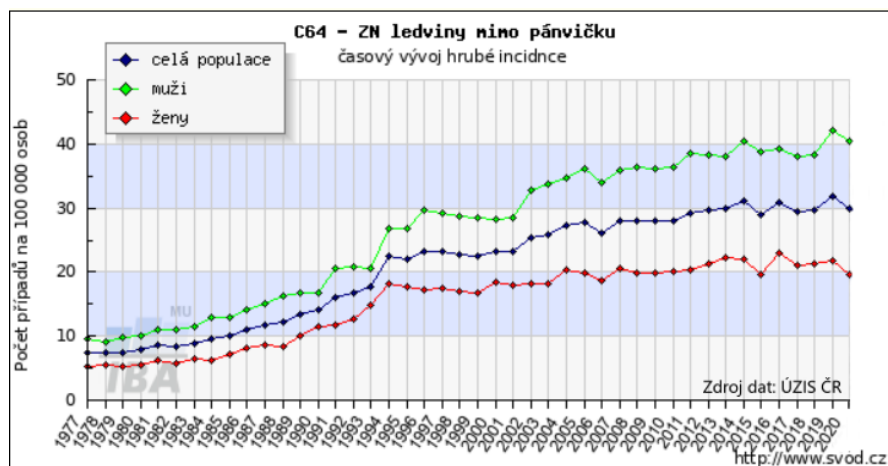
### 3.3 Renální karcinom

Lékařský pojem renální karcinom (renal cell carcinoma; RCC) představuje zhoubné (maligní) onemocnění postihující ledviny. Transformované nádorové buňky se vymykají kontrole a nekontrolovatelně se množí. Maligní nádory rostou rychle, metastazují a prorůstají do okolních orgánů, kde narušují jejich funkci [14; 15].

V dnešní době existuje řada statistických nástrojů a hodnotících nomogramů, jež dokážou neinvazivně a s velkou přesností 70–80 % odhadnout, jestli jde o benigní či maligní lézi, zvláště pokud je tumor o velikosti menší než 4 cm. Je brán v potaz věk, pohlaví, charakter tumoru a symptomy. Každý z nástrojů je specificky vyvinut s řadou funkcí. Například americký RENAL systém je vhodný pro výběr léčebného postupu nebo stanovení rizika malignity a PADUA systém, sestaven na území Itálie (Preoperative Aspect and Dimensions Used for an Anatomical), pracuje s informacemi o průměru nádoru, aby posoudil míru závažnosti rizika, s jakým lze provést parciální resekci tumoru ledviny. Avšak v jistých případech se diagnóza neobejde bez invazivní metody a je nutné provést biopsii. Dle histologického výsledku je vybrán další postup léčby či sledování tumoru [16].

#### 3.3.1 Epidemiologie

Nádor ledviny je celosvětově deváté nejčastější onkologické onemocnění u mužů (271 249 případů v roce 2020) a čtrnácté u žen (160 039 případů v roce 2020). Z čísel je patrné, že postihuje převážně muže (2:1) [17].



Obrázek 1 – Časový vývoj hrubé incidence pro zhoubné novotvary ledviny mimo pánvičku celé populace, populace mužů a populace žen (převzato) [18]

Nejběžnější nádor ledvin je světlóbuňečný (až 80 %), dále pak papilární, chromofobní nebo karcinom ze sběrných kanálků. V České republice tvoří nádory ledvin 4,9 % všech nádorů. V roce 2020 byla incidence u mužů 2129 a 1069 u žen, na území ČR v roce 2020 zemřelo celkem 917 obyvatel. Nejpočetnější záchyt diagnostikovaných RCC bylo u pacientů ve věkové skupině 70–74 let (416 případů). Hrubá incidence v ČR (počet zaznamenaných případů na 100 tisíc obyvatel v dané populaci) byla roku 2000 23,24/100 tisíc obyvatel (28,22 pro muže a 18,51 pro ženy) a podle nejnovějších údajů z roku 2020 vzrostla na 27,19/100 tisíc obyvatel (36,99 pro muže a 17,66 pro ženy). Zavedení zobrazovacích technik (US, CT, MRI) a postupný rozvoj léčebných metod zvyšuje incidence a snižuje mortalitu. Nejnovější WHO statistika z roku 2020 řadí ČR na první místo v incidenci nádorů ledvin. Data jsou k vidění v tabulce 1 [19; 20; 21; 22].

*Tabulka 1 – Srovnání incidence nádorů ledvin a mortality spojené s tímto onemocněním v ČR, s ostatními zeměmi světa v roce 2020, přepočet na 100 000 obyvatel (převzato a upraveno) [22]*

Populace	Incidence	Mortalita
<b>Česká republika</b>	30.9	10.7
<b>Litva</b>	29.9	10.9
<b>Estonsko</b>	29.1	11.6
<b>Lotyšsko</b>	27.8	12.2
<b>Slovensko</b>	24.5	10.5
<b>Francie</b>	22.5	7.6
<b>Slovinsko</b>	22.5	9.3
<b>Uruguay</b>	22.3	8.4
<b>Chorvatsko</b>	21.7	9.9
<b>Maďarsko</b>	21.3	8.3

V přepočtu na světový standard (ASR-W) si ČR mění umístění s Litvou a posouvá se na druhé místo, kde má incidence 14.4 a mortalitu 4.3 [22].

### 3.3.2 Klinické faktory

Nádorové onemocnění ledvin zprvu nejví příznaky, až s postupným růstem karcinomu se začíná objevovat hematurie (60 %), bolesti v bederní oblasti zad (45 %) a v boku (40 %). Tyto symptomy se nemusejí manifestovat společně, děje se tomu tak

u přibližně desetiny pacientů. Častěji se stává, že je karcinom zachycen zcela náhodně, když se provádí vyšetření pacienta pomocí zobrazovacích metody (US, CT, MRI, aj.). Z rozboru krve lze vyčíst zvýšenou hladinu alkalické fosfatázy, nepřímého bilirubinu a  $\alpha$ -2 globulinu. Tyto parametry například upozorňují na dysfunkci jater a s ní spojený Staufferův paraneoplastický syndrom, vyskytující se u 10–20 % pacientů s renálním karcinomem. Dalšími paraneoplastickými symptomy jsou anemie, polycytémie, amyloidóza, hyperkalcémie, trombocytóza, febrilie a kachexie, doprovázené celkovou únavou a úbytkem na váze [16; 23; 24].

### 3.3.3 Etiologické faktory

Přestože je důvod rozvoje tohoto onkologického onemocnění dosud zcela neznámý, existují rizikové faktory, jež podporují nádorové bujení v ledvinách. Můžeme je rozdělit na faktory ze zevní a vnitřní příčiny [23; 21; 25].

#### 3.3.3.1 Zevní faktory

Mezi tyto faktory se řadí obezita a arteriální hypertenze spolu s její léčbou (antihypertenziva, diuretika), dietní návyky jako je nadměrná konzumace uzeného a červeného masa. Za největší rizikový faktor je, dle literatur, považována silná závislost na tabáku (kouření, žvýkání). Uvádí se, že tito jedinci mají o 30 % větší riziko vzniku RCC než nekuřáci. Dále osoby, které jsou vystavovány karcinogenním látkám (asbest, olovo, kadmium, organická rozpouštědla, polycyklické aromatické uhlovodíky, aj.) nebo osoby užívající steroidní anabolické přípravky. Jisté riziko vzniku karcinomu ledvin se připisuje i expozici záření [21; 25].

Avšak dostupné publikace a etiologické studie provedené v praxi jsou v rozporu, nebyla totiž dostatečně prokázána spojitost mezi výše zmíněnými karcinogeny a RCC, a ani vliv kouření [21].

#### 3.3.3.2 Vnitřní faktory

I poruchy dědičné informace mají podíl na rozvoji RCC. Tuberózní skleróza (TSC), Birt-Hogg-Dubé syndrom (BHD) nebo nejčastěji von Hippel-Lindauova nemoc (VHL) jsou nemoci, na jejichž podkladě může vznikat RCC. Mutovaný VHL gen je lokalizovaný na 3. chromozomu a vyskytuje se až u 75 % pacientů s RCC [25].

### 3.3.4 Anatomické faktory

Rozvoj RCC je hodnocen podle zásad Tumor-Node-Metastasis (TNM) klasifikace, která hodnotí lokální patologický rozsah nádoru (pT), šíření nádoru do uzlin (N) a výskyt metastáz (M). V tomto případě se TNM systém vztahuje pouze na nádory ledvin. TMN klasifikace byla sestavena na základě zobrazovacích metod a klinického vyšetření [26; 27].

Tabulka 2 – TNM klasifikace pro karcinom z renálních buněk (upraveno) [26; 27]

<p><b>T – rozsah primárního nádoru</b></p> <p>TX – primární nádor nelze hodnotit</p> <p>T0 – primární nádor nenalezen</p> <p>T1 – nádor přítomný v ledvině má průměr menší než 7 cm</p> <p>    T1a – nádor o průměru <math>\leq 4</math> cm</p> <p>    T1b – nádor o průměru <math>&gt; 4</math> cm, ale méně než 7 cm</p> <p>T2 – nádor přítomný v ledvině o průměru větší než 7 cm</p> <p>    T2a – nádor o průměru <math>&gt; 7</math> cm, ale méně než 10 cm</p> <p>    T2b – nádor o průměru více než 10 cm, omezen na ledvinu</p> <p>T3 – nádor zasahuje do perinefrické tkáně, šíří se do velké žíly, nešíří se do stejnostranné nadledviny ani přes Gerotovu fascii</p> <p>    T3a – nádor postihuje nadledvinu nebo perinefrickou tkáň včetně renálního tuku, nepřesáhne Gerotovu fascii</p> <p>    T3b – nádor se dostává do renální žíly včetně jejích větví nebo do vena cava pod bránicí</p> <p>    T3c – nádor infiltruje dutou žílu nad bránicí nebo stěnu duté žíly</p> <p>T4 – nádor proniká za Gerotovu fascii, šíří se do stejnostranné nadledviny</p> <p><b>N – rozsah v regionálních lymfatických uzlinách</b></p> <p>NX – lymfatické uzliny nelze hodnotit</p> <p>N0 – nádor nemetastazuje do lymfatických uzlin</p> <p>N1 – nádor metastazuje do lymfatické uzliny (uzlin)</p> <p><b>M – výskyt vzdálených metastáz</b></p> <p>MX – metastázy nelze hodnotit</p> <p>M0 – nenalezeny žádné vzdálené metastázy</p> <p>M1 – vzdálené metastázy jsou přítomny</p>
--

Regionálními lymfatickými uzlinami jsou uzliny paraaortické, hilové, parakavální a břišní [28].

### 3.3.5 Histologické faktory

Pro určení stupně diferenciaci nádoru se využívá čtyřstupňový nukleární grading dle Fuhrmanové. Tento klasifikační systém je validován pro světlobuněčný a papilární RCC. Stupeň se hodnotí na základě velikosti, tvaru a obsahu jader buněk renálních karcinomů [29].

*Tabulka 3 – Nukleární grading dle Fuhrmanové (upraveno) [27; 29]*

<p><b>G – histopatologický grading</b></p> <p>GX – stupeň diferenciaci nelze hodnotit</p> <p>G1 – dobře diferencovaný, nádorová buňka má kulaté jádro o velikosti 10 µm, jádérka mohou chybět</p> <p>G2 – středně diferencovaný, nepravidelné jádro o velikosti 15 µm, jádérka jsou patrná pod zvětšením 400x ve světelném mikroskopu</p> <p>G3 – níže diferencovaný, nepravidelné jádro o velikosti 20 µm, jádérka jsou přítomna pod zvětšením 100x ve světelném mikroskopu</p> <p>G4 – nediferencovaný, nádorové buňky ve 3. a 4. stadiu mají jistou podobnost, až na hrudkovitý a objemný chromatin u nádorových buněk ve 4. stadiu</p>
--

*Tabulka 4 – Rozdělení do stádií podle TMN klasifikačního systému (upraveno) [27; 29]*

<p><b>Rozdělení do stádií podle TMN klasifikace</b></p> <p>Stadium I. – T1 N0 M0</p> <p>Stadium II. – T2 N0 M0</p> <p>Stadium III. – T3 jakékoliv N M0 – T1 T2 T3 N1 M0</p> <p>Stadium IV – T4 jakékoliv N M0 – jakékoliv T jakékoliv N M1</p>
--



## **3.4 Diagnostika**

### **3.4.1 Klinické metody**

Klinické metody řadíme mezi obligatorní vyšetřovací metody při podezření na nádorové onemocnění ledviny. Výsledky fyzikálního vyšetření jsou u velké většiny pacientů negativní. Vyšetřuje se palpací ledvin a pozitivní nález pozorujeme v případě, nachází-li se nádor již v pokročilém stádiu (palpace zvyšuje riziko ruptury pouzdra nádoru). Hmatné mohou být zvětšené lymfatické uzliny, varikokéla u mužů nebo otoky nohou způsobené nádorovými trombózami dolní duté žíly, bolesti kostí a kašel u přítomnosti plicních metastáz, u štíhlých pacientů může být patrné vyklenutí břišní stěny. Do diagnostiky je dále zahrnuta osobní i rodinná anamnéza [30; 31; 32].

### **3.4.2 Laboratorní metody**

Podrobnější informace o zdravotním stavu pacienta získáme laboratorním vyšetřením. Provádí se biochemická vyšetření, která vypovídají nejen o renálních funkcích, ale o celkovém stavu organismu. Stanovuje se kreatinin v séru i moči, cystatin C, ionty (včetně kalcia a kalcia korigovaného na albumin), ALP, LDH, jaterní testy a glomerulární filtrace. Kompletní vyšetření moče spočívá v jejím chemickém a mikroskopickém rozboru (nález erytrocytů a leukocytů). Při podezření na uroteliální nádor lékař požaduje i cytologickou analýzu moči. Identifikace či sledování průběhu onemocnění stanovením nádorových markerů je neprůkazné, neboť nádory ledvin neprodukuje žádný tumorový marker pro ně specifický. Uplatnění má také hematologické vyšetření, jehož součástí je stanovení krevního obrazu společně s diferenciálním rozpočtem leukocytů (KO + diff) [31; 32; 33].

### **3.4.3 Zobrazovací metody**

Nezastupitelnou úlohu pro stanovení diagnózy plní zobrazovací metody. Umožňují odhalit nádor před klinickou manifestací, tedy zcela náhodně (incidentalomy) a včas. Hlavní zobrazovací metody využívané pro diagnostiku nádorů ledvin jsou:

- ultrazvukové vyšetření (US)
- výpočetní tomografie (CT)
- magnetická rezonance (MR)

Výše zmíněné metody jsou rychlé, neinvazivní a pacienta nezatěžují. Jako první bývá pacient odeslán na ultrasonografii (US). Ledviny se prohlížejí v podélném i příčném řezu a sleduje se hyperechogenní střed ledviny, poměr šíře parenchymu a hyperechogenní dřeně (PPI) a hypoechogenní parenchym s pyramidami. Maligní nádory se vyznačují nepravidelnými anizoechogeními útvary. Při pozorování pravostranné ledviny můžeme zhodnotit echogenitu jater, která se při negativním nálezu na snímku jeví se stejnou intenzitou šedi jako parenchym ledvin [34; 35].

Pozitivní nebo nejasný nález na US indikuje k dalšímu vyšetření, kterým je CT břicha a pánve s intravenózním podáním kontrastní látky. Měření je vyhodnocováno pomocí počítače, který vypočte denzitu tkáně, kterou prochází. Podle vzhladu nádoru před a po podání kontrastní látky je denzita následně vyjádřena v Hounsfieldových jednotkách (HU). Nález maligního nádoru je charakterizován naměřením  $\geq 15$  HU. Výsledky z CT jsou přesné a zásadní pro stanovení diagnózy. Posoudí rozsah nádoru, stav okolních orgánů (hlavně nadledvin) a zasažení lymfatických uzlin. Zachytí nádorový trombus v renálních žilách i vzdálené metastázy v játrech. Pokud pacient v symptomatologii uvedl, že trpí kašlem nebo má příznaky neurologické, je důležité rozšířit vyšetření o CT mozku a hrudníku k vyloučení metastáz v plicích. Magnetická rezonance má stejný význam jako CT a mimoto je vhodná pro pacienty s alergií na jodovou kontrastní látku nebo pro těhotné ženy. Doplňující vyšetření, kterým je scintigrafie skeletu, se žádá při zvýšené koncentraci alkalické fosfatázy v séru nebo u bolesti kostí k vyloučení kostních metastáz [31; 34; 35].

#### **3.4.4 Bioptické metody**

Biopsie zasažené části ledviny je využívána zejména pro definitivní určení diagnózy. Poskytne nejbližší informace o typu a povaze nádoru, které pomohou lékaři při rozhodování o dalším postupu (léčba, sledování rezistence). Nejčastější indikací pro podstoupení biopsie je nejasný nález u zobrazovacích metod, porucha renálních funkcí nebo sledování malé léze. Vždy je nutné pečlivě zvážit, zda je bioptický výkon opravdu třeba, jelikož se jedná o náročnou a invazivní metodu, která má svá rizika. Ledvinná tkáň (nejčastěji kůra) se odebírá v lokální anestézii bioptickou jehlou o velikosti například 14–16 G a pod kontrolou některé ze zobrazovacích metod se sondou (US nebo CT). V případě použití takovéto jehly je odebraný váleček kompaktní tkáň

považován za reprezentativní, je-li 10 cm dlouhý a 0,1 cm široký (obsahuje cca 10 glomerulů). Zpracování a podrobné vyšetření odebraného vzorku tkáně se realizuje v histologické laboratoři [36; 37; 38; 39].

### **3.5 Léčba**

Na léčbě se podílejí lékaři různé specializace (onkolog, urolog, radiolog, aj.) a druh léčby se odvíjí od typu nádoru, klinického stadia, věku a celkového stavu pacienta [30].

#### **3.5.1 Parciální nefrektomie**

Parciální nefrektomie (PN) slouží k resekci nádorové části ledviny, nikoliv celého orgánu. Je možné ji provést otevřeně, ale kvůli vyšší bezpečnosti se preferuje minimálně invazivní přístup laparoskopicky či roboticky asistovanou chirurgií. Její vykonání se doporučuje u všech lokalizovaných nádorů ledvin I. a II. stádia (T1N0M0 a T2N0M0), renální insuficienci, solitární ledviny a bilaterálních nádorů. Po zákroku má téměř 100 % pacientů šanci na pětileté přežití bez onemocnění [25; 40].

#### **3.5.2 Radikální nefrektomie**

Cílem radikální nefrektomie (RN) je odstranění celé ledviny včetně okolní tukové tkáně. K RN se standardně přistupuje u II. a III. stádia (T2N0, T3N0 nebo T1-3N1). V případě I. stádia jen pokud není možné provést PN (nedostatečné technické vybavení, zvýšené riziko komplikací). Před operací je zjištěna velikost novotvaru, aby se během výkonu zabránilo poškození nádorové tkáně a uvolnění nádorových buněk do krevního řečiště (tumor spillage). Ve srovnání s PN mají pacienti zvýšené riziko zhoršení renálních funkcí, ale přívětivé vyhlídky na pětileté přežití po operaci má až 90 % pacientů [25; 41].

#### **3.5.3 Aktivní sledování**

Aktivní sledování neboli monitorování nádoru zobrazovacími metodami. Je vhodná volba pro I. stádium (T1aN0M0) a využívá se u pacientů s věkem nad 75 let, kteří nemohou podstoupit chirurgickou léčbu, jelikož se u nich současně vyskytuje více onemocnění a operace by je ohrozila na životě. Dále například u pomalu rostoucích nádorů (0,5 cm za rok) [25; 42].

### 3.5.4 Abláční léčba

Alternativní způsob léčby u I. stádia může zahrnovat zmrazení nádorových buněk tekutým dusíkem či argonem (kryoablace). Na rozdíl od chirurgické operace se mohou dostavit komplikace (perirenální hematoma, poranění okolních orgánů, přetrvání nádorových buněk) a je zde vyšší pravděpodobnost recidivy. Pacient je kontrolován každé 3 měsíce pomocí CT [25; 43].

Další možností je radiofrekvenční ablace (RFA) též u I. stádia, kdy vysokofrekvenční radiové vlny produkují teplo ke zničení nádorových buněk. I tento způsob léčby má vedlejší účinky (parestezie pokožky) a pacient dochází na kontroly každé 3 měsíce [25; 44].

