

RENÁLNA BIOPSIA - PRAKTICKÉ OTÁZKY

Prvky procesu renálnej biopsie na základe Konsenzu Európskej únie z 25.februára 2000, Viedeň, Rakúsko; niektoré smernice vydala Renal Pathology Society:

1. Odobratie biopsie.
2. Transfer materiálu.
3. Rozdelenie vzorky.
4. Uchovávanie tkaniva.
5. Rezanie bioptickej vzorky.
6. Farbenie bioptickej vzorky.
7. Vypracovanie správy o náleze.
8. Stanovenie diagnózy.

Odobratie biopsie - veľkosť bioptickej vzorky

- dva bioptické válce s minimálnou dĺžkou 1 cm s priemerom minimálne 1,2 mm
- **optimálne: 10-15** glomerulov
- dostatočne: 6-10 glomerulov
- veľmi zriedkavo stačí jeden glomerulus na stanovenie diagnózy
- fokálna glomerulárna lézia - stanovenie závažnosti percentom postihnutia glomerulov - malá vzorka vedie k závažným chybám v klasifikácii závažnosti ochorenia
- pri malej bioptickej vzorke sa dá ťažko vylúčiť fokálne ochorenie
- patológ - najprv kontrola veľkosti a kvality bioptickej vzorky svetelným mikroskopom predtým než sa rozhodne ako spracovať materiál
- zvyčajne jeden valec na svetelnú mikroskopiu a druhý na imunohistológiu, elektrónovú mikroskopiu a ďalšie vyšetrenia

Informácie nepostrádateľné pre patológa

- klinická anamnéza
- najnovšie laboratórne hodnoty, zvlášť
 - ➔ v moči
 - x proteinúria, hematúria, leukocytúria, cylindrúria
 - ➔ v sére
 - x urea, kreatinín, cholesterol, celkové bielkoviny, klírens kreatinínu, C3, C4, anti-nukleárne protilátky (ANA), anti-neutrofilné cytoplazmatické protilátky (ANCA), protilátky proti glomerulárnej bazálnej membráne (GBM), argininosukcinátlyáza (ASL)
- prítomnosť diabetes mellitus alebo hypertenzie alebo ďalších systémových ochorení
- ďalšie relevantné parametre (ak sú k dispozícii)
- aktuálna liečba (ak je nejaká)

Spracovanie vzorky renálnej biopsie

- závisí to od toho, či je miestny patológ k dispozícii alebo sa vzorky posielajú
- izotonický NaCl - pre rýchly lokálny transport materiálu
- ideálna procedúra - umožňuje všetky rozličné typy ďalšieho spracovania patológom:
 1. kryoprezervácia jednej časti materiálu na imunofluorescenciu

2. fixácia paraformaldehydom (PFA) alebo formaldehydom (4%, pufrovaný, pH 7,2-7,4)
3. paralelne fixácia malej časti biptickej vzorky 3% glutaraldehydom (zvyčajne na elektrónovú mikroskopiu)

Fixácia a následné spracovanie vzoriek obličkovej biopsie			
Svetelná mikroskopia	Imunofluorescencia	Imunohistochemia	Elektrónová mikroskopia
PFA (30 min)	NaCl	PFA	Glutaraldehyd
Rutínne spracovanie	Zmrazené rezy (kryosekcie)	Parafín	Ultratenké rezy
(4 h)	(1 deň)	(1 deň)	(1 týždeň)

Spôsoby rozdelenia a fixácie vzorky obličkovej biopsie:

1. Do izotonického fyziologického roztoku a priame zaslanie patológovi, ktorý rozdelí válec, ak je to možné na dve alebo tri časti: väčšia časť na svetelnú mikroskopiu, menšia časť na imunofluorescenciu a ďalšia malá časť (ak je k dispozícii) sa použije na fixáciu glutaraldehydom na elektrónovú mikroskopiu (voliteľné).
2. Biopsia sa vloží priamo do fixačného roztoku (PFA alebo formaldehyd) a zašle sa patológovi. Patológ potom vloží materiál do parafínu. Toto umožňuje rutínne farbenie ako aj imunohistológiu nepriamou metódou (APAAP alebo ABC) použitím toho istého materiálu. Malá časť formalínom fixovaného válca sa dá použiť následne aj na elektrónovú mikroskopiu.

Spracovanie renálnej biopsie patológom

8-16 parafínových rezov hrúbky **2-3 μm** na jednu biopsiu - následne svetelná mikroskopia a postupy imunohistochemického farbenia

Svetelná mikroskopia (rutínne farbenia parafínových rezov):

- hematoxylín a eozín (HE)
- periodická kyselina - Schiffovo farbenie (PAS)
- farbenie fibrózneho tkaniva (t.j. Siriusova červená, trichróm, Ladewig, atď.)
- farbenie striebrom
- farbenie bielkovín

A) Farbenie HE - prehľad o renálnych a hlavne glomerulárnych zmenách, t.j. hypercelularita

zhrubnutie glomerulárnej bazálnej membrány

lobulárny pohľad na klbko glomerulu s oklúziou lúmenu niektorých kapilár

B) Farbenie PAS - detailná analýza glomerulárnej štruktúry. Upozorňuje na zhrubnutia a nepravidelnosti bazálnej glomerulárnej membrány. Ľahká detekcia arteriálnej hyalínózy a fibrinoidnej nekrózy ciev.

C) Farbenie bielkovín (acid fuchsin-Orange G: SFOG) - dokumentuje značené subendoteliálne a intramembránové bielkovinové depozity (červená farba). Najlepšie sa detegujú imunitné depozity.

D) Farbenie striebrom - zobrazuje nepravidelnosti a zhrubnutia glomerulárnej bazálnej membrány ako aj niektoré hrotnaté výbežky (spikes) do periférie niektorých kapilárnych slučiek.

E) Imunofluorescencia - antiséra proti IgG. Lineárne farbenie pri membranóznej glomerulonefritíde.

F) Imunohistochemia - používa antiperoxidázovú metódu a protilátky proti IgG. Rovnako ako pri imunofluorescencii vidno v prípade včasnej membranóznej glomerulonefritídy lineárne pozitívne farbenie pozdĺž glomerulárnej bazálnej membrány.

Voliteľné farbenia (svetelná mikroskopia):

- farbenie podľa Kossa (kalcifikácie)
- farbenie konzskou červeňou (amyloid)

Imunohistochemia a imunofluorescencia

2 techniky testovania tkaniva pomocou protilátok:

1. **Imunofluorescencia** - využíva značkové antiséra alebo protilátky, čo vyžaduje natívne tkanivo bez fixácie.
2. **Imunohistochemia** - dá sa vykonať na formalínom fixovanom tkanive, pričom agresívnejšie fixačné roztoky ničia epitopy a znemožňujú imunohistochemické vyšetrenia.

Vyšetrovacie činidlá:

1. Antiséra alebo monoklonálne protilátky proti imunoglobulínom (IgA, IgG a IgM).
2. Komponenty klasickej alebo alternatívnej cesty aktivácie komplementu (C1q, C3c a C4).
3. κ - a λ -ľahké reťazce.
4. Albumín.
5. Fibrinogén.
6. Pre výskumné účely sú k dispozícii aj mnohé ďalšie.

Hodnotenie patológa - vzory farbenia:

- ✓ mezangiálny vs kapilárny vzor farbenia
- ✓ lineárne (alebo pseudolineárne) vs granulárne farbenie

Hodnotenie patológa - lokalizácia depozitov:

- ✓ subendoteliálne
- ✓ intramembranózne
- ✓ subepiteliálne

Špeciálne vyšetrovacie činidlá:

1. Protilátky proti podjednotkám amyloidu
 - AA amyloid
 - AL amyloid
 - transtretín, atď.
2. Protilátky proti vírusom:
 - cytomegalovírus
 - polyomavírus
 - adenovírus
3. Imunofarbenie C4d fragmentu cesty aktivácie komplementu - pri biopsiách renálnych transplantátov.

- extrémne populárne, no stále trochu kontroverzné, aj keď sa zdá, že pomáha pri diagnóze humorálnej rejeckie.

Elektrónová mikroskopia

- nie je potrebná pri každej obličkovej biopsii
 - vyžaduje zvláštnu fixáciu a zaobchádzanie s materiálom
 - časová náročnosť a obmedzená univerzálna dostupnosť
 - uvažovanie o elektrónovej mikroskopii už pri biopsii
 1. Alportov syndróm
 2. choroba tenkej bazálnej membrány
 3. imunotaktoidná choroba
 4. nefropatia s minimálnymi zmenami
- potom časť materiálu fixovať glutaraldehydom (alternatívne použitie formalínom fixovaného tkaniva)

Akú informáciu poskytuje elektrónová mikroskopia?