### 3.5.5 Embolizace

Embolizace nádoru je šetrná předoperační léčba u pacientů se silnou hematurií, lumbagií nebo polymorbiditami. Jejím cílem je zabránění přívodu krve do nádoru zablokováním cévy, kontrola a zmírnění příznaků před plánovaným chirurgickým zákrokem [45].

### 3.5.6 Léčba metastazujícího RCC

Volba léčebného postupu závisí na rozsahu onemocnění, histologii, ale hlavně na zdravotním stavu pacienta. Klade si za cíl prodloužit délku života redukcí primárního a sekundárního nádoru. Léčba metastatického nádoru ledvin může být lokoregionální (cytoredukční nefrektomie, metastazektomie, radioterapie) nebo systémová (chemoterapie, imunoterapie). Lékař může požadovat oba léčebné způsoby. V případě radioterapie je cílem eliminovat symptomy a zmírnit bolest. Většina nádorů je chomerezistentní i radiorezistentní a imunoterapie cytokiny (IFN- $\alpha$ , IL-2) se dle dostupných studií zdá být účinná jen pro léčbu metastatického světlobuněčného renálního karcinomu (ccRCC) a u nemocných s dobrou prognózou podle MSKCC (žádný rizikový faktor, medián celkového přežití 20 měsíců). Chemoterapie je efektivní v kombinaci 5-fluorouracilu s imunoterapií [46; 47].

V dnešní pokrokové době se lékaři více přiklánějí k biologické léčbě. Principem je inhibice nádorové angiogeneze (antiangiogenní léčba) využitím inhibitorů vaskulárního

endoteliálního růstu (bevacizumab), inhibitorů receptorové tyrozin kinázy (sunitinib, sorafenib, pazopanib) a inhibitorů mTOR, zabraňujících produkci HIF (everolimus, temsirolimus) [47].

### 3.6 Světlobuněčný renální karcinom

Světlobuněčný renální karcinom (ccRCC), pocházející z epitelálních buněk proximálního tubulu, je nejčastěji diagnostikovaným typem maligního renálního karcinomu. Tvoří až 75 % všech RCC a muži ve věku  $\geq 60$  let (průměr 62 let) mají větší předpoklady k jeho rozvoji než ženy stejného věku. Pacienti s genetickou zátěží v podobě vrozené mutace (80 % pacientů) na chromozomu 3 (VHL syndrom) a u těch, u kterých dojde ke ztrátě i druhé alely, také mutací, se rozvine světlobuněčná forma renálního karcinomu. Zbýlých 20 % pacientů s VHL syndromem postihla tak zvaná „de novo“ mutace a najde se u nich i bez rodinné anamnézy. Příčina vzniku ccRCC poškozením obou alel genu VHL se týká až 75 % nemocných [48; 49; 50].

#### 3.6.1.1 Makroskopický a mikroskopický vzhled

Na pohled je viditelný solidní kulatý útvar s hrbolatým povrchem o velikosti 2,3–17 cm, většinou vybočující nad konturu ledviny až do tukového pouzdra. Vychází z jakékoli části ledvinné kůry a pokud prorůstá do ledvinné pánvičky, je to známka pokročilého ccRCC. Od zdravé ledvinné tkáně je dobře a ostře ohraničený, může obsahovat pseudopouzdro. Nádor je tvořen převážně lipidy a glykogenem, což zapříčiňuje jeho žluté zbarvení. Díky bohatému cévnímu zásobení můžeme na řezu novotvarem zpozorovat sekundární změny ve formě hemoragií. Vzácně se objevují změny stromatu v podobě fibrotizace, hyalinizace a kalcifikace nádoru. U low-grade malignity se vyskytují změny cystické a pro ccRCC s high-grade jsou typické tuhé a nekrotické oblasti. V takovém případě může být nádor bělavé barvy a svědčit o sarkomatoidní transformaci nádoru. ccRCC tvoří v mikroskopu solidní, tubulární (napodobuje-li strukturu kanálků) či cystické struktury. Polygonální nádorové buňky jsou obklopené vaskulární sítí, mají kulatá jádra a výraznou buněčnou membránu. Svůj název „světlobuněčný“ dostal podle vzhledu cytoplazmy, která je velmi světlá až vodojasná. Intenzita barvitelnosti cytoplazmy závisí na době fixace tkáně, jelikož glykogen je rozpustný ve fixační tekutině a lipidy se během zpracování tkáně rovněž rozpouštějí. Cytoplazmu vyplněnou glykogenem a lipidy lze lépe pozorovat zpracuje-li

se tkáň nativně pomocí kryotechniky a obarví speciálními barvicími metodami pro ně vhodnými [48; 49; 51].

#### 3.6.1.2 Subtypy

Formu ccRCC s nízkým maligním potenciálem a velmi příznivou prognózou představuje multicystická varianta, která tvoří 4 % všech ccRCC, nikdy nerecidivuje a nemetastazuje. Vyskytuje se jako solitární léze a je tvořena nadměrným množstvím cyst, které jsou vystlané jednou vrstvou světlobuněčného karcinomu [52].

Nepříznivou prognózu vykazuje granulární varianta ccRCC s eozinofilní cytoplazmou, která může způsobit hnědý makroskopický vzhled nádoru. Granulární změny mohou postihnout jen část ccRCC nebo celý nádor a jejich plynulý přechod je viditelný pod mikroskopem. V nádorové části s granulárními změnami se mnohdy objevují tak zvané hyalinní sklovité globule o průměru 1–30  $\mu\text{m}$ . Tyto globule mají eozinofilní vzhled a pokud se vyskytují extracelulárně, tvoří shluky. V cytoplazmě granulárních buněk nalezneme více nepravidelně rozmístěných granul než lipidů a glykogenu. Bývá přítomno i větší množství makroskopických hemoragií a nekróz. [49; 53].

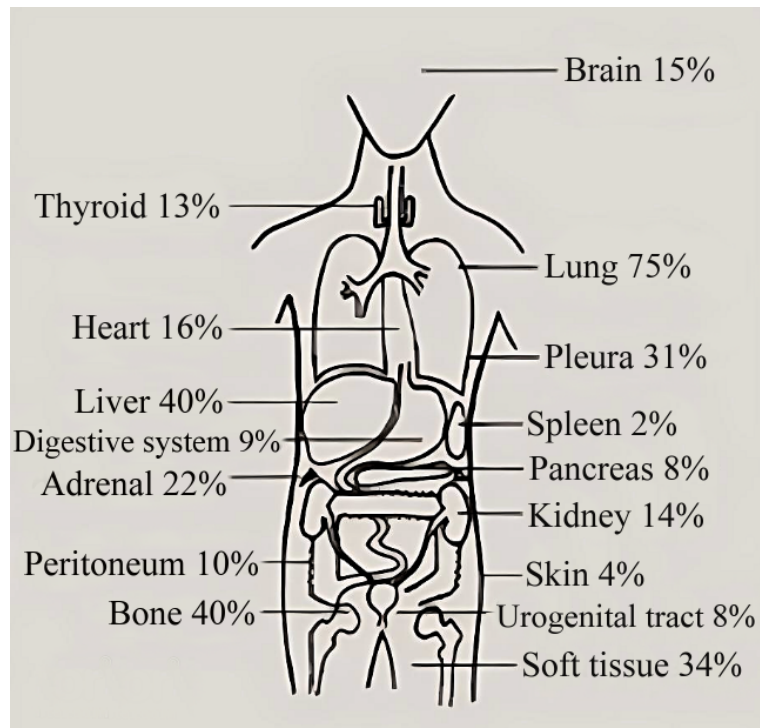
#### 3.6.1.3 Imunohistochemický profil

Imunohistochemické vyšetření (IHIC) není pro diagnostiku ccRCC až tak podstatné. Metoda detekuje tkáňové antigeny specificky vytvořenými protilátkami, které se vážou na buněčné komponenty (proteiny, organely, aj.). Cytokeratin 7 (CK7) se používá k odlišení chromofobního renálního nádoru od ccRCC, kdy pozitivitu vykazuje právě cytoplazma chromofobního RCC. Buněčná jádra ccRCC lze prokázat protilátkou PAX 2 nebo citlivější PAX8. Další pozitivní reakce mohou být s protilátkou CD10 (proximální tubuly), S 100 (cytoplazma, jádro), EMA k identifikaci nádorů odvozených z epitelálních buněk, vimentin se barví intenzivněji u ccRCC s high-grade malignitou [50; 54; 55].

#### 3.6.1.4 Metastázy

Rozmanité metastatické cesty umožňují ccRCC vytvářet ložiska v nejrůznějších lokacích. Pozdní metastázy, které jsou pro ccRCC typické, se mohou nalézat na

nestandardních lokalizacích, jako je pankreas, slinná žláza, žlučník, tenké střevo a ztěžovat tak diagnostiku (záměna s primárním nádorem). Má sklon metastazovat hematogenní cestou do vzdálenějších orgánů, nejčastěji do plic a skeletálního systému. Do plic se dostává renálními žilami a dutou žílou. Metastázy v CNS, hlavě, krku a kostech vznikají šířením ložisek bederními žilami a paravertebrálními žilními pleteněmi, které se spojují s durálními žilami a dole s pánevními žilami [50; 56; 57].



Obrázek 2 – Možný výskyt metastáz u pacientů s diagnostikovaným RCC (převzato a upraveno) [50]  
**Brain** – mozek; **Lung** – plíce; **Pleura** – pohrudnice; **Spleen** – slezina; **Pancreas** – slinivka; **Kidney** – ledvina;  
**Skin** – kůže; **Urogenital tract** – urogenitální trakt; **Soft tissue** – měkké tkáně; **Thyroid** – štítná žláza;  
**Heart** – srdce; **Liver** – játra; **Digestive systém** – trávicí systém; **Adrenal** – nadledviny; **Peritoneum** – pobřišnice;  
**Bone** – kost

## **4 METODIKA**

### **4.1 Příprava bioptické tkáně pro zpracování**

#### **4.1.1 Příjem materiálu**

Laborant, přijímající bioptický materiál, má povinnost zkontrolovat správnost a úplnost údajů nejprve na histologickém průvodním listu a na odběrové nádobce s materiálem. Průvodka i štítek na nádobce musí obsahovat shodné jméno, příjmení a rodné číslo. Kontroluje se i kvalita dodaného materiálu (dostatek fixační tekutiny, velikost nádoby). Tkáně, které mají být zpracovány standardní technikou parafinových bločků, se do laboratoře odesílají fixované, ponořené ve fixační tekutině. Výjimku tvoří nativní tkáň (nefixovaná), odebraná například v průběhu operačního výkonu (peroperační biopsie) a ta je určena k neodkladnému zpracování zmrazovací technikou v kryostat. Dále se kontroluje číselná a klinická diagnóza na žádance, kód pojišťovny, druh použité fixační tekutiny, datum odběru vzorku, razítko a podpis lékaře požadujícího histologické vyšetření. Také je důležité zkontrolovat, zda je klinikem uveden předmět vyšetření a oblast odběru (levostranná či pravostranná ledvina). Po důkladné kontrole a nezaznamenání žádné chyby nebo chybějící informace, se laborant na žádanku podepíše a zaznamená čas příjmu vzorku [58].

V případě jakékoli nesrovnalosti (nesprávné označení vzorku, chybějící údaje na žádance, špatný způsob fixace, nečitelné údaje, aj.) se problém řeší, nejlépe ihned na místě, s kompetentním pracovníkem z oddělení, ze kterého byl materiál poslán. Podle závažnosti komplikace je nesrovnalost s oddělením vyřešena, nebo se materiál odmítne a odešle zpět na oddělení. V obou případech se vzniklá nežádoucí událost zaznamená do knihy neshod [58].

#### **4.1.2 Evidence a značení materiálu**

Po příjmu materiálu následuje zápis žádanek do programu UNIS Steiner (univerzální nemocniční informační systém), do sekce s názvem „biopsie“. Do systému se evidují všechny údaje ze žádanky. Vzorku se přiřadí bioptické číslo a vytisknou se dva totožné štítky s čárovým kódem. Jeden přijde na žádanku a druhý na příslušnou nádobu s materiálem. Údaje na štítku s čárovým kódem obsahují identifikaci pacienta (jméno,



příjmení, rodné číslo) a například číslo B 120/23 (B = biopsie, 120 = pořadové číslo materiálu, 23 = rok 2023).

## 4.2 Vlastní zpracování bioptické tkáně

### 4.2.1 Přikrojení orgánu

Zaevidovaná a označená průvodka spolu s materiálem pokračují na přikrajovnu. Příprava k přikrajování (zablokování) zahrnuje nachystání nástrojů (přikrajovací prkénko, skalpel, anatomické a chirurgické pinzety, ambulanti nůžky), dbá se na bezpečnost práce čili nesmí být vynechána příprava ochranných pomůcek (rukavice, zástěra, ochranné brýle, štít) a dalšího vybavení (různobarevná tuš pro označení resekčních okrajů, akvarelový štětec, aj.). Tisk kazet pro budoucí zpracování tkáně probíhá automaticky v programu Perseus. Laborant pouze načte čárový kód z nádoby materiálu, navolí počet kazet k tisknutí (pro ledvinu minimálně 10 kazet) a zkontroluje vytištěnou kazetu (intenzitu barvy a správnost čísla). První kazeta pro materiál B 120/23 bude automaticky označena programem jako 23B00120 -01/1 (-01 = první nádoba náležící číslu B 120/23 a číslo 1 za lomítkem znázorňuje první kazetu pro materiál v nádobě jedna). Lékař patolog s laborantem před samotným přikrajováním zkontrolují identifikační údaje ze žádanky a nádoby s orgánem, aby nedošlo k záměně s jiným materiálem nebo s jiným pacientem. Během zpracování lékař diktuje makro popis, který laborant zaznamenává do položky „zpráva“ v programu UNIS Steiner. Orgán se zpracovává do připravených a označených kazet následovně: Do prvních tří kazet přijde ledvinné pouzdro, do dalších tří ledvinná pánvička a do čtyř kazet se vyblokuje nádor. Pokud lékař požaduje fotodokumentaci orgánu, laborant musí spustit program MacroPath, který zhotovuje fotografie makroskopického materiálu. Po umístění excidované tkáně (nejlépe o velikosti 1 x 1 x 0,5 cm) do kazety se kazeta uzavře víčkem a vloží do uzavíratelné nádoby s 10% formalínem. Na přední stranu žádanky laborant uvede počet přikrojených bloků (bl–10) a doplní kódy výkonů pro vykazování pojišťovnám. V posledním kroku laborant přichystá žádanky do místnosti k zalévací lince, kde se bude materiál následující den dále zpracovávat.

Pro správné přikrojení materiálu je nutné dodržovat určité zásady.

- Zpracovávat materiál na čisté ploše, aby se předešlo kontaminaci.

- S tkání zacházet šetrně a používat ostré nástroje.
- Zhotovovat tenké a rovné řezy jemným plynulým pohybem.
- Nepřepřlňovat kazety, v opačném případě by nedošlo ke správnému odvodnění tkáně a prosycení reagensy při dalším zpracování.
- V případě malého fragmentu umístit excizi na filtrační vložku, aby nedošlo k nechtěnému odplavení vzorku otvory v kazetě během dalšího zpracování [59].

## 4.2.2 Fixace tkáně

### 4.2.2.1 Chemická fixace tkáně

Fixace tkáně je nejdůležitější krok preanalytické fáze v histologii. Ihned po vyjmutí tkáně z těla je vložena do vhodné fixační tekutiny (fixativuma), za účelem její stabilizace a ochrany před autolýzou, která nastává po uvolnění enzymů z buněk nebo kvůli případné degradaci tkáně způsobené mikroorganismy (hniloba). Pokud by vzorek zůstal bez fixativa, znamenalo by to rozvoj rozkladných změn ve tkáni s jejím následným a trvalým poškozením [60; 61].

Vybírá se z fixačních činidel, která mají specifické vlastnosti a splňují požadavky na ně kladené. Mezi tyto požadavky patří například rychlé pronikání do tkáně, zachování její struktury a barvitelnosti. Optimální poměr objemu fixativa vůči materiálu by měl být 20:1. Nejvyužívanější druh fixace vzorku je fixace chemickými prostředky, konkrétně 8–10% formolem (formalín). Formol je vodný roztok plynného formaldehydu. Na Patologicko-anatomickém oddělení Oblastní nemocnice Kladno (PAO ONK) je s oblibou používán 4% pufrovaný formaldehyd (10% formalín), jelikož se tak předejde oxidaci formaldehydu na kyselinu mravenčí, která by se ve tkáni projevila formou černých teček jako nechtěných artefaktů. Doba setrvání materiálu ve fixativu (před jejím přikrojením) se odvíjí od velikosti tkáně. Může se pohybovat od 6–24 hodin, ale i 48 hodinová fixace je přípustná. Obecně platí, že tkáň opustí fixační tekutinu až tehdy, je-li přikrajována nebo se přesouvá již excidovaná v kazetách do tkáňového automatu na konci pracovní doby. Nepřikrojené a zbylé části materiálu zůstávají v původní odběrové nádobě s fixační tekutinou, uskladněné ve speciálních místnostech při pokojové teplotě, a likvidují se po 2 měsících od stanovení definitivní diagnózy [60; 61].

Druh fixativa se také vybírá podle struktury tkáně a její části, kterou chceme sledovat pod mikroskopem. Používána jsou alkoholová fixativa (methanol, ethanol), kyseliny (octová, pikrová), soli těžkých kovů (chlorid rtuťnatý, oxid osmičelý) a směsi. Pro zobrazení tuků je vhodná Bakerova fixační směs (10% formol + chlorid vápenatý + pramenitá voda), která redukuje solubilitu nepolárních lipidů a například pro hemoragické materiály je zcela nevhodná Bouinova fixační směs (kyselina pikrová + 40% formaldehyd + ledová kyselina octová), tkáň v ní hemolyzuje a tvrdne. Tato skutečnost způsobuje komplikace při krájení řezů [62].

#### 4.2.2.2 Fyzikální fixace tkáně

Fixace tkáně zmrazením je nejvyužívanější fyzikální metoda fixace zejména u nativních vzorků peroperační biopsie. Poté, co je do laboratoře přijata nativní tkáň, obvykle po předchozí domluvě operujícího lékaře a patologa, je tkáň standardně přikrojena a připravena pro její zpracování v kryostatu. Přikrojený vzorek se položí na předchlazený disk na vzorky s mrazícím médiem, zatíží se a nechá mrznout na rychlozmrazovacím pultu (Peltierův článek) při teplotě -35 °C. Takto připravený vzorek se poté krájí v kryokomoře. Celkový postup zpracování laborantem a vyhodnocení preparátu v mikroskopu patologem by neměl přesáhnout 20 minut. Cílem je předat chirurgovi informace o povaze tkáně (benigní či maligní léze, resekcční linie, metastázy v lymfatických uzlinách) [58].

Fixace mrazem se využívá i v průkazu cytoplazmatických struktur světlobuněčného renálního karcinomu (glykogen, lipidy). Standardně je nádorová ledvina (včetně tukového pouzdra) po resekci umístěna do fixační tekutiny (10% formalín) a odnesena do laboratoře, kde se fixuje přijatelnou (potřebnou) dobu. Ale v případě, že nás zajímá průkaz glykogenu ve světlobuněčném renálním karcinomu, preferuje se ledvinu frontálně rozříznout a odebrat vzorek tkáně infiltrované nádorem, který budeme zpracovávat zmrazovací technikou v kryostatu (makro popis zaznamenává patolog do diktafonu). Je totiž pravděpodobné, že se tkáň ve formolu nestihla prosytit do hloubky a glykogen, jakožto látka ve formolu rozpustná, zůstala zachována. Při velmi rychlém zpracování je též vyšší šance na záchyt nepoškozených proximálních tubulů, které po resekci ledviny autolyzují jako první (mají buňky s vysokou úrovní

metabolismu). Rozříznutá ledvina se umístí zpět do formalínu a přikrojí se až po jejím dostatečném zfixování [60].

### 4.2.3 Příprava tkáně pro zalití do parafínu

Vlastnímu zalití tkáně do zalévacího média předchází 3 kroky v úpravě tkání ve tkáňovém automatu TPC 15 Duo (k vidění na obrázku 3). Tyto kroky zahrnují dehydrataci tkáně, prosycení intermediem a prosycení zalévacím médiem. Použité roztoky a doba setrvání materiálu v jednotlivých lázních jsou vypsány v tabulce 5.

Tabulka 5 – Odvodňovací, projasňovací a prosycovací proces úpravy tkáně před jejím zalitím [58]

Lázeň	Roztoky	Čas
1	AAF	30 minut
2	AAF	1 hodina
3	96% alkohol	30 minut
4	96% alkohol	1 hodina
5	96% alkohol	1 hodina
6	96% alkohol	1 hodina
7	96% alkohol	1 hodina
8	96% alkohol	1 hodina 30 minut
9	xylén	30 minu
10	xylén	30 minut
11	xylén	1 hodina
12	parafín	30 minut
13	parafín	1 hodina
14	parafín	2 hodiny
15	parafín	3 hodiny

Koš se vzorky nejprve putuje do dvou lázní s rychlofixačním roztokem, kde se tkáně dofixují. Námi použitý rychlofixační roztok je směs alkoholu, kyseliny (acid) a formolu a podle těchto použitých chemikálií získal rychlofixační roztok svou zkratku AAF. Připravuje se smícháním 96% ethanolu, 99% kyseliny octové a 40% formolu. Následuje odvodnění tkáně sledem šesti lázní s 96% denaturovaným ethanolem. Ze vzorků je třeba odstranit vodu (náhradou za alkohol), jelikož další krok probíhá v hydrofobním prostředí, a to není s vodou mísitelné. Projasnění vzorku (tkáň se stává průsvitnou) se uskutečňuje ve třech lázních s čistícím organickým činidlem, kterým je xylen (nahradí ethanol ve tkáni). V posledním kroku projdou vzorky čtyřmi lázněmi s parafínovým voskem BaWax o rozsahu bodu tání 54–56 °C. Projasňující xylen se odpaří z tkáně, aby mohla být kompletně prosycena parafínem. Koš se vzorky zůstává v poslední lázni s parafínem i po dokončení programu, dokud laborant program nevypne. Tkáňový

automat tedy obsahuje 15 stanic a celková doba odvodnění, projasnění a prosycení tkáně činí 16 hodin.



Obrázek 3 – Tkáňový automat TPC 15 Duo se vzorky v nerezovém drátěném koši (foto autora)

#### 4.2.4 Zalévání tkáně do parafínu

Nepolymerní parafín o rozsahu bodu tání 55–57 °C je speciální a ideální zalévací médium, které umožní pozdější práci s tkání na mikrotomu. Tkáně zalité v parafínu získají požadovanou a potřebnou konzistenci ke krájení. Následující den, když je program přípravy tkáně pro zalévání ukončen, laborant vyjme koš a přesune se k zalévací lince TES Valida zobrazené na obrázku 4. Tento zalévací systém se skládá z chladicího modulu, parafínového dispenseru a předehřivacího modulu s horní komorou pro zalévací formy. Kazety se vzorky se přesypou do předehřivacího modulu (60 °C), aby bylo zajištěno jejich prohřívání a zabránilo se tuhnutí parafínu, zatímco čekají na zalití. Jednotlivé kazety mohou být srovnány podle pořadových bioptických čísel (statimová vyšetření se zalévají přednostně). Postup zalévání tkáně probíhá následovně:

- 1) Z předhřivacího modulu vyjmete jednu kazetu s materiálem a přemístíte na vyhřívanou pracovní plochu.
- 2) Po otevření kazet zjistíme velikost materiálu a podle ní si připravíme vhodnou zalévací formu z horní komory předehřivacího modulu.

- 3) Umístíme formu pod trysku parafínu a napustíme do ní dostatečné množství parafínu, ale jen takové, aby z formy nepřetékal.
- 4) Do formy s parafínem přeneseme vzorek pomocí vyhřívané pinzety, správně ho naorientujeme (řezná plocha, hrana) a necháme chvíli prohřát.
- 5) Formu přemístíme na chladicí podložku, kde tkáň částečně ztuhne a přilne ke dnu formy.
- 6) Nyní formu se vzorkem přikryjeme původní označenou kazetou, ve které byl vzorek uchovaný a dolijeme parafín v přiměřeném množství (nesmí přetékat).
- 7) Formu položíme na plochu chladícího modulu (-10 °C) a necháme vychladnout.
- 8) Z dostatečně vychlazených formiček vyloupneme kazetu se zalitou tkání, čímž získáme tak zvaný parafínový bloček, který ještě očistíme od přebytečného parafínu a odneseme do mrazáku k mikrotomu, kde se z něj budou zhotovovat histologické řezy.

Protože zalévací linka v určitých místech produkuje vysoké teploty, musí být obsluhující laborant svědomitý a dbát na bezpečnost při práci, mohl by se nedopatřením popálit. Během zalévání vzorků tkáň je také nutné vyvarovat se různým komplikacím, mezi které patří například nesprávná orientace vzorku (když je např. viditelný pouze povrch sliznice). Dále při použití nevyhřívané pinzety může dojít ke kontaminaci vzorku tkání od předešlého vzorku, která ulpěla ve ztuhlém parafínu v drážkách pinzety. S tkáněmi manipulujeme šetrně a s obezřetností, především během přitiskávání vzorku ke dnu formy (zabránit zlomení, potrhání vzorku). Formy nesmějí být na chladícím modulu moc dlouho, při jejich přemrazení parafín popraská, nepřiléhá ke tkáni a blok se bude obtížněji krájet nebo se bude muset zalít znovu. Nepříjemná je záměna vzorků, proto laborant musí z předehřívací komory připravit vždy jen jednu kazetu [59; 63].



Obrázek 4 – Zalévací linka TES Valida (foto autora)

## 4.2.5 Zhotovení histologických řezů

### 4.2.5.1 Krájení parafinových bloků

Histologické řezy pro světelnou mikroskopii se získávají na mikrotomech, což jsou přístroje pro přesné krájení. Na PAO ONK se parafinové bloky krájí na dvou typech mikrotomu. Prvním a preferovanějším mikrotomem je automatizovaný rotační mikrotom HistoCore AUTOCUT od společnosti Leica, vložený jako obrázek 5. Tento druh mikrotomu je určen především pro motorizované krájení sériových řezů (řezy jsou na sebe napojeny), ale lze jej použít i k manuálnímu krájení. Motorizované řezání laborant ovládá tlačítka na ovládacím panelu. Principem krájení na rotačním mikrotomu je otáčení hnacího kola s rukojetí, čímž se horizontálně vysunuje držák s upevněným bločkem o zadanou vzdálenost (1–10  $\mu\text{m}$ ), a tímto souvislým pohybem, manuálním či motorizovaným, se ukrojí řez požadované tloušťky (nejčastěji 3  $\mu\text{m}$ ). Druhý typ mikrotomu můžeme vidět na obrázku 6. Je jím sáňkový mikrotom Leica SM2010r, na kterém byly krájeny vzorky pro tuto bakalářskou práci. Na sáňkovém mikrotomu se posouváním mikrometrického šroubu pro jemný posuv pohybuje nožovými saněmi ve vertikálním směru k pevně připevněnému bločku.

Parafinový bloček s ledvinnou tkání patří mezi bezproblémově a snáze krájitelné materiály. Ledvinná tkáň infiltrovaná parafínem má totožnou konzistenci, jako samotný ztuhlý parafín bez tkáně. Proces krájení bloků a napínání řezů na sáňkovém mikrotomu vypadá následovně:

- 1) Připravíme si potřebné nástroje (štetec, preparační jehlu, buničinu), mikrotomovou žiletku zasuneme do držáku na žiletky, pákou pro žiletky ji upevníme a chráničem zakryjeme.
- 2) Na počítači spustíme program Perseus a v menu vybereme sekci „krájení“.
- 3) Hotový parafinový bloček vyjmeme z mrazáku a načteme jeho QR kód. Automaticky se nám vytiskne požadovaný počet skel (zadaný laborantkou při přikrajování materiálu) i s informací, jak se bude sklíčko s řezem dále barvit. Sklíčko pro barvení metodou Hematoxylin-eozin (HE) bude vypadat například takto: 23B00120 01/1-01 HE.
- 4) Zkontrolujeme číslo na vytisknutém sklíčku a porovnáme s bioptickým číslem na bločku. Bloček umístíme do kazetové (neapolské) svorky a nastavovacím šroubem naorientujeme sklon bloku, aby se skrajoval rovnoměrně.
- 5) Odkryjeme žiletku, odaretujeme nožové saně (začnou být pohyblivé) a kolečkem pro hrubý posuv skrojujeme bloček nahrubo (trimování) do té doby, než se prokrájíme ke tkáni po celé její ploše. Poté nastavíme finální tloušťku řezu a přejdeme k jemnému skrajování.
- 6) Po dokončení krájení přístroj zaaretujeme a zakryjeme žiletku. Ukrojené tenké řezy (2–3  $\mu\text{m}$ ) pokládáme do vodní lázně (40 °C), kde se působením teplé vody napnou.
- 7) Připravené sklíčko ponoříme do vodní lázně a napnuté řezy na něj nasměrujeme (na jednom skle jsou uprostřed umístěné maximálně tři řezy). Vzniklé preparáty necháme okapat ve stojánku ve vodorovné poloze.

Cílem je získat řezy o takové tloušťce, aby byly pozorovatelné světelnou mikroskopií a obsahovaly maximálně dvě vrstvy buněk. Rovněž u krájení tkáně postupujeme s rozvahou a dbáme na bezpečnost. Pokud se věnujeme jiné činnosti než samotnému krájení (čištění bloku od parafínu, pokládání řezu na vodní hladinu, aj.), je nejdůležitější zajistit zaaretování nožových saní na mikrotomu (tímto zabráníme jejich pohybu) a zakrýt žiletky, jinak se zvyšuje riziko pracovního úrazu pořezáním.

Kvalita řezů je ovlivněna nejrůznějšími faktory. Používání tupé či vadné žiletky způsobí rýhy v řezech a poškození zalité tkáně. Kvůli teplotní roztažnosti studeného bločku při krájení jsou prvotní řezy silnější, než je nastavená tloušťka na mikrotomu

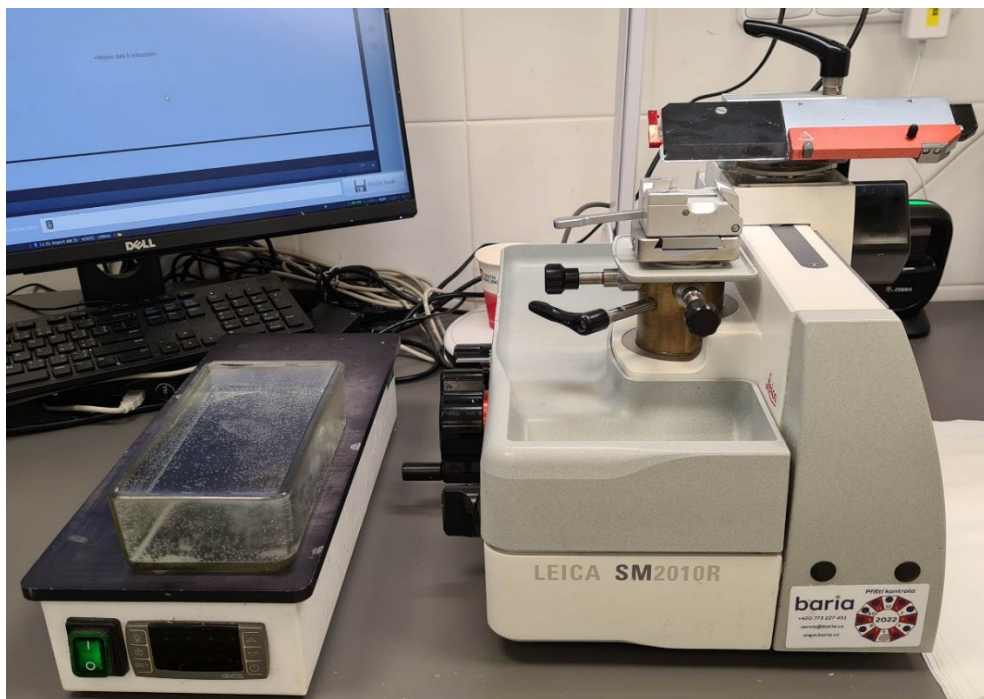


a nedoporučuje se tyto umístit na podložní sklo. Velký důraz je kladen i na zručnost laboranta, který musí krájet opravdu tenké řezy plynulým, rovnoměrným a pomalým pohybem s největší citlivostí. V žádném případě nesmí laborant vykrájet celou tkáň [59].

Voda v kyvetě pro napínání řezů by měla mít o 5–10 °C nižší teplotu, než je bod tuhnutí parafínu. V příliš teplé vodě se řez rozplyne a v chladnější vodě se naopak řez dostatečně nenapne, některé části zůstanou přeloženy přes sebe, vznikají různé sklady a zkroucení, což komplikuje mikroskopické vyhodnocování. Výhoda v potahovaných sklech je taková, že řez na sklo snadněji přilne a dokonale se na něj fixuje. Zajistí se tak jeho setrvání na skle při barvení (neodplaví se) [59].



Obrázek 5 – Rotační mikrotom HistoCore AUTOCUT s ovládacím panelem a nástroji ke krájení (foto autora)



Obrázek 6 – Sáňkový mikrotom Leica SM2010r s vodní lázní pro napínání řezů (foto autora)

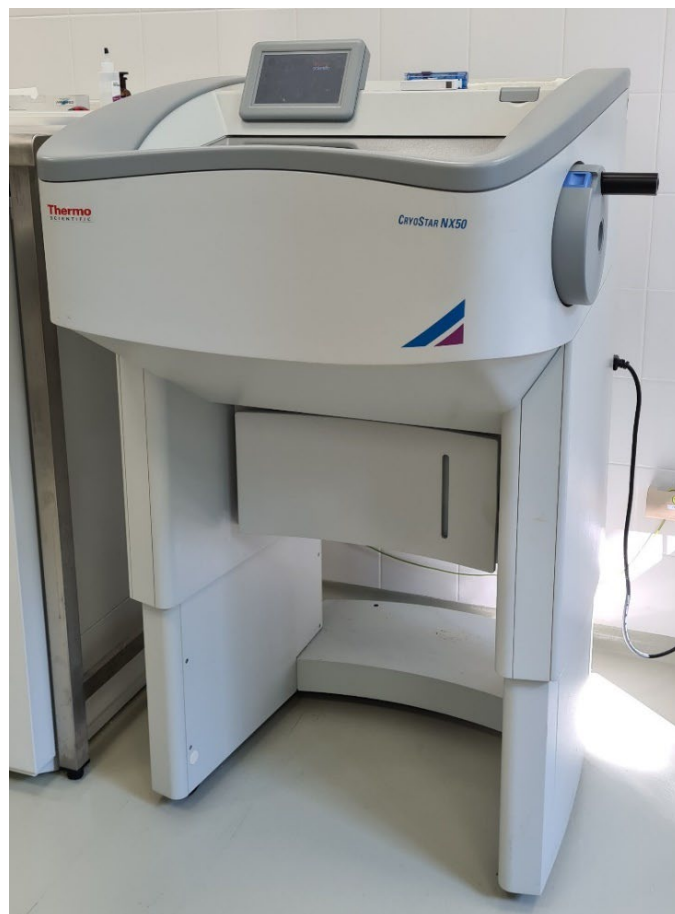
#### 4.2.5.2 Krájení zmrazeného tkáňového bloku

Důvodů, proč využít k diagnostice právě techniku zmrazených řezů, je hned několik. Od možnosti studovat citlivé enzymy a molekuly, až po realizaci specifického průkazu lipidů a glykogenu, jež mají význam pro diagnostikování ccRCC. Abychom se vyvarovali ztrátě tukových struktur v nádorových buňkách ccRCC, využili jsme pro jejich průkaz tuto rychlou, účinnou a efektivnější alternativní metodu k prosycení tkáně. Totiž organická činidla, jako je právě xylen používaný v projasňovací fázi během přípravy tkáně pro zalévání, odstraňují tukové struktury z tkáně stejně tak, jako formol rozpouští glykogen ve fázi dlouhodobé fixace tkáně. Touto metodou předejdeme jejich ztrátě [60].

Kryostat CryoStar NX50 (na obrázku 8) má zabudovaný rotační kryomikrotom, viz obrázek 7, na kterém se krájí řezy o tloušťce 1–100  $\mu\text{m}$  za teploty bodu mrazu. Krájení probíhá stejným způsobem jako u parafinových bločků s tím rozdílem, že tkáň je zmrazená. Řezy se kladou na podložní sklíčka a barví se základním či speciálním histologickým barvením. Zbytku neukrojené tkáně se přiřadí označená kazetka a zpracuje se parafínovou technikou pro definitivní histologii.



Obrázek 7 – Kryokomora se zabudovaným rotačním mikroskopem a připraveným vzorkem ke krájení (foto autora)



Obrázek 8 – Kryostat CryoStar NX50 pro krájení zmrazených bloků (foto autora)

### 4.3 Barvení histologických preparátů

Proto, aby mohly být buňky pozorovány pod mikroskopem, musejí získat barvu. Existují různé druhy barviv, díky kterým budou od sebe odlišeny jednotlivé buňky a jejich struktury barevně i kontrastně. Barvení funguje tak, že kationtové nebo zásadité barvicí roztoky (hematoxylin, alciánová modř) se váží na aniontové buněčné složky, označují se jako bazofilní a barví se modře (DNA, RNA). Aniontové nebo kyselé barvicí roztoky (eozin, kyselý fuchsin) se váží na kationtové buněčné struktury označované jako eozinofilní a barví se růžově (mitochondrie, sekreční granula, kolagen). Většina řezů na PAO ONK se barví v plně automatizovaném barvicím přístroji Tissue-Tek Prisma & Film, které dávají na výběr z několika barvicích programů (HE, PAS, KOMBI, aj.) a navíc obarvená sklíčka rovnou zamontuje a vytvoří z nich trvalý preparát. Barvicí a montovací automat je znázorněn na obrázku 9. U ručního barvení se musí dodržovat přesné protokoly barvení. Výhodou u automatizovaných barvicích přístrojů jsou přesně dané časy pro barvení a omezení lidské chybovosti. Je nutné pravidelně kontrolovat a měnit barvy v kyvetách, jelikož dochází k jejich ředění a barví pak méně intenzivně [58; 60].

Tabulka 6 – Zacházení s preparátem před a po barvení [58]

<b>Odparafinování preparátů před barvením</b>		
Fáze	Proces	Čas
1.	Sušení při 65 °C	15 minut
2.	2x xylen	2x 10 minut
3.	3x alkohol	3x 5 minut
4.	voda	Krátký oplach
<b>Odvodnění a projasnění obarveného preparátu</b>		
Fáze	Proces	Čas
1.	2x alkohol	2x 5 minut
2.	1x alkohol-xylen 1:1	Krátký oplach
3.	3x xylen	3x 5 minut



Obrázek 9 – Barvicí a montovací přístroj Tissue-Tek Prisma & Film (foto autora)

Ještě před začátkem vlastního barvení se preparáty musejí odparafinovat. Barvicí roztoky jsou rozpustné ve vodě či alkoholu a parafin v preparátu blokuje navázání barvy na tkáň. Po odparafinování se preparáty obarví a pokud je budeme montovat do médií rozpustných ve vodě, poputují pak do několika kyvet s alkoholem, aby se vymyl rozpuštěný parafin s barvivou a tkáň se tak opět převedla do hydrofilní fáze. Nakonec se preparát opláchne pod vodou od alkoholu a zamontuje do vhodného média. V tabulce 6 je uveden souhrn těchto procesů, kterými musí preparát projít před začátkem barvení a po něm. [60].

#### 4.3.1 Hematoxylin-eozin

Na PAO ONK probíhá rutinní barvení metodou Hematoxylin-eozin (HE) v barvicím automatu. Je to kombinace zásaditého a kyselého barviva, který zajistí barevný kontrast mezi buněčnými složkami. Ve výsledném preparátu, tedy u každé buňky, uvidíme bazofilně zbarvená jádra a cytoplazmatické struktury se budou jevit eozinofilně. Metoda HE nám poskytne základní přehled o preparátu, ale nelze ji považovat za specifické barvení. K tomuto účelu slouží přesnější speciální metody barvení, které jsou cílené na odhalení určité části buňky [60; 64].

Pro ruční barvení je nejprve třeba připravit některé roztoky. Roztok eozinu se připraví smícháním 200 ml destilované vody, 70 ml 2% eozinu a 1 ml 99% kyseliny octové. Barvicí roztok eozinu do barvicího přístroje připravíme stejně, jen v trojnásobném množství. Mayerův hematoxylin naléváme do kyvety ze zásobní lahve. Postup barvení základní metodou HE je uveden v tabulce 7 [58].

Tabulka 7 – Postup základního barvení Hematoxylinem-eozinem [58]

Barvení Hematoxylin-eozin		
Fáze	Proces	Čas
1.	Barvit v kyvetě s Mayerovým hematoxylinem	5 minut
2.	Opláchnout řezy pod tekoucí vodou	
3.	Opláchnout v destilované vodě	
4.	Barvit v kyvetě s eozinem	2 minuty
5.	Opláchnout v destilované vodě	

#### 4.3.2 PAS reakce

Metoda PAS (Periodic acid-Schiff) patří mezi speciální barvení a je pojmenována dle používaných reagensů (kyselina jodistá, Schiffovo činidlo). V histologické laboratoři je běžně používanou metodou pro stanovení polysacharidů, nejčastěji glykogenu a jiných sacharidů v tkáňových buňkách. Tyto struktury se zobrazují sytě růžovou až purpurově červenou barvou. Princip reakce spočívá v oxidaci polysacharidů kyselinou jodistou na aldehydy, které poskytují se Schiffovým činidlem barevný komplex. Schiffovo činidlo je bezbarvý roztok fuchsinu (odbarvený oxidem siřičitým) a opět barevným se stává po uvolnění oxidu siřičitého. Postup barvení touto metodou je vypsán v tabulce 8 [60; 64; 65].

Pro ověření, zda se opravdu jedná o glykogen v buňkách ccRCC, jsme využili metodu A-PAS neboli PAS s  $\alpha$ -amylázou. Připravili jsme dva preparáty s ledvinovou tkání infiltrovanou nádorem (metodou parafinových řezů). První preparát se barvil metodou PAS a na druhý preparát se aplikovala  $\alpha$ -amyláza. Tato metoda nám pomohla při diagnostikování ccRCC. U preparátu zpracovaného metodou PAS byly v cytoplazmě buněk viditelné červenofialové makromolekuly, u A-PAS reakce byl glykogen v nádorových buňkách rozštěpen  $\alpha$ -amylázou.

Tabulka 8 – Postup barvení PAS reakcí [58]

PAS reakce		
Fáze	Proces	Čas
1.	Oplach v 3% kyselině octové	
2.	Barvit v alcianová modři o pH 2,5	30 minut
3.	Oplach v destilované vodě	
4.	Barvit v 1% kyselině jodisté	10 minut
5.	Oplach v destilované vodě	
6.	Barvit Schiffovým činidlem	30 minut
7.	Oplach pod tekoucí vodou	
8.	Dobarvit v Mayerovým hematoxylinu	5 minut
9.	Oplach pod tekoucí vodou	

### 4.3.3 Modrý Massonův trichrom

Znázornění kolagenního vaziva, které vzniklo reaktivními změnami stromatu a způsobilo fibrotizaci a hyalinizaci nádoru (částečné vymizení epitelové tkáně nádoru), jsme získali obarvením preparátu modrým trichromem. Rozlišuje se několik barev trichromů a podle nich se kolagenní vazivo zbarví buď zeleně (zelený trichrom světlou zelení), žlutě (žlutý trichrom šafránem) anebo v našem případě modře (modrý trichrom anilinovou modří). Červeně znázorňuje svalovinu a buněčná jádra modročerně. Barvení modrým Massonovým trichromem je sepsáno v tabulce 9 [65].

Tabulka 9 – Postup barvení kolagenního vaziva modrým Massonovým trichromem [58]

Modrý Massonův trichrom		
Fáze	Proces	Čas
1.	Barvit v roztoku Weigertova železitého hematoxylinu	5 minut
2.	Oplach pod tekoucí vodou	5 minut
3.	Oplach v destilované vodě	
4.	Barvit v roztoku Massonova fuchsinu	1 minuta
5.	Oplach v destilované vodě	
6.	Barvit v 1% kyselině fosfowolframové	5 minut
7.	Oplach destilovanou vodou	
8.	Barvit roztokem anilínové modři	10 minut
9.	Oplach v destilované vodě	
10.	Barvit v 1% kyselině octové	1 minuta
11.	Oplach v destilované vodě	

Weigertův železitý hematoxylin se připravuje před barvením vždy čerstvý, a to smícháním roztoku A (1 g kyselého fuchsinu + 100 ml deonizované vody + 1 ml ledové kyseliny octové) a roztoku B (2 g 2R ponceau + 200 ml deonizované vody + 2 g kyseliny fosfowolframové + 4 ml ledové kyseliny octové) v poměru 1:1 [58].

#### 4.3.4 Olejová červeň

Ke znázornění struktur bohatých na lipidy použijeme techniku zmrazených řezů v kryostatu, k obarvení preparátu zase barviva rozpustná v tucích. Jedním z těchto barviv je olejová červeň, která se v tuku rozpustí. Ve výsledném preparátu znázorní tukové kapénky červeně v kontrastu s modře zbarvenými jádry a světle růžovou okolní tkání. Jelikož se jedná o detekci tuků, nesmíme ukrojený řez na sklíčku vystavit ethanolu ani xylenu, v nichž je rozpustný. Preparát tedy po obarvení nebudeme odvodňovat ani projasňovat a rovnou přejdeme k montování. Metoda barví lipidy jednotně, jako celou jednu skupinu látek, ale neodliší od sebe jednotlivé druhy lipidů. Postup zvýraznění lipidů znázorňuje tabulka 10 [60; 65].

Tabulka 10 – Postup barvení lipidů olejovou červení O [58]

Olejová červeň		
Fáze	Proces	Čas
1.	Oplach v destilované vodě	
2.	Oplach v 50% alkoholu	
3.	Barvit olejovou červení O	20 minut
4.	Oplach v destilované vodě	
5.	Barvit Mayerovým hematoxylinem	6 minut
6.	Diferencování řezů pod tekoucí vodou	5 minut
7.	Oplach v destilované vodě	

Olejová červeň O se připraví smícháním 0,3 g olejové červeně O + 70 ml absolutního alkoholu a 30 ml destilované vody. Mayerův hematoxylin se do kyvet odlévá ze zásobní lahve [58].



## 4.4 Montování histologických preparátů

Rozlišujeme média ve vodě rozpustná (glycerin) a nerozpustná (solakryl). Pokud zvolíme montovací médium nerozpustné ve vodě, obarvený preparát pečlivě odvodníme a projasníme a až poté montujeme. V případě průkazu lipidů využijeme médium ve vodě rozpustné a montujeme přímo z vody. Za všech okolností musí být médium průhledná látka s vynikajícím indexem lomu světla a indexem lomu krycího skla. Po odpaření vody se montovací médium vytvrdí a pod krycím sklíčkem vznikne pevný a čirý film. Zamontováním preparátu se zvýší stabilita barvení a ochrana před mechanickým poškozením. Preparáty po projasnění nesmějí dlouho setrvat na vzduchu, neboť rychle osychají a tím pádem bychom pod mikroskopem spatřili vzduchové bubliny jako artefakty. Uzavírat (montovat) preparáty můžeme ručně nebo v barvicím a montovacím automatu, oba způsoby jsou vhodné pro vytvoření trvalého preparátu [60; 61].

### 4.4.1.1 Montování v automatu

Barvicí a montovací analyzátor Tissue-Tek Prisma & Film po poslední fázi barvení přemístí stojánek s preparáty do montovací části přístroje, sklíčka lze v něm ale montovat i samostatně, nezávisle na barvicím automatu. Přístroj si ze stojánku podává jednotlivé preparáty a překrývá je tak zvaným IPI Pathotape coverslipping filmem, který je naleptáván rozpouštědlem xylenem. Pokud by nastala nechtěná událost a analyzátor nasál s xylenem i vzduchové bubliny, ohlásí to alarmem a pověřený pracovník spustí proplach, aby montování preparátů mohlo pokračovat.

### 4.4.1.2 Ruční montování

Jsou i případy, kdy se neobejdeme bez ručního montování (porucha automatu, jiné médium). Na preparát kápneme přibližně 0,2 ml montovacího média (solakryl nebo glycerin), lehce přikryjeme krycím sklíčkem a jemným vytlačováním odstraníme případné bubliny. Očištěný a zatvrzelý preparát je takto připraven pro patologa k mikroskopickému odečtení a stanovení diagnózy.

## 4.5 Imunohistochemická analýza vzorku

Imunohistochemie (IHC) je doplňková speciální metoda, kterou může patolog, pokud ho zajímá přesná lokalizace určitého tkáňového antigenu, dodatečně požadovat po odečtení preparátu. A jelikož každá reakce vyžaduje protilátku proti antigenu, který chceme detekovat, detekujeme hledané tkáňové antigeny pomocí specifických primárních protilátek (přímá metoda IHC). Pozitivní reakce antigenu s protilátkou se projeví barevnou vizualizací. I imunohistochemická metoda může přispět k diagnostice ccRCC, není však v tomto případě prováděna rutinně, ale pouze v ojedinělých případech. Nelze na ni stavět celou diagnostiku ccRCC. Nejčastěji přináší ccRCC pozitivní reakci s protilátkami PAX8 nebo PAX2, CD10 a vimentinem. Naopak obvykle negativní bývá s protilátkami CK7, CD117 a AMACR [66; 67].

Na PAO ONK se imunohistochemická analýza vzorku zpracovává pomocí přístroje Ventana BenchMark GX (viz obrázek 10), přístroje, jenž samostatně a bez obsluhy aplikuje protilátku i barviva, které jsme navolili v programu Ventana. Pracovní postup zní následovně:

- 1) V programu Ventana nastavíme tisk štítku s identifikačními údaji vzorku a patologem požadovanou protilátku. Těmito štítky označíme adhezivní sklíčka TOMO.
- 2) Na rotačním mikrotomu Leica AUTOCUT ukrojíme řezy o síle 3  $\mu\text{m}$ , které umístíme na připravené sklíčko TOMA. Sklíčko přeneseme do stojánku a vložíme na 20 minut do termostatu při teplotě 58 °C.
- 3) Preparáty a reagentie vložíme do příslušných karuselů a v programu Ventana spustíme barvicí program.
- 4) Ukončení programu automat oznámí signalizací. Odvodněné a projasněné preparáty necháme zamontovat v montovacím automatu.



Obrázek 10 – Imunohistochemický automat Ventana BenchMark GX (foto autora)

## 5 VÝSLEDKY

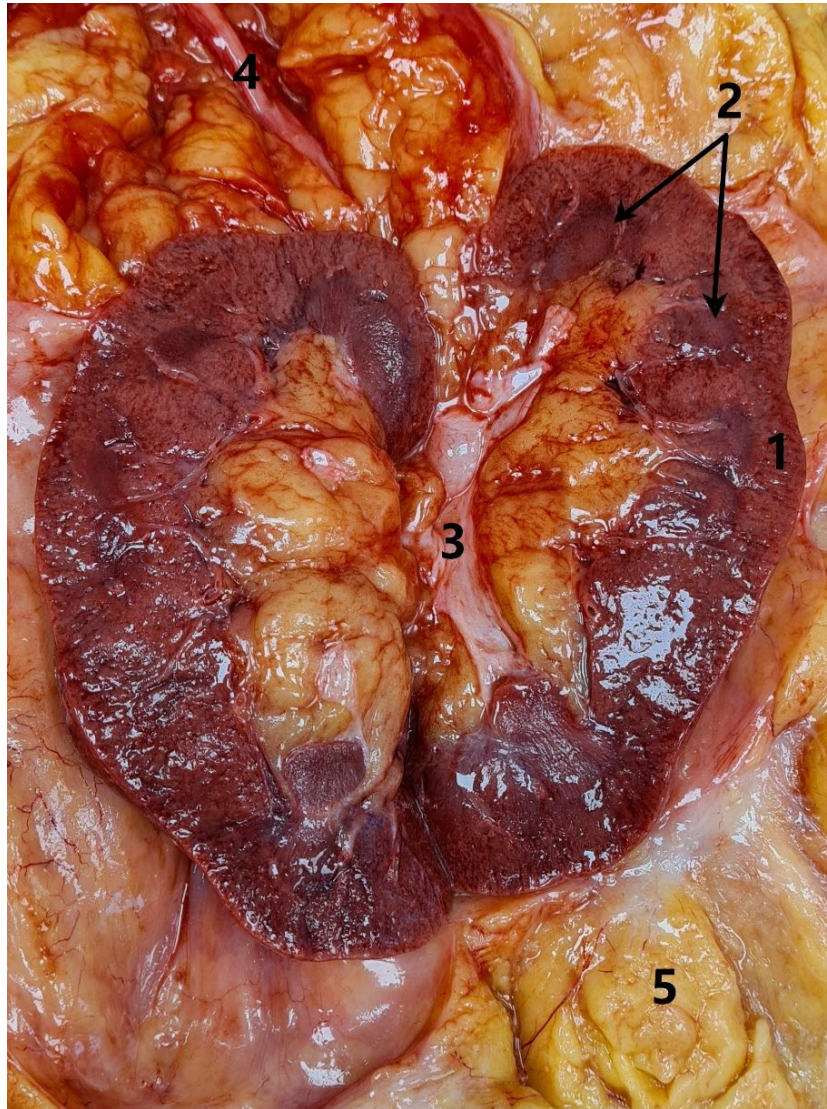
### 5.1 Makroskopie zdravé ledviny a ledviny s ccRCC

Na obrázku 11 vidíme přední plochu zdravé nativní ledviny fazolovitého tvaru a hnědé barvy s okolní tukovou tkání. Očividná je těž přirozená nepravidelnost ledviny, její kraniální pól je širší než kaudální pól.



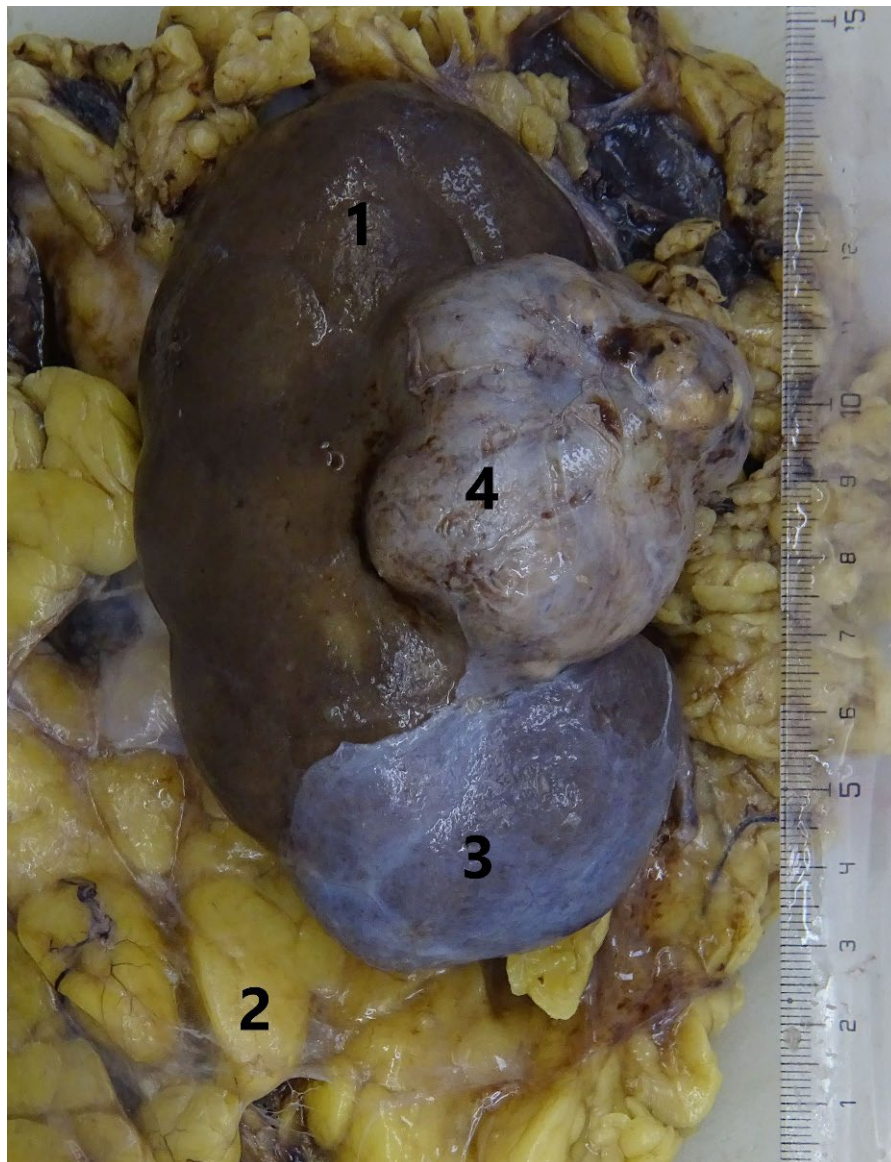
Obrázek 11 – Samostatná nativní ledvina po obnažení tukového pouzdra (foto autora)

Obrázek 12 znázorňuje totožnou ledvinu, jako na předchozím obrázku 11, ale tentokrát frontálně rozříznutou. Makroskopicky je patrná kůra (1), ledvinné pyramidy ve dřeni (2), pánvička ledvinná (3), močovod (4) a tukové pouzdro (5).



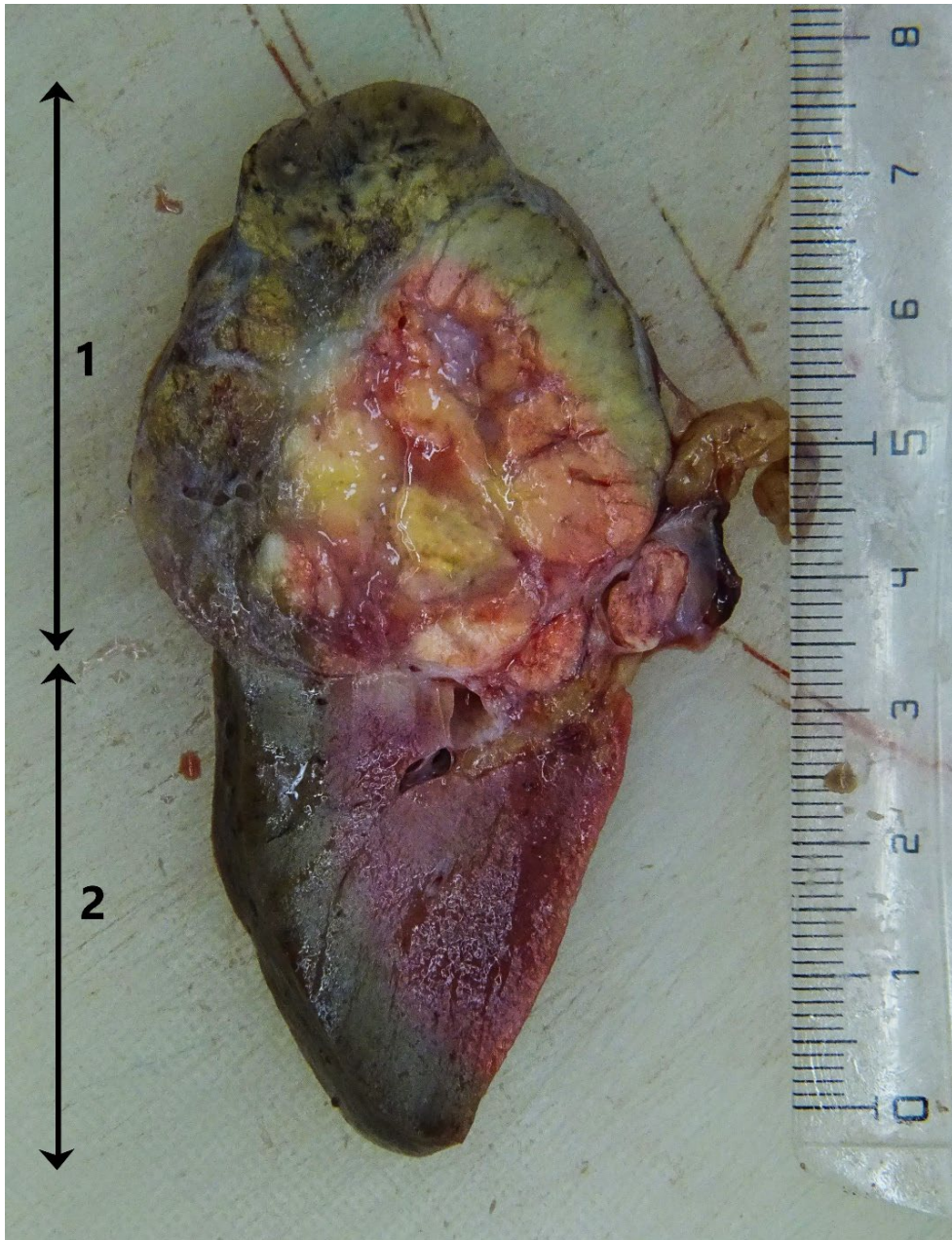
Obrázek 12 – Frontální řez nativní ledvinou bez nádoru (foto autora)

Na snímku 13 je ukázka tumorózní fixované pravostranné ledviny bez vazivového pouzdra (1) a tukového pouzdra (2), se zbylou částí vazivového pouzdra (3) a nádorového ložiska (4) se zbylou částí vazivového pouzdra. Samostatná ledvina je o velikosti 11 x 5 x 4 cm, s prominujícím, ventrálně uloženým nádorovým útvarem bělavé barvy o velikosti 5 x 4 x 4 cm.



Obrázek 13 – Patologicky změněná fixovaná ledvina (foto autora)

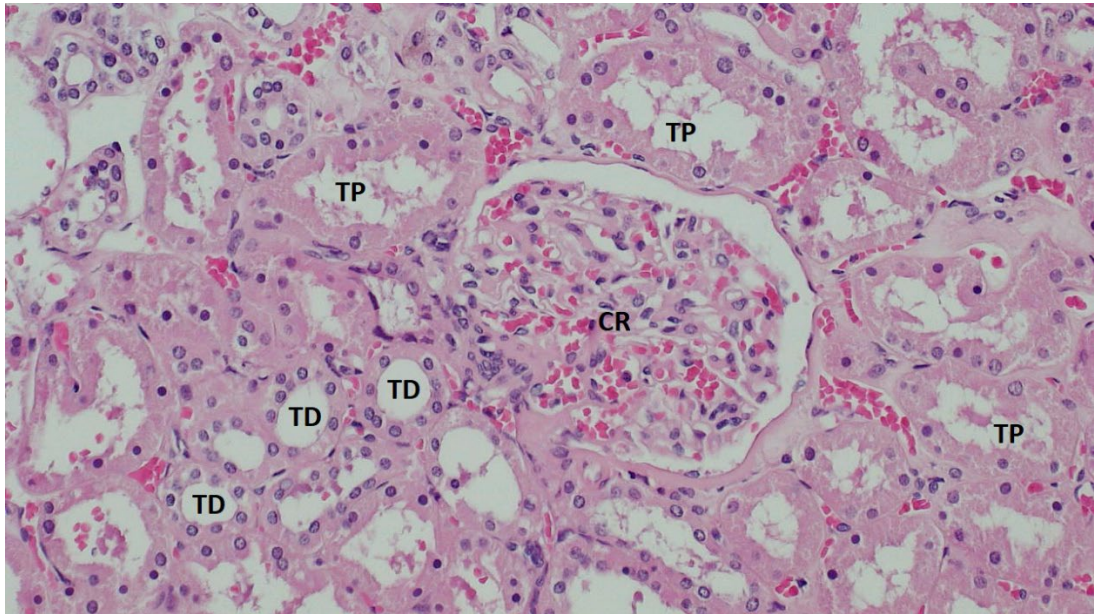
Zde na snímku 14 vidíme obdobnou ledvinu na řezu se světlobuněčným renálním karcinomem. Rozhraní mezi nádorem (1) a nezasaženou ledvinou (2) je ostře ohraničené. Tumorózní masa je téměř celá uložena v ledvině (netypické pro ccRCC) a jen část prominuje z horního pólu za hranice ledviny. Na řezu je ložisko žlutobělavé barvy, místy s hemoragiemi a nekrotizacemi.



Obrázek 14 – Fixovaná ledvina na řezu s nádorovým útvarům (foto autora)

## 5.2 Mikroskopie zdravé ledviny

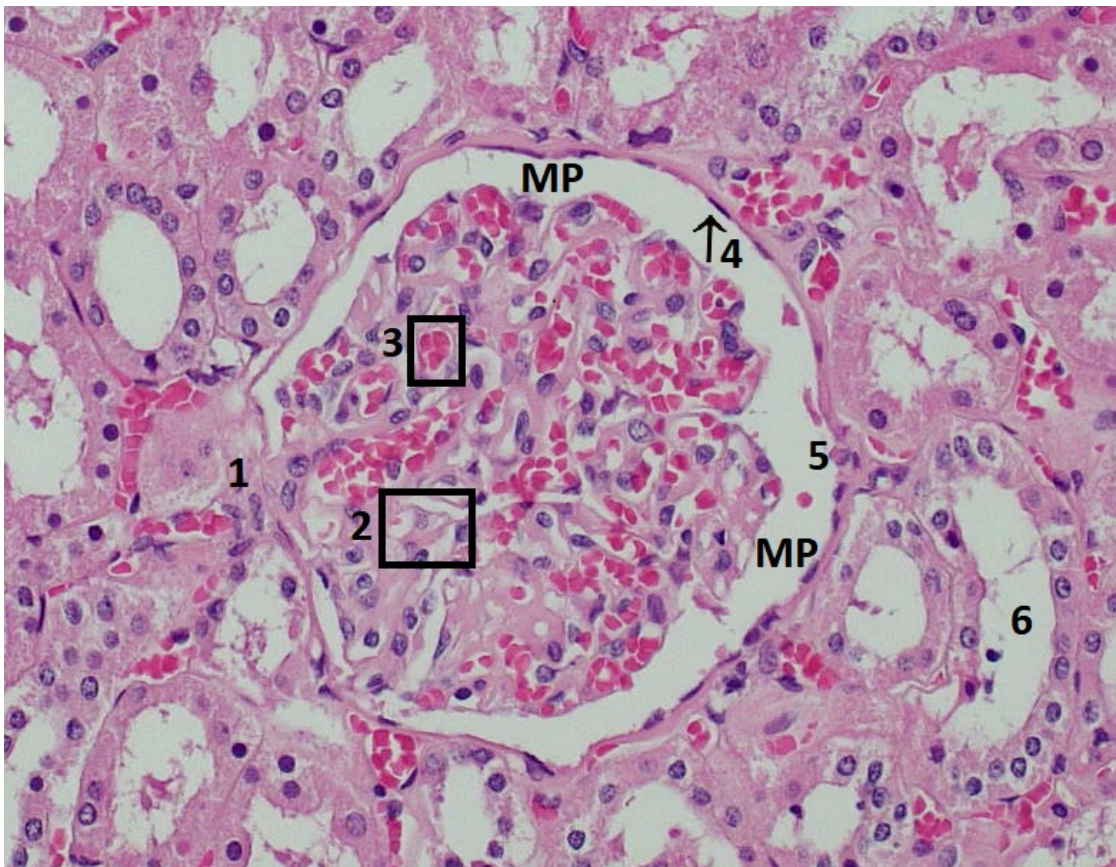
Na řezu renální kůrou je na obrázku 15 zachyceno jedno ledvinné tělísko (corpusculum renis, CR), několik proximálních tubulů (tubulus proximalis, TP) vystlaných jednovrstevným kubickým epitelem a vyplněným průsvitem. Četné distální tubuly (tubulus distalis, TD) též s kubickým epitelem, ale prázdným průsvitem.



Obrázek 15 – Zdravá renální kůra, barveno metodou HE, zvětšeno 200x (foto autora)

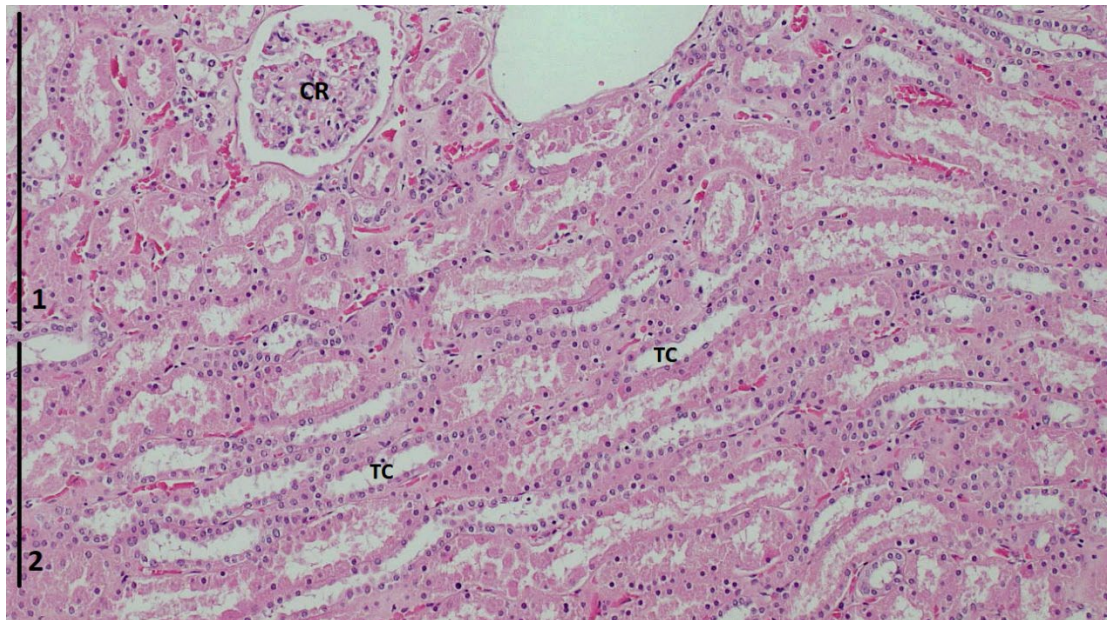


Detailní záběr histologické struktury ledvinného tělíska vidíme na obrázku 16. Ledvinné tělísko je tvořeno viscerálním listem Bowmanova poudra sestaveným z podocytů (2), které jsou vzájemně spojeny a pokrývají kapiláry glomerulu. A parietálním listem, vystlaným jednou vrstvou plochých epitelových buněk (4). V glomerulu jsou také patrné erytrocyty (3). Mezi listy je močový prostor (MP), který pokračuje do lumina stočeného proximálního kanálku (6) skrz močový pól (5). Krev do ledvinného tělíska vstupuje vaskulárním pólem (1).



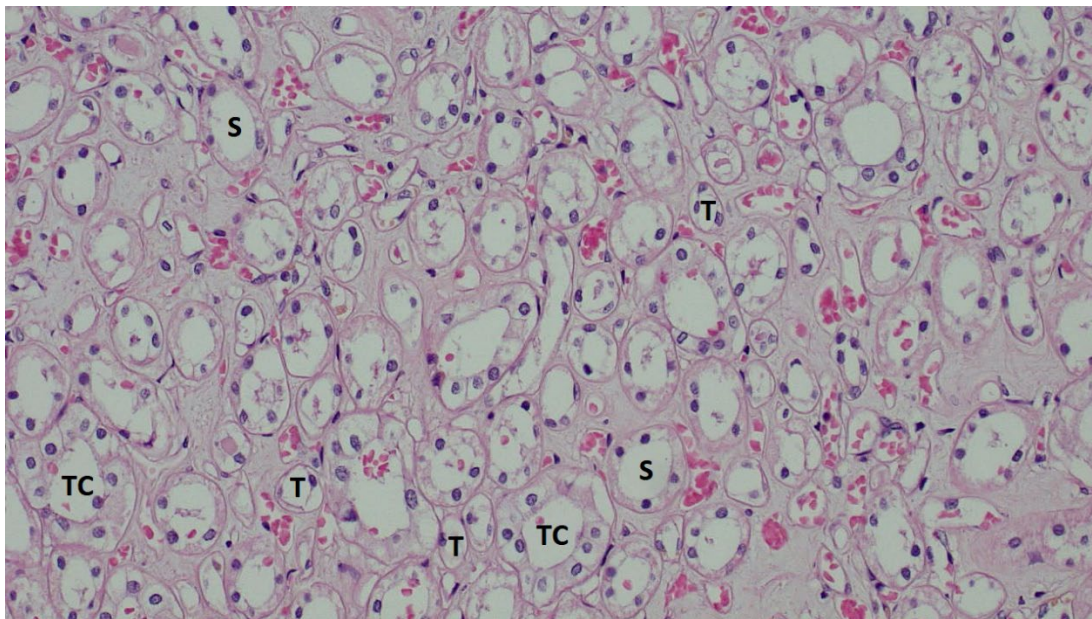
Obrázek 16 – Detailní záběr ledvinného tělíska, barveno metodou HE, zvětšeno 200x (foto autora)

Na sedmnáctém snímku si můžeme všimnout jak ledvinné kůry (1), tak dřene (2). V kůře je přítomno jedno ledvinné tělísko (CR) obklopené proximálními a distálními tubuly. Dřeň (2) je zde tvořena četnými a paralelně uspořádanými sběracími kanálky (tubuli colligentes, TC) bez ledvinných tělísek.



Obrázek 17 – Přejít mezi zdravou kůrou a dřeni, barveno metodou HE, zvětšeno 100x (foto autora)

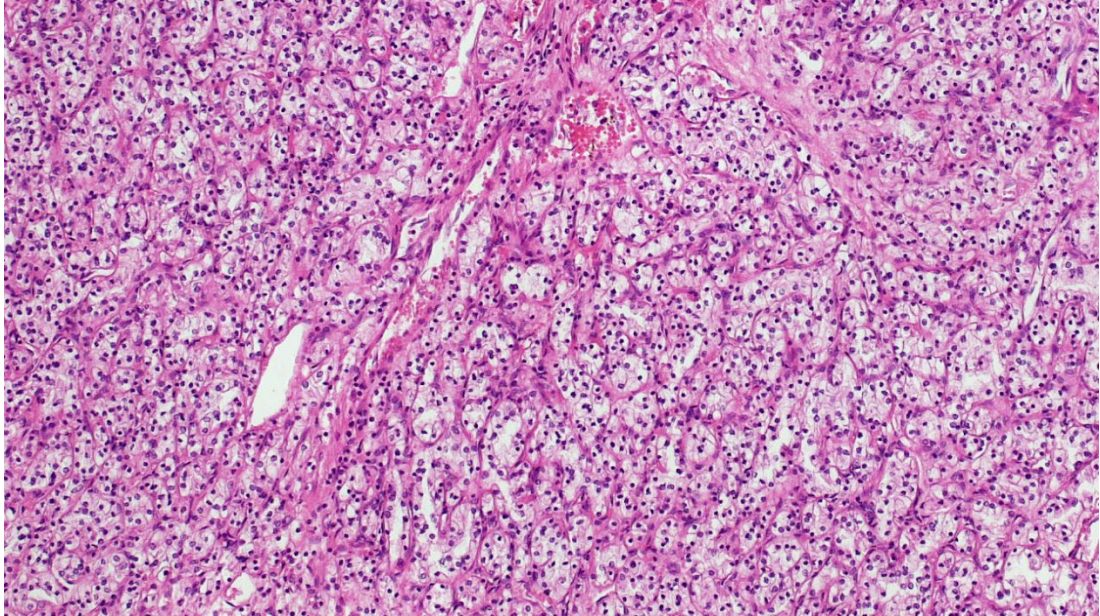
Na obrázku 18 je ukázka příčného řezu ledvinnou dření s tenkými segmenty (T) Henleovy kličky, jež jsou vystlané jednovrstvným plochým epitelem. Tyto segmenty nalezneme ve vzestupných i sestupných raménkách Henleovy kličky. Stejně jako silné segmenty (S) vzestupných ramének s jednovrstvným kubickým epitelem a sběrací kanálky (TC) s jednovrstvným cylindrickým epitelem.



Obrázek 18 – Příčný řez dření ledviny, barveno metodou HE, zvětšeno 200x (foto autora)

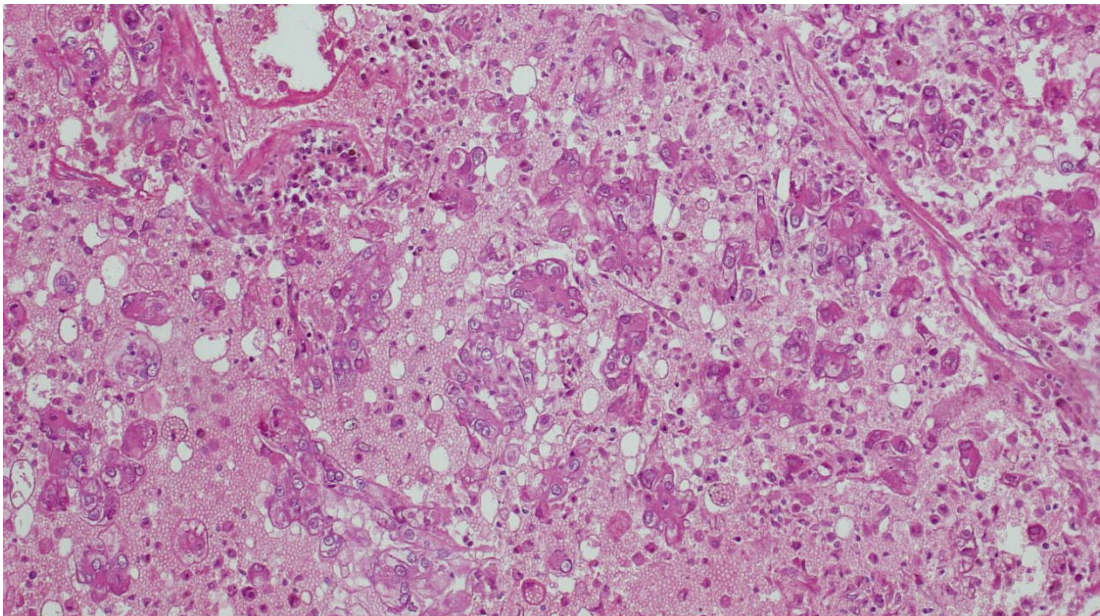
### 5.3 Běžný ccRCC

Tento obrázek 19 vystihuje běžný světlobuněčný renální karcinom v I. stupni vyzrávání dle Fuhrmanové – tumor vykazuje nízkou malignitu.



Obrázek 19 – Nukleární grading dle Fuhrmanové I, barveno metodou HE, zvětšeno 100x (foto autora)

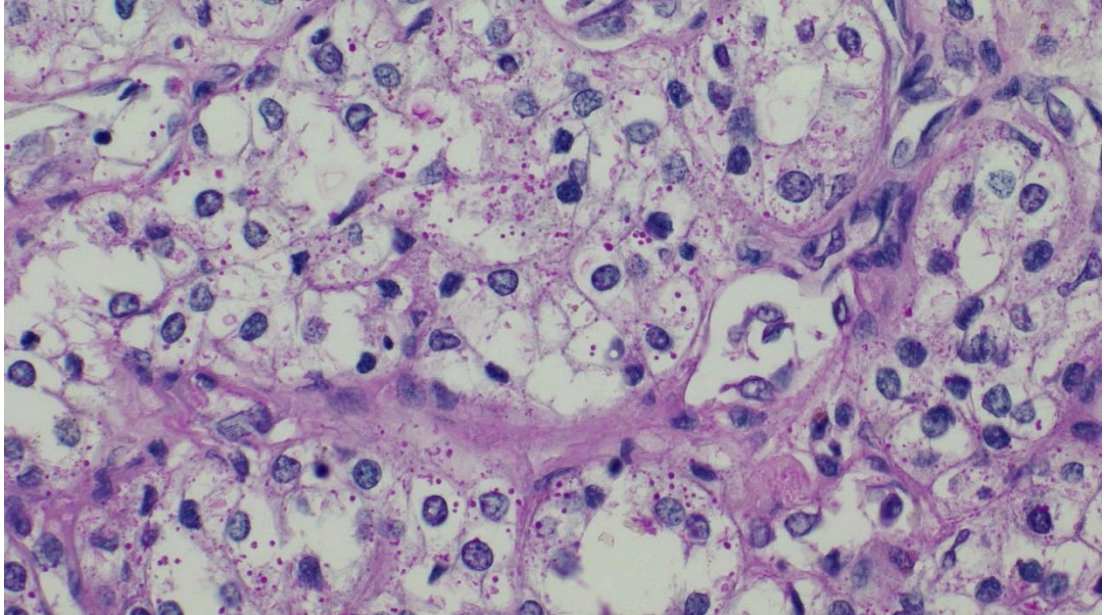
Na obrázku 20 vidíme též běžný světlobuněčný renální karcinom, tentokrát ve III. stupni vyzrávání dle Fuhrmanové – tumor představuje vysokou úroveň malignity.



Obrázek 20 – Nukleární grading dle Fuhrmanové III, barveno metodou HE, zvětšeno 100x (foto autora)

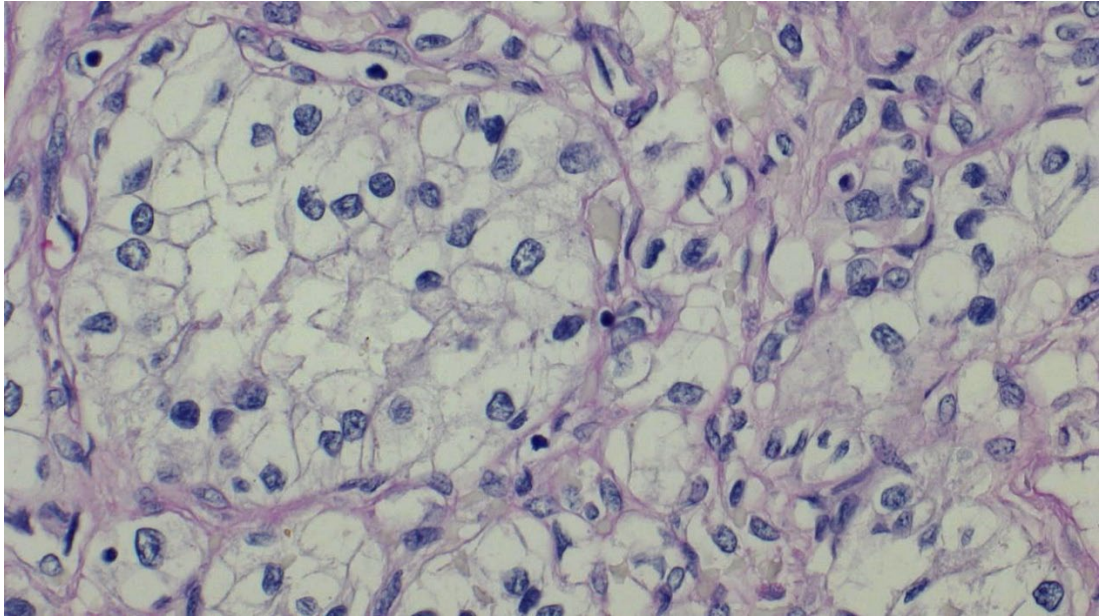
### 5.3.1 Průkaz glykogenu

Obrázek 21 znázorňuje glykogen – červenofialové makromolekuly v cytoplazmě buněk světlobuněčného karcinomu. Pro průkaz cytoplazmatického glykogenu byla využita speciální metoda barvení PAS (viz tabulka 8).



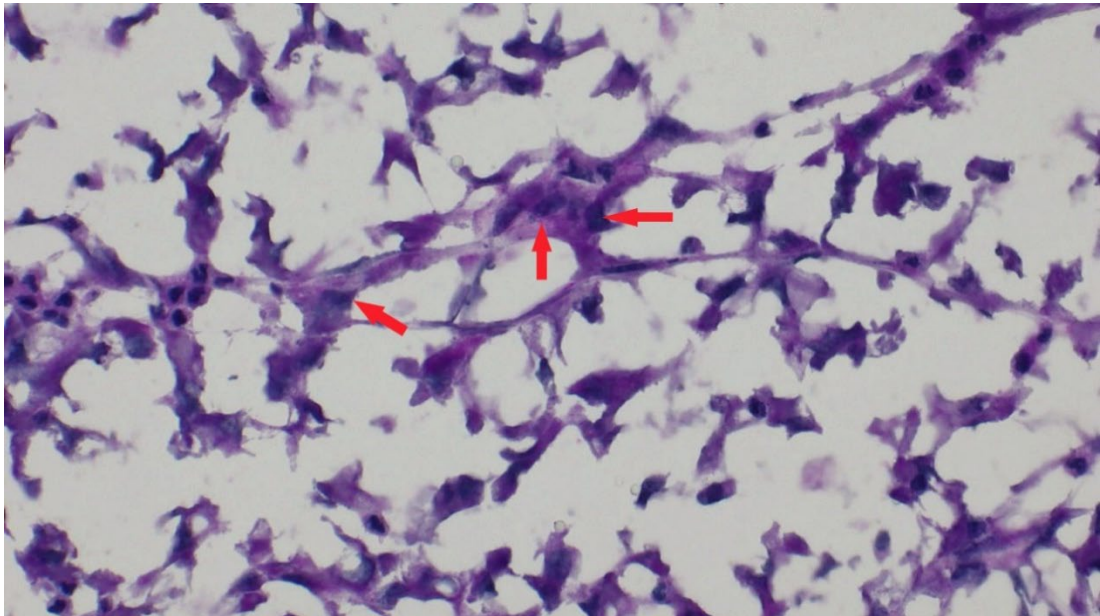
*Obrázek 21 – Průkaz glykogenu v parafinovém bloku, barveno PAS reakcí, zvětšeno 400x (foto autora)*

Preparát na obrázku 22 byl barven metodou A-PAS, tedy s přidavkem  $\alpha$ -amylázy, která svým působením glykogen rozpustila, a proto cytoplazma světlobuněčných buněk působí prázdným dojmem.



*Obrázek 22 – Kontrola průkazu glykogenu v cytoplazmě buněk ccRCC, barveno metodou A-PAS, zvětšeno 400x (foto autora)*

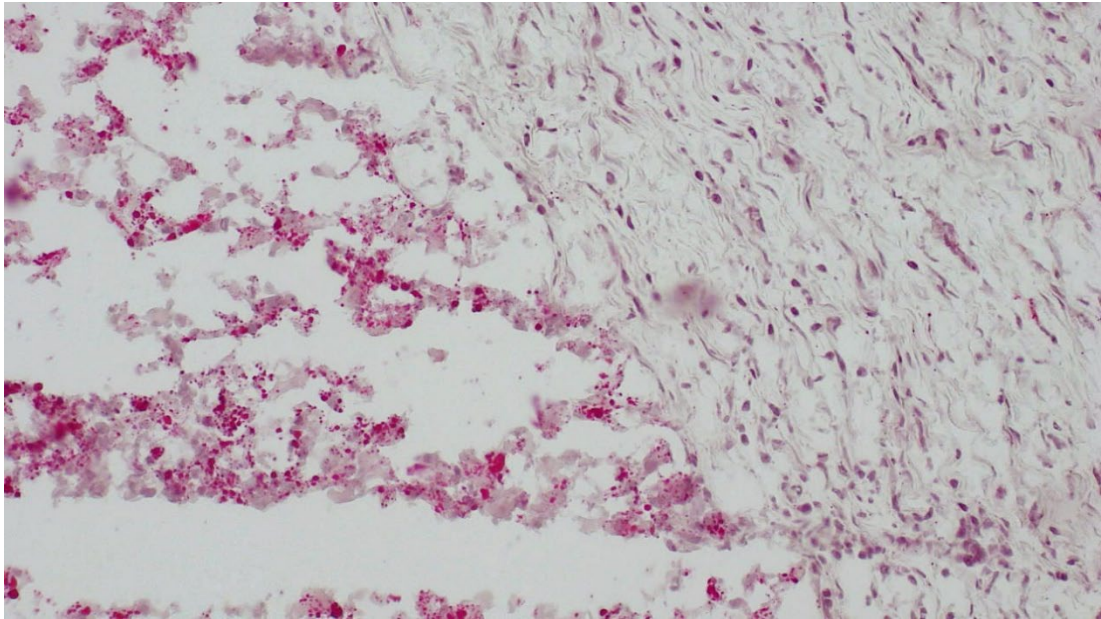
Výsledný preparát na snímku 23 je získaný zpracováním nativní ledviny se světlobuněčným karcinomem zmrazovací technikou a obarvený PAS reakcí. Tmavě fialové skvrny (šipky) znázorňují glykogen v cytoplazmě nádorových buněk, která je obarvena nepatrně světleji než glykogen.



*Obrázek 23 – Nativní tkáň s ccRCC zpracována v kryostatu a barvena PAS reakcí, zvětšeno 400x (foto autora)*

### 5.3.2 Průkaz lipidů

Snímek ledvinné kůry spolu s vazivovým pouzdem na obrázku 24 je barvený olejovou červení O (viz tabulka 10) pro znázornění lipidů a zpracovaný zmrazovací technikou. Jsou viditelné četné červeně obarvené tukové inkluze v buňkách světlobuněčného karcinomu.

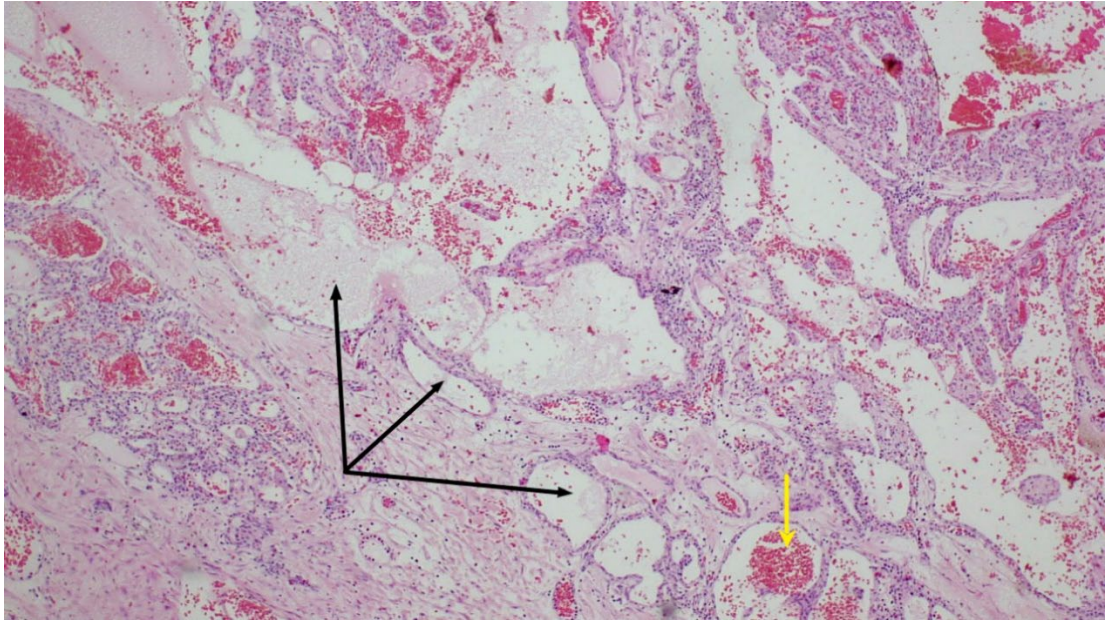


Obrázek 24 – Znázornění lipidů ve světlobuněčném karcinomu, barveno olejovou červení O, zvětšeno 200x (foto autora)



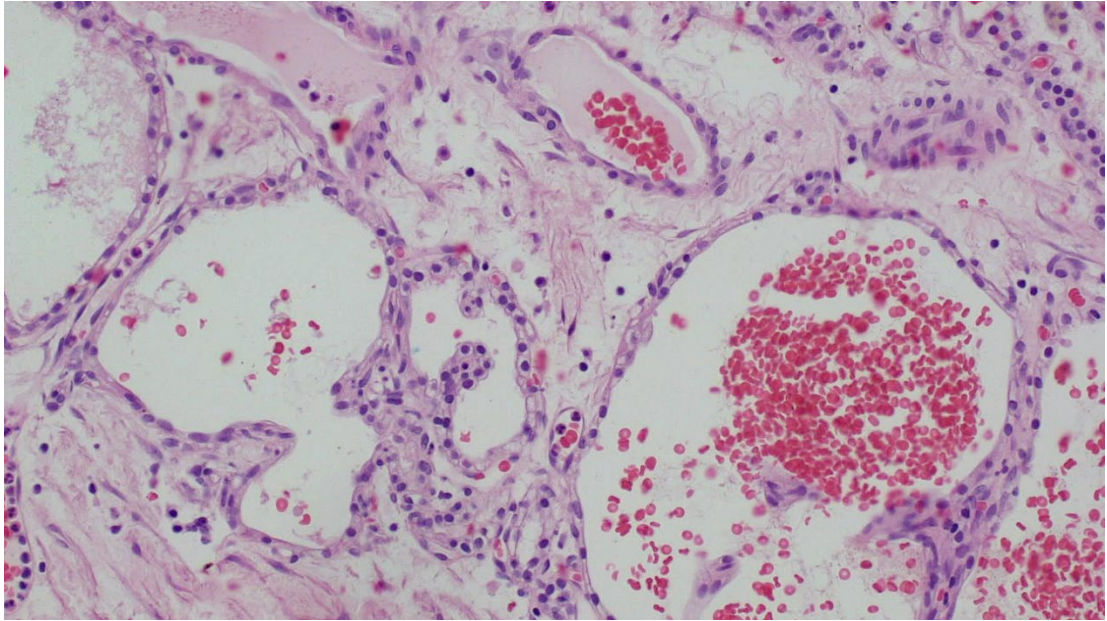
## 5.4 Multicystický ccRCC

Snímek 25 pochází z oblasti renální kůry a prokazuje multicystický světlobuněčný karcinom v několika zorných polích s četnými cystami různé velikosti (černé šipky) a hemoragiemi (žlutá šipka).



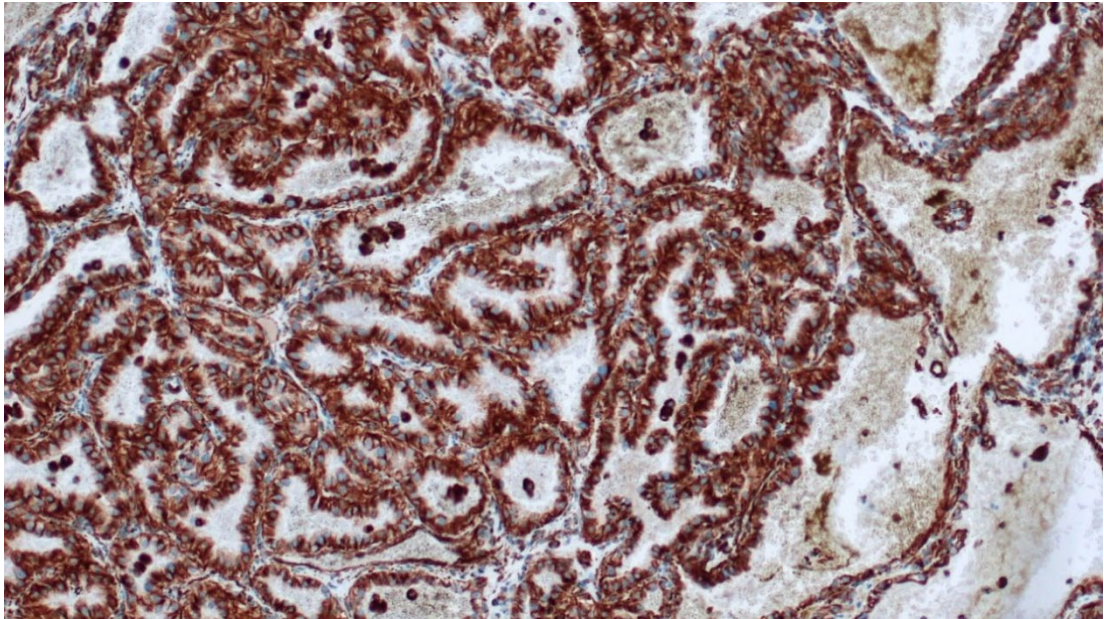
Obrázek 25 – Multicystický ccRCC, barveno metodou HE, zvětšeno 50x (foto autora)

Obrázek 26 nám přibližuje mikroskopický vzhled vybraných nádorových cyst z obrázku 25. Cysty u multicystického ccRCC jsou vystlané jednou vrstvou světlobuněčného epitelu. Uvnitř cyst se nacházejí erythrocyty.



*Obrázek 26 – Přiblížené cysty multicystického ccRCC, barveno metodou HE, zvětšeno 200x (foto autora)*

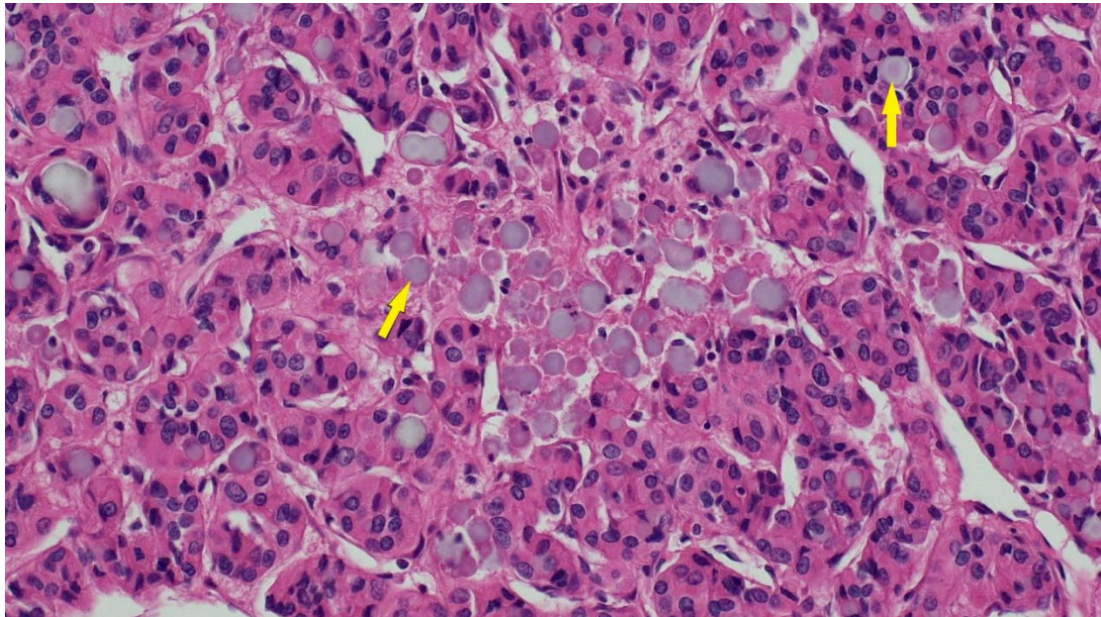
Hnědě obarvená cytoplazma epiteliálních tumorózních buněk na obrázku 27 prokazuje pozitivní imunoexpresi proteinu vimentinu. Nádorové buňky světlobuněčného epitelu jsou výrazně pozitivní na vimentin. Čím zhoubnější tumor je, tím se cytoskeletální protein vimentin barví intenzivněji. Zde se jedná o multicystickou variantu ccRCC v I. stupni diferenciaci dle Fuhrmanové (nízký maligní potenciál).



*Obrázek 27 – Pozitivní imunohistochemické barvení protilátkou proti vimentinu, zvětšeno 100x (foto autora)*

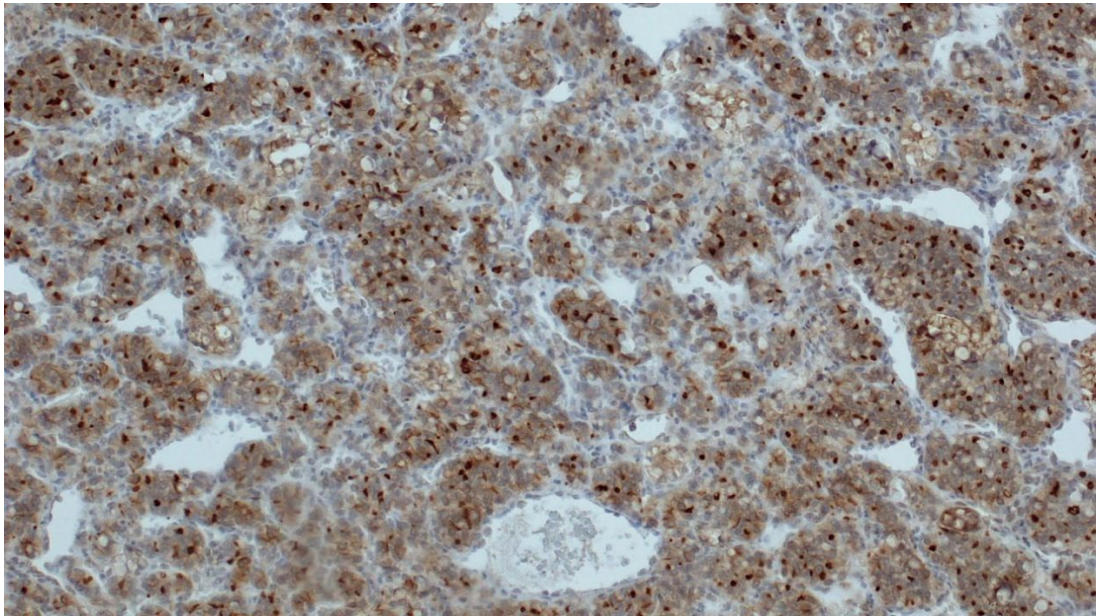
## 5.5 Granulární ccRCC

Obrázek 28 znázorňuje granulární variantu světlobuněčného renálního karcinomu s intracelulárně i extracelulárně uloženými hyalinními globulemi sklovitého vzhledu (šipky). Neoplastické buňky mají hojnou eozinofilní cytoplazmu s jemnou granulární zrnitostí.



Obrázek 28 – Granulární ccRCC s nálezem sklovitých hyalinních globulí, barveno metodou HE, zvětšeno 200x  
(foto autora)

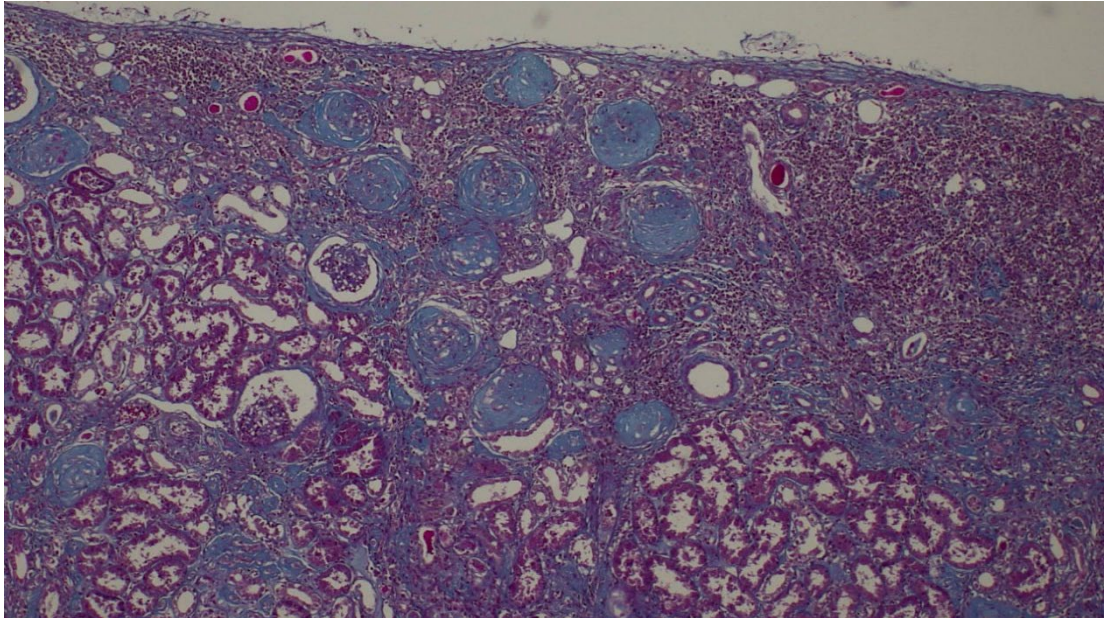
Obrázek 29 vykazuje pozitivní imunohistochemické barvení protilátkou CD10 (povrchová peptidáza), která hnědě obarvila kartáčový lem nádorově transformovaných proximálních tubulů. Uvnitř některých tubulů se objevují neobarvené hyalinní sklovité globule.



*Obrázek 29 – Pozitivní reakce s protilátkou CD10, IHC, zvětšeno 100x (foto autora)*

## 5.6 Dediferenciace ccRCC

Barvení modrým Masonovým trichromem (viz tabulka 9) na obrázku 30 nám prokázalo reaktivní změny stromatu (obarveno modře) s rozsáhlou fibrotizací a hyalinizací světlobuněčného nádoru.



*Obrázek 30 – Fibrotická dediferenciace ccRCC, barveno modrým Massonovým trichromem, zvětšeno 50x (foto autora)*

## 6 DISKUZE

Získané výsledky jsme porovnali s odbornými publikacemi týkající se renálních karcinomů a konkrétně pak světlobuněčného renálního karcinomu a jeho subtypů. PAO ONK nám umožnilo nahlédnout do zdravotnické dokumentace a tím poskytlo podrobné a kompletní informace k řešené problematice.

Za rok 2022 bylo histologickou analýzou na PAO ONK diagnostikováno celkem 68 nejčastěji se vyskytujících karcinomů ledvin. Z tohoto celkového počtu biopsií ledvin se prokázalo 61 světlobuněčných renálních karcinomů, šest papilárních a jeden chromofobní renální karcinom. Četnost záchytu těchto tří podtypů renálních karcinomů koreluje s publikacemi. Výskyt světlobuněčného renálního karcinomu bezpochyby převažuje nad výskytem papilárního a chromofobního karcinomu ledvin [52].

Zaměřili jsme se také na pohlaví a věkovou skupinu pacientů, kterým byl histologickou technikou diagnostikován světlobuněčný renální karcinom. Průměrný věk všech 61 jedinců s potvrzeným ccRCC byl 69 let. Pro porovnání věkové hranice jsme zvolili jednu z hlavních publikací této bakalářské práce, která uvádí nejběžnější záchyt ccRCC v 6. a 7. decenniu věku a dále pak knižní vydání WHO klasifikace pro nádory ledvin z roku 2022, jež konstatuje průměrný věk 62 let. Námi zjištěný průměrný věk jedinců se přiklání k 7. dekádě života a je tak v souladu s uvedenými publikacemi. 61 světlobuněčných renálních karcinomů se týkalo 44 mužů a 17 žen. Tyto výsledky též korelují s uveřejněnými údaji. Muži jsou renálními karcinomy postihnuti dvakrát častěji než ženy [50; 57].

Dále jsme věnovali pozornost prognosticky významnému určení histologického stupně diference tohoto typu nádoru (nukleární grading dle Fuhrmanové, viz tabulka 3). Potvrdila se nám tím teorie o heterogenním vzhledu buněk ccRCC v různém stupni vyzrání. Aby byl rozdíl v morfologii nádorových buněk očividný (v jejich tvaru, velikosti a obsahu jader), začlenili jsme do výsledků snímky preparátů s ccRCC v I. a III. stupni diference. Světlobuněčný renální karcinom v I. stupni vyzrání nalezneme na obrázku 19. V první řadě lze vyzorovat, jak karcinom tvoří tubulární struktury a napodobuje tak stavbu proximálních tubulů. Tento způsob růstu je pro něj typický, jelikož z proximálních kanálků vychází. Jádra nádorových buněk mají

pravidelnou strukturu a v průměru měří cca 10  $\mu\text{m}$ . Karcinom v I. stupni vyžrávání má nižší malignitu, nádorové buňky sdílejí rysy se zdravými buňkami a léčba bývá úspěšná. Obrázek 20 se pojí s agresivní formou a solidním růstem běžného ccRCC nádoru. Tento druh ccRCC ve III. stupni vyžrávání nemá podobnost s fyziologickou tkání ledviny a tím pádem o něm tvrdíme, že je méně diferencovaný. Jádra nepravidelného tvaru jsou větší než u grade I (cca 20 $\mu\text{m}$ ), na jádérka narazíme již při 100 násobném zvětšení. Karcinom, jehož maligní potenciál je vysoký, spadá do III. stupně vyžrávání a má tendenci metastazovat. Nukleární grading dle Fuhrmanové u 61 ccRCC na PAO ONK vypadal následovně: 27 ccRCC bylo zařazeno do I. stupně diferenciace, 22 ccRCC do II. stupně, 7 ccRCC do přechodného II-III stupně, 4 ccRCC do III. stupně a jeden ccRCC vykazoval nejasné výsledky (byl odeslán na konzultaci k jinému patologovi). Za rok 2022 na PAO ONK byla většina ccRCC zachycena v prvním stupni vyžrávání (příznivá prognóza pro pacienta) a žádný světlobuněčný renální karcinom nebyl diagnostikován ve IV. stupni diferenciace. Histopatologický grading byl vyhodnocen podle zásad v nejmalignějším místě při stejném zvětšení: 100x [29].

Na PAO ONK se doručují ledviny pouze patologicky změněné, proto je nutné dodat, že zdravá ledvina na obrázku 12 byla získána z nekropsie (pitvy). Jednotlivé části nefixované nekrotické ledviny (renální kůra, dřev, pyramidy, pánvička) jsou od sebe obtížněji rozlišitelné než například u fixované ledviny na obrázku 14, kde u patologicky nezměněné části ledviny spatříme alespoň ostře ohraničený přechod mezi hnědě zbarvenou kůrou a červeně zbarvenou dřeví. Výhody využívání fixačních tekutin tedy spočívají i ve zvýraznění struktury a usnadnění makroskopického popisu přikrajovaného orgánu.

Obrázek 14 nám dokazuje, že makroskopický vzhled světlobuněčného renálního karcinomu je skutečně značně polymorfní. Solidní a zlatavě žlutý novotvar s hrbolatým povrchem, místy s lehkými hemoragiemi a nekrotizacemi. Velikost tumoru na obrázku 14 je cca 4,5 cm, přičemž studie WHO uvádí průměrnou velikost nádoru 6,3 cm. Podle všeho je to z důvodu častějšího využívání zobrazovacích technik, které zvýšilo četnost detekce malých nádorů. Charakteristický vzhled měl i ccRCC na obrázku 13, ale na řezu nádorového ložiska byly patrné i četné cystické útvary vyplněné tekutinou a o různém průměru. Mikroskopická analýza posléze prokázala multicystickou variantu světlobuněčného renálního karcinomu s nukleárním gradingem dle Fuhrmanové I.



Nesmí chybět průkaz glykogenu v cytoplazmatickém prostoru světlých nádorových buněk, který by měl být nepochybně zachycen v nativní nádorové tkáni, na rozdíl od nádoru fixovaného, kde by mělo dojít ke snížení obsahu glykogenu v buňkách nebo k úplnému vymizení (rozpuští se působením formolu). Učinili jsme proto experiment a PAS reakcí (viz tabulka 8) obarvili parafinový (viz obrázek 21) i zmrazený řez tkáně (viz obrázek 23). Experiment předčil naše očekávání, neboť glykogen v parafinovém řezu nebyl rozpuštěn ani po 48 hodinové fixaci nádorové ledviny s odejmutým tukovým pouzdem. Domníváme se, že cytoplazma byla na glykogen dost bohatá a jeho rozpouštění tak trvá déle než 48 hodin. Totiž skutečnost, že fixační tekutina během 48 hodin nepronikne do tkáně, je velmi nepravděpodobná. A pokud vezmeme v úvahu i nejčastější lokalizaci nádoru v ledvině (renální kůra), uvědomíme si, že tato oblast přichází do kontaktu s fixační tekutinou jako první. Námi získaný poznatek je ve shodě s dostupnými publikacemi. Průkaz glykogenu závisí na době fixace tkáně a jeho celkovém množství v buňce. S jistotou můžeme tvrdit, že cytoplazma nádorových buněk neobsahuje jiné PAS pozitivní substance, ale glykogen (ověřeno A-PAS reakcí, viz obrázek 22). [49]

V rámci tohoto stanovení můžeme také porovnat kvalitu výsledných preparátů zachycených na snímcích 21 a 23. Lze ho považovat za důvod, proč se zmrazovací technika v histologické laboratoři na PAO ONK rutinně neprovádí a využívá se jen v případě peroperační biopsie. Mikroskopická stavba ledvinné tkáně, která byla zpracována metodou parafinového bločku, je mnohem více přehledná, naopak preparáty zhotovené zmrazovací technikou bývají zpravidla obtížněji diagnostikovatelné. Dospěli jsme k závěru, že proces přípravy tkáně pro zmrazovací techniku včetně barvení preparátu je rychlejší, ale to samé nemůžeme tvrdit o krájení zmražené tkáně v kryostatu, které je náročnější a nepochybně se liší od klasického krájení parafinových bloků.

Histologickou analýzou a speciálním barvením olejovou červení O byly znázorněny lipidové makromolekuly v cytoplazmě světlých buněk (viz obrázek 24). Na obrázku 24 si rovněž můžeme všimnout vazivového pouzdra ledviny, které plynule přechází v nádorově změněnou renální kůru. U zdravé tkáně nebývá vazivo v této oblasti ztlustělé. Pravděpodobnou příčinou je fibrotická dediferenciace.

Světlobuněčný renální karcinom na snímku 25 (a 26) byl makroskopicky převážně hemoragického vzhledu o velikosti 1,9 x 1,2 x 1,4 cm. Mikroskopická analýza posléze prokázala multicystickou variantu světlobuněčného renálního karcinomu s četnými sekundárními hemoragiemi s nukleárním gradingem dle Fuhrmanové I. Z hlediska TMN klasifikace (viz tabulka 2) spadá pod subklasifikaci T1a (nádor o průměru  $\leq 4$  cm) a řadí se do I. stádia (viz tabulka 4). Pětileté přežívání s ccRCC zachyceným v I. stádiu činí 91 %. Výše uvedený makroskopický a mikroskopický popis nádoru společně se studii o přežívání nasvědčuje tomu, že multicystická varianta představuje dobrou prognózu. Multicystická varianta byla barvena základní metodou HE a dále IHIC metodou. Pozitivní cytoplazmatické barvení protilátkou proti vimentinu spatříme na obrázku 27. Vimentin pozitivní nález pomohl odlišit multicystickou variantu ccRCC od chromofobního renálního karcinomu, jež ccRCC svým mikroskopickým vzhledem leckdy napodobuje. Multicystická varianta ccRCC vykazovala i nukleární expresi PAX 8, ale jelikož protilátka proti PAX8 poskytuje pozitivní reakci i s jinými karcinomy (např. s karcinomy štítné žlázy nebo s karcinomy gynekologického původu), není jeho stanovení považováno za specifické k průkazu ccRCC a z tohoto důvodu nebyl do výsledků zařazen. Negativní výsledek jsme zaznamenali u reakce s protilátkou proti CD177 [50; 52; 53].

Konečně chování a vzhled vzácné granulární varianty ccRCC s nukleárním gradingem dle Fuhrmanové II. vyznačujeme na obrázku 28. Tento subtyp ccRCC je čistě granulárního charakteru a postihuje celý tumor. Na první pohled je znát rozdíl v barvitelnosti buněk mezi běžným ccRCC (obrázek 19) a granulárním ccRCC (obrázek 28), jež byly oba barvené metodou HE. Tumorózní buňky granulární varianty ccRCC obsahují velké množství eozinofilních granul a objemné hyalinní globule sklovitého vzhledu, které se u granulárního subtypu ccRCC vyskytují běžně. Imunohistochemickou technikou jsme detekovali pozitivní barvení CD10 (obrázek 29). Sklovité hyalinní globule se imunohistochemicky nebarví [50].

Doplňujícím cílem bylo detekovat fibrotickou dediferenciaci ccRCC (viz obrázek 30). Tato remodelace epitelové tkáně bývá obtížněji diagnostikovatelná, kolagen se základní metodou HE barví eozinofilně jako normální tkáň (nepatrně sytěji). Proto jsme pro ověření využili speciální barvicí metodu na zvýraznění kolagenu (modrý Massonův trichrom, viz tabulka 9). Nádor je tak reaktivní, že postupně nahrazuje epitelovou tkáň

a vznikají jizvy. V několika zorných polích světlobuněčného renálního karcinomu jsme našli modře obarvená jizevnatá ložiska, která se za normálních okolností u zdravé tkáně nevyskytují a rovněž je nelze považovat za běžný nález u ccRCC [49].

## 7 ZÁVĚR

Světlobuněčný renální karcinom, vyskytující se s převahou u mužského pohlaví, je nejčastější histologickou variantou nádorů ledvin (až 75 % všech nádorů). Hlavním cílem bakalářské práce bylo prokázat multicystickou a granulární variantu světlobuněčného renálního karcinomu a porovnat je s fyziologickou stavbou ledviny.

Klíčovou roli v diagnostikování renálních karcinomů hraje histologický rozbor tkáně. Jejím kvalitním zpracováním jsme získali obarvené histologické preparáty, jež byly pozorovány a vyhodnoceny ve světelném mikroskopu. Obě varianty byly prokázány základní metodou barvení Hematoxylin-eozin a porovnány s histologickou stavbou zdravé renální kůry. Vodojasné buňky světlobuněčného karcinomu obsahují variabilní množství glykogenu, který jsme zvýraznili reakcí Periodic acid Schiff ve zmrazených i parafinových řezech. Nádorové buňky jsou též bohaté na lipidy, které byly potvrzeny ve zmrazených řezech po obarvení preparátu olejovou červení O. Fibrotické a hyalinní transformace světlobuněčného renálního karcinomu byly identifikovány speciální barvicí metodou – modrý Massonův trichrom. Imunohistochemická analýza prokázala, že nádorově transformované buňky pocházejí z proximálních tubulů (CD10 pozitivní) a pomohla odlišit světlobuněčný renální karcinom od chromofobního renálního karcinomu (světlobuněčný renální karcinom je vimentin pozitivní a CD117 negativní).

Multicystický a granulární světlobuněčný renální karcinom se řadí mezi epiteliální nádory ledvin, postihují libovolnou část ledvinné kůry a vycházejí z proximálních tubulů ledvin. Multicystický subtyp má výrazně lepší prognózu než granulární subtyp světlobuněčného renálního karcinomu, jehož maligní potenciál je vysoký.

Na základě výsledků získaných při vypracování této bakalářské práce lze shrnout, že jsme dosáhli všech vytyčených cílů.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAF	Alkohol-Kyselina octová-Formol
ACE	Enzym konvertující angiotensin
AMACR	Alfa-methylacyl koenzym a racemáza
BHD	Birt-Hogg-Dubé syndrom
ccRCC	Světlobuněčný renální karcinom
CT	Výpočetní tomografie
DNA	Deoxy-ribonukleová kyselina
HE	Hemotoxin-eozin
HU	Hounsfieldové jednotky
IHC	Imunohistochemie
MRI	Magnetická rezonance
PAO ONK	Patologicko-anatomické oddělení Oblastní nemocnice Kladno
PAS	Periodic Acid-Schiff
PT	Parciální nefrektomie
RAAS	Renin-angiotensin-aldosteron systém
RCC	Renal cell carcinoma
RFA	Radiofrekvenční ablace

RN	Radikální nefrektomie
RNA	Ribonukleová kyselina
TNM	Tumor-Node-Metastasis klasifikace
TSC	Tuberózní skleróza
US	Ultrasonografie
VHL	Von Hippel-Lindauova nemoc
WHO	World Health Organization

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LUŇÁČEK, Libor. Močopohlavní ústrojí: ledviny. In: *Fotografický interaktivní atlas člověka* [online]. Olomouc: Luňáček, 2009 [cit. 2022-11-03]. Dostupné z: <http://www.atlasloveka.upol.cz/cs/cs02/cs0206/cs020601.html>
- [2] DYLEVSKÝ, Ivan. Močový systém. In: *Funkční anatomie: ledviny* [online]. 1. Praha: Grada, 2009, s. 356 [cit. 2022-11-03]. ISBN 978-80-247-3240-4. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/kniha/funkcni-anatomie-1888/>
- [3] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. Močový systém. In: *Memorix histologie: Úvod*. 2. vydání. Praha: Triton, 2017, s. 336-337. ISBN 978-80-7553-249-7.
- [4] L. MESCHER, Antony. Močový systém. In: *Junqueirovy základy histologie: ledviny*. 1. Praha: Galén, 2018, s. 398-401. ISBN 978-80-7492-324-1.
- [5] L. MESCHER, Anthony. Močový systém. In: *Junqueirovy základy histologie*. 1. Praha: Galén, 2018, s. 402-412. ISBN 978-80-7492-324-1.
- [6] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. Močový systém. In: *Memorix histologie: ledvina*. 2. vydání. Praha: Triton, 2017, s. 339-345. ISBN 978-80-7553-249-7.
- [7] DYLEVSKÝ, Ivan. In: *Funkční anatomie* [online]. 2009. Praha: Grada, 2009, s. 359 [cit. 2022-12-11]. ISBN 978-80-247-3240-4. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/kniha/funkcni-anatomie-1888/>
- [8] POVÝŠIL, Ctibor a Ivo ŠTEINER. *Speciální patologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-494-2.

- [9] RACEK, Jaroslav. Klinická biochemie. In: *Inovace VOV\_zdravotnická oblast: otevřené digitální zdroje: sada pro zdravotnickou sekci DZL* [online]. Ostrava: SZŠ a VOŠ zdravotnická, 2019 [cit. 2022-12-11]. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/zdrav/>
- [10] KOEPPEN, Bruce a Bruce STANTON. *Renal Physiology: glomerular filtration and renal blood flow*. 6th edition. United States: Elsevier, 2018. ISBN 9780323595681.
- [11] FEHER, Joseph. *Quantitative Human Physiology: An Introduction: mechanism of concentration and dilution of urine*. 2nd edition. United States: Elsevier, 2017. ISBN 9780128008836.
- [12] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. Močový systém. In: *Memorix histologie: obecná část. 2. vydání*. Praha: Triton, 2017, s. 338. ISBN 978-80-7553-249-7.
- [13] FOUNTAIN, John a Sarah LAPPIN. Physiology, Renin Angiotensin System. In: *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. United States: StatPearls, 2022 [cit. 2022-12-11]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470410/>
- [14] KAPOUNKOVÁ, Kateřina a Zdeněk POSPÍŠIL. Obecná patofyziologie: nádorová bujení. In: *RVS* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2013 [cit. 2023-01-12]. Dostupné z: [https://www.fsps.muni.cz/inovace-RVS/kurzy/patofyziologie/bunka\\_nador.html](https://www.fsps.muni.cz/inovace-RVS/kurzy/patofyziologie/bunka_nador.html)
- [15] Kidney cancer. In: *EAU Patient information* [online]. 2021 [cit. 2023-01-12]. Dostupné z: <https://patients.uroweb.org/cancers/kidney-cancer/>



- [16] Karcinom ledviny z pohledu urologa. *Onkologie* [online]. Praha: Urologická klinika 3. LF UK a FN Královské Vinohrady, 2014, **8**(5), 201-207 [cit. 2023-01-12]. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2014/05/04.pdf>
- [17] Cancer Today: Estimated number of new cases in 2020, World, females, all ages. In: *International Agency for Research on Cancer: WHO* [online]. 2020 [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <https://gco.iarc.fr>
- [18] DUŠEK, Ladislav, Jan MUŽÍK, Miroslav KUBÁSEK, Jana KOPTÍKOVÁ, Jan ŽALOUĐÍK a Rostislav VYZULA. Epidemiologické analýzy: incidence a mortalita: C64 ZN-ledviny mimo pánvičku. In: *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. Masarykova univerzita, 2007 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <https://www.svod.cz>
- [19] Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2021, **71**(3), 209-249 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.3322/caac.21660](https://doi.org/10.3322/caac.21660)
- [20] POLÁK, Zdeněk, Pavel KOSCIELNIK, Radek SÝKORA, Mika DAVID a Jan KRHUT. Asynchronní solitární metastáza světlobuněčného renálního karcinomu 7 let po nefrektomii projevující se Hornerovým syndromem. *Czech urology* [online]. 2014, **18**(2), 151 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <https://www.czechurol.cz>
- [21] Epidemiologická studie výskytu zhoubných nádorů ledvin v závislosti na životním stylu a pracovním prostředí. *Lékař a multidisciplinární tým* [online]. 2008, **15**(018) [cit. 2023-01-12]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/>
- [22] Cancer Today. In: *International Agency for Research on Cancer: WHO*: [online]. 2020 [cit. 2023-02-16]. Dostupné z: <https://gco.iarc.fr>

- [23] MICHAL, Michal, Ondřej HES a Petr MUKENŠNABL. Klinické příznaky renálního karcinomu. In: *Nádory ledvin dospělého věku* [online]. Plzeň: Euroverlag, 2000, s. 13 [cit. 2023-01-12]. ISBN 80-7177-518-5. Dostupné z: [www.medima.cz/nadoryledvin](http://www.medima.cz/nadoryledvin)
- [24] VÍTĚZSLAV, Vít. Zhoubné nádory ledvinného parenchymu – prognostické faktory. *Lékař a multidisciplinární tým* [online]. 2014, **19**(030) [cit. 2023-01-12]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/>
- [25] POPRACH, A. Urogenitální nádory: nádory ledvin. In: *Masarykův onkologický ústav: diagnosticko-léčebné protokoly* [online]. 2022 [cit. 2023-01-13]. Dostupné z: <https://www.mou.cz/diagnosticko-lecebne-protokoly/t1462>
- [26] TNM klasifikace zhoubných novotvarů. In: *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR: registry a sběr dat: klasifikace* [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví, 2018 [cit. 2023-01-12]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz>
- [27] SOBIN, L.H, M.K GOSPODAROWICZ a Ch. WITTEKIND. *Klasifikace zhoubných novotvarů sedmé vydání 2009 česká verze 2011: nádory urologické: ledvina* [online]. 7. Český překlad: J. Novák. Wiley, 2009, 2011 [cit. 2023-01-12]. : ÚZIS ČR. ISBN 978-80-904259-6-5. Dostupné z: [www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/tnm-7.pdf](http://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/tnm-7.pdf)
- [28] MICHAL, Michal, Ondřej HES a Petr MUKENŠNABL. TNM klasifikace renálních karcinomů. In: *Nádory ledvin dospělého věku* [online]. Plzeň: Euroverlag, 2000, s. 21 [cit. 2023-01-12]. ISBN 80-7177-518-5. Dostupné z: <https://www.medima.cz/nadoryledvin/>

- [29] MICHAL, Michal, Ondřej HES a Petr MUKENŠNABL. Nukleární grading dle Fuhrmanové. In: *Nádory ledvin dospělého věku* [online]. Plzeň: Euroverlag, 2000, s. 17-18 [cit. 2023-01-12]. ISBN 80-7177-518-5. Dostupné z: <https://www.medima.cz/nadoryledvin/>
- [30] GRONKA, Leoš, Martina PORŠOVÁ, Jiří PONĚŠICKÝ, Jaroslav PORŠ, Radko KRÍŽ, Pavel BEŇO, Michal TOBĚRNÝ a Stanislav ČERNOHORSKÝ. Karcinom ledviny - současné trendy. *Onkologie* [online]. 2008, 2(2), 94-101 [cit. 2023-01-12]. Dostupné z: [www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2008/02/08.pdf](http://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2008/02/08.pdf)
- [31] LOUNOVÁ, Veronika a Vladimír ŠTUDENT. Diagnostika a staging nádorů ledvin. *Urologie pro praxi* [online]. Urologická klinika FN a LF UP Olomouc, 2021, 22(4), 177-180 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/uro/2021/04/03.pdf>
- [32] BAJČIOVÁ, Viera. Nádory ledvin. In: *ÚZIS: metodika: klasifikace* [online]. Klinika dětské onkologie, Fakultní nemocnice Brno [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://ccc-is.uzis.cz>
- [33] PAULÍK, Adam, Jiří PETERA, Milan VOŠMIK, Miloš BROŽÁK a Josef KOŠINA. Protokol pro léčbu karcinomu ledviny. In: *Komplexní onkologické centrum FN Hradec králové* [online]. [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.fnhk.cz/>
- [34] LHOTÁK, Petr. Zobrazovací metody u nádorů ledvin. In: *Lékař a multidisciplinární tým* [online]. [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz>
- [35] ČTEFÁNEK, Jiří. Ultrazvuk ledviny. In: *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK: medicína: ultrazvuk břicha* [online]. [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/ultrazvuk-ledviny>

- [36] CT (výpočetní tomografie). In: *Česká onkologická společnost ČLS J. E. Purkyně: pacient a rodina: slovníček* [online]. [cit. 2023-02-14]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/slovnicek/ct-vypocetni-tomografie/>
- [37] VLASÁK, Pavel, Jan KOSTUŇ, Denis BEREZOVSKIY, Jiří PRESL a Jiří BOUDA. Role ultrazvukem navigované biopsie v managementu pánevních tumorů. *Aktuální gynekologie a porodnictví* [online]. 2017, (9), 1-4 [cit. 2023-02-14]. ISSN 1803-9588. Dostupné z: [https://www.actualgyn.com/pdf/cz\\_2017\\_206.pdf](https://www.actualgyn.com/pdf/cz_2017_206.pdf)
- [38] TESAŘ, Vladimír a Romana RYŠAVÁ. Biopsie ledviny. In: *MojeMedicina.cz: průvodce pacienta: vyšetřovací metody* [online]. ROCHE, 2020 [cit. 2023-02-14]. Dostupné z: <https://www.mojemedicina.cz>
- [39] RYŠAVÁ, Romana a Miroslav MERTA. Indikace k provedení renální biopsie. *Medicína pro praxi* [online]. 2008, 5(5), 200-202 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2008/05/05.pdf>
- [40] Parciální nefrektomie. In: *EAU Patient information* [online]. 2022 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <https://patients.uroweb.org/cz/parcialni-nefrektomie/>
- [41] Radikální nefrektomie. In: *EAU Patient information* [online]. 2022 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <https://patients.uroweb.org/cz/radikalni-nefrektomie/>
- [42] Guidelines pro léčbu renálního karcinomu. *Urologické listy* [online]. 2016, 14(1), 62 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/urologicke-listy/2016-1/guidelines-pro-lecbu-renalniho-karcinomu-58089>
- [43] Kryoterapie. In: *EAU Patient information* [online]. 2022 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <https://patients.uroweb.org/cz/kryoterapie/>

- [44] Radiofrekvenční ablace. In: *EAU Patient information* [online]. 2022 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <https://patients.uroweb.org/cz/radiofrekvencni-ablace/>
- [45] Guidelines pro léčbu renálního karcinomu. *Urologické listy* [online]. 2016, **14**(1), 64-65 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/urologicke-listy/2016-1/guidelines-pro-lecbu-renalniho-karcinomu-58089>
- [46] Guidelines pro léčbu renálního karcinomu. *Urologické listy* [online]. 2016, **14**(1), 65-67 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/urologicke-listy/2016-1/guidelines-pro-lecbu-renalniho-karcinomu-58089>
- [47] ŠTUDENTOVÁ, Hana. Algoritmus léčby metastatického karcinomu ledviny. *Urologie pro praxi* [online]. 2011, **12**(3), 152-157 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2011/03/03.pdf>
- [48] HES, Ondřej. Místo s nejvyšší incidencí renálního karcinomu na světě. In: *Postudium: webinář* [online]. Lékařská fakulta v Plzni, 2020 [cit. 2023-02-16]. Dostupné z: <https://postudium.cz>
- [49] MICHAL, Michal, Ondřej HES a Petr MUKENŠNABL. Světlobuněčný renální karcinom. In: *Nádory ledvin dospělého věku* [online]. Plzeň: Euroverlag, 2000, s. 22-29 [cit. 2023-02-16]. ISBN 80-7177-518-5. Dostupné z: <https://www.medima.cz/nadoryledvin/>
- [50] *WHO Classification of Tumours: Urinary and Male Genital Tumours* [online]. 5th ed; vol 8. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer, 2022 [cit. 2023-04-05]. ISBN 978-92-832-4512-4. Dostupné z: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/36>

- [51] Karcinom ledvin ze světlých buněk. In: *Speciální patologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007, s. 225. ISBN 978-80-7262-494-2.
- [52] Guidelines pro léčbu renálního karcinomu. *Urologické listy* [online]. 2016, **14**(1), 48-49 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/urologicke-listy/2016-1/guidelines-pro-lecbu-renalniho-karcinomu-58089>
- [53] K. ANDEEN, Nicole a Maria TRETIAKOVA. Kidney tumor Adult renal cell carcinoma - common: Clear cell eosinophilic variant. In: *PathologyOutlines.com: find pathology information list* [online]. United States, 2015 [cit. 2023-04-27]. Dostupné z: <https://www.pathologyoutlines.com>
- [54] Imunohistochemie: typický pracovní postup. In: *Baria* [online]. 2021 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/blog/imunohistochemie-typicky-pracovni-postup/>
- [55] OHASHI, Riuko. Stains & CD markers: vimentin. In: *PathologyOutlines.com: find pathology information list* [online]. 2023 [cit. 2023-05-09]. Dostupné z: <https://www.pathologyoutlines.com>
- [56] POLÁK, Zdeněk, Pavel KOSCIELNIK, Radek SÝKORA, Mika DAVID a Jan KRHUT. Asynchronní solitární metastáza světlobuněčného renálního karcinomu 7 let po nefrektomii projevující se Hornerovým syndromem: Zdeněk Polák<sup>1</sup>, Pavel Koscielnik<sup>2</sup>, Radek Sýkora<sup>1</sup>, Mika David<sup>1</sup>, Jan Krhut. *Czech urology* [online]. 2014, **18**(2), 152 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <https://www.czechurol.cz>

- [57] KOLEČKOVÁ, Markéta, Tomáš TICHÝ, Bohuslav MELICHAR, Lucia VEVERKOVÁ, Ondřej HES, Vítězslav KOLEK a Zdeněk KOLÁŘ. Metastazující světlobuněčný renální karcinom bez zjevného primárního ložiska v ledvině imitující pokročilé stadium plicní malignity. *Časopis klinická onkologie* [online]. 2019, **32**(1), 154-156 [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2019-04-10-supplementum-1/metastazujici-svetlobunecny-renalni-karcinom-bez-zjevneho-primarniho-loziska-v-l-1/>
- [58] SEKANINOVÁ, Aneta. *Laboratorní příručka Oddělení patologické anatomie* [online]. In: . Kladno, 2021 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: [http://www.nemocnicekladno.cz/images/dokumenty/patologie/laboratorni\\_priučka\\_pao\\_onk\\_2021.pdf](http://www.nemocnicekladno.cz/images/dokumenty/patologie/laboratorni_priučka_pao_onk_2021.pdf)
- [59] MANHARTOVÁ, Zuzana. 101 kroků k lepší histologii. In: *Baria* [online]. Psáry - Dolní Jirčany [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: [https://www.baria.cz/static/\\_user/uploads/stahuj/101-kroku.9j2fx.pdf](https://www.baria.cz/static/_user/uploads/stahuj/101-kroku.9j2fx.pdf)
- [60] MESCHER, Anthony L. Histologické metody. In: *Junqueirovy základy histologie: příprava tkání pro studium*. 1. Praha: Galén, 2018, s. 1-4. ISBN 978-80-7492-324-1.
- [61] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivar VARGA. Zpracování vzorků pro histologii. In: *Memorix histologie*. 2. vydání. Praha: Triton, 2017, s. 510-515. ISBN 978-80-7553-249-7.
- [62] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika: histologická technika II. část*. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996. ISBN 978-80-7013-202-9.

- [63] TES Valida. In: *Bamed: přístroje a vybavení: parafínová linka* [online]. Litvínovice, 2005 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://www.bamed.cz/pristroje.php?zaznam=195>
- [64] Úvod do rutinního a speciálního barvení. *Baria* [online]. [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/rsc3189701-uvod-do-rutinniho-a-specialniho-barveni>
- [65] ZÁMEČNÍK, Josef. Přehled běžně používaných histologických barvení v patologii. In: *Učebnice PATOLOGIE: Internetové stránky učebnice PATOLOGIE* [online]. LD Prager, 2019 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://ucebnice-patologie.cz>
- [66] MESCHER, Anthony L. Histologické metody. In: *Junqueirovy základy histologie: imunohistochemie*. 1. Praha: Galén, 2018, s. 12-13. ISBN 978-80-7492-324-1.
- [67] Roche BenchMark GX Operators Manual. In: *Manualzz: the universal manuals library* [online]. USA: Ventana Medical Systems, Inc., 2010 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://manualzz.com/doc/55432035/roche-benchmark-gx-operators-manual>



## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Časový vývoj hrubé incidence pro zhoubné novotvary ledviny mimo pánvičku celé populace, populace mužů a populace žen .....	20
Obrázek 2 – Možný výskyt metastáz u pacientů s diagnostikovaným RCC.....	31
Obrázek 3 – Tkáňový automat TPC 15 Duo se vzorky v nerezovém drátěném koši.	37
Obrázek 4 – Zalévací linka TES Valida.....	39
Obrázek 5 – Rotační mikrotom HistoCore AUTOCUT s ovládacím panelem a nástroji ke krájení .....	41
Obrázek 6 – Sářkový mikrotom Leica SM2010r s vodní lázní pro napínání řezů ....	42
Obrázek 7 – Kryokomora se zabudovaným rotačním mikroskopem a připraveným vzorkem ke krájení .....	43
Obrázek 8 – Kryostat CryoStar NX50 pro krájení zmrazených bloků .....	43
Obrázek 9 – Barvicí a montovací přístroj Tissue-Tek Prisma & Film .....	45
Obrázek 10 – Imunohistochemický automat Ventana BenchMark GX.....	51
Obrázek 11 – Samostatná nativní ledvina po obnažení tukového pouzdra.....	52
Obrázek 12 – Frontální řez nativní ledvinou bez nádoru.....	53
Obrázek 13 – Patologicky změněná fixovaná ledvina .....	54
Obrázek 14 – Fixovaná ledvina na řezu s nádorovým útvarem.....	55
Obrázek 15 – Zdravá renální kůra, barveno metodou HE, zvětšeno 200x .....	56
Obrázek 16 – Detailní záběr ledvinného tělíska, barveno metodou HE, zvětšeno 200x .....	57
Obrázek 17 – Přejít mezi zdravou kůrou a dřeví, barveno metodou HE, zvětšeno 100x.....	58
Obrázek 18 – Příčný řez dřeví ledviny, barveno metodou HE, zvětšeno 200x .....	59
Obrázek 19 – Nukleární grading dle Fuhrmanové I, barveno metodou HE, zvětšeno 100x.....	60
Obrázek 20 – Nukleární grading dle Fuhrmanové III, barveno metodou HE, zvětšeno 100x.....	60
Obrázek 21 – Průkaz glykogenu v parafinovém bloku, barveno PAS reakcí, zvětšeno 400x .....	61
Obrázek 22 – Kontrola průkazu glykogenu v cytoplazmě buněk ccRCC, barveno metodou A-PAS, zvětšeno 400x .....	62

Obrázek 23 – Nativní tkáň s ccRCC zpracována v kryostatu a barvena PAS reakcí, zvětšeno 400x.....	63
Obrázek 24 – Znázornění lipidů ve světlobuněčném karcinomu, barveno olejovou červení O, zvětšeno 200x .....	64
Obrázek 25 – Multicystický ccRCC, barveno metodou HE, zvětšeno 50x .....	65
Obrázek 26 – Přiblížené cysty multicystického ccRCC, barveno metodou HE, zvětšeno 200x.....	66
Obrázek 27 – Pozitivní imunohistochemické barvení protilátkou proti vimentinu, zvětšeno 100x.....	67
Obrázek 28 – Granulární ccRCC s nálezem sklovitých hyalinních globulí, barveno metodou HE, zvětšeno 200x .....	68
Obrázek 29 – Pozitivní reakce s protilátkou CD10, IHIC, zvětšeno 100x .....	69
Obrázek 30 – Fibrotická dediferenciace ccRCC, barveno modrým Massonovým trichromem, zvětšeno 50x .....	70

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 – Srovnání incidence nádorů ledvin a mortality spojené s tímto onemocněním v ČR, s ostatními zeměmi světa v roce 2020, přepočet na 100 000 obyvatel.....	21
Tabulka 2 – TNM klasifikace pro karcinom z renálních buněk.....	23
Tabulka 3 – Nukleární grading dle Fuhrmanové .....	24
Tabulka 4 – Rozdělení do stádií podle TMN klasifikačního systému .....	24
Tabulka 5 – Odvodňovací, projasňovací a prosycovací proces úpravy tkáně před jejím zalitím .....	36
Tabulka 6 – Zacházení s preparátem před a po barvení.....	44
Tabulka 7 – Postup základního barvení Hematoxylinem-eozinem.....	46
Tabulka 8 – Postup barvení PAS reakcí.....	47
Tabulka 9 – Postup barvení kolagenního vaziva modrým Massonovým trichromem .....	47
Tabulka 10 – Postup barvení lipidů olejovou červení O.....	48