1. Prítomnosť a stupeň bunkovej proliferácie (mezangiálna vs endoteliálna bunková proliferácia).
2. Zmeny bunkovej štruktúry (t.j. proces fúzie pedicel podocytov alebo vakuolizácia podocytov).
3. Nekróza alebo apoptóza buniek.
4. Zmeny glomerulárnej bazálnej membrány (t.j. zhrubnutie, stenčenie, spájanie, nepravidelnosti).
5. Lokalizácia imunoglobulínových depozít (t.j. mezangiálna, subendoteliálna alebo subepiteliálna lokalizácia).
6. Pri niektorých obličkových ochoreniach ako lupusová nefritída, sa dajú elektrónovou mikroskopiou zistiť špecifické morfológické zmeny, napr. fingerprintové (odtlačok prsta) a tubuloretikulárne štruktúry.

Postup patológa pri zostavovaní správy o náleze z renálnej biopsie

- ✓ štandardný formát správy:
 1. Adekvátnosť vzorky (počet glomerulov a artérií).
 2. Popis morfológických zmien systematickým spôsobom pre každý zo skúmaných kompartmentov (glomeruly, tubuly, interstícium, cievy).
 3. Výsledky imunofluorescenčných/imunohistochemických štúdií.
 4. Výsledky elektrónovej mikroskopie (toto zaberie najviac času a zvyčajne si to vyžaduje separátnu správu neskôr).
- ✓ poskytnúť dva odlišné typy diagnóz:
 1. deskriptívna diagnóza (napr. mezangioproliferatívna glomerulonefritída)
 2. konečná (finálna) diagnóza zahŕňajúca výsledky imunofluorescenčných/imunohistochemických a elektrón-mikroskopických vyšetrení ako aj klinickú informáciu (napr. IgA glomerulonefritída)

<i>Systematická analýza obličkovej biopsie</i>	
Glomeruly	Fokálne - difúzne
	Segmentálne - globálne

<i>Systematická analýza obličkovej biopsie</i>	
	Počet a veľkosť
	Celularita (aké bunky?)
	Depozity
	Mezangiálna matrix
	Fibrinoidná nekróza
	Kreščenty (Crescents)
Tubulointerstícium	Tubulárna atrofia a/alebo dilatácia
	Nekróza tubulárnych epiteliálnych buniek
	Intersticiálny zápal (mononukleárne bunky, granulocyty, eozinofily)
	Intersticiálna fibróza
	Elektrónová mikroskopia
	Ďalšie črty (kalcifikácie, obrovské bunky, atď.)
Cievy	Zhrubnutie steny
	Hyalinóza
	Fibrinoidná nekróza
	Zápal steny cievy alebo endotélia (endotelialitis)

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

AMANN, Kerstin - HAAS, Christian S.: What you should know about the work-up of a renal biopsy. Nephrology Dialysis Transplantation, Volume 21, Number 5, s. 1157-1161. Oxford : Oxford University Press 9.januára 2006. Internet:

<http://ndt.oxfordjournals.org/cgi/content/full/gfk037?ijkey=4z0zkBFyoQYtl8r&keytype=ref>

DEMEŠ, Martin - OKŠA, Adrián: Biopsia obličky pod ultrazvukovou kontrolou. Lek obz, 54, 2005, č. 5, s. 194 - 197. Abstrakt na internete:

[http://www.health.gov.sk/redsys/rsi.nsf/0/aae363d9a8a251ddc1256cbe004fea17/\\$FILE/lo5.doc](http://www.health.gov.sk/redsys/rsi.nsf/0/aae363d9a8a251ddc1256cbe004fea17/$FILE/lo5.doc)

<http://NephroSite.Polascin.Net/>

Na základe osobných odborných konzultácií a informácií čerpaných zo zdrojov uvedených v zozname použitej literatúry vypracoval:

MUDr. Ľubomír POLAŠČÍN
NEFRO-COMP, s.r.o., Dialyzačné stredisko
Školiace pracovisko SZU Bratislava
Primár: MUDr. Mahmoud R. HASSAN
FNsP Bratislava - pracovisko Ružinov
Ružinovská 6
826 06 Bratislava

Zverejnené na Internete: <http://nephrosite.polascin.net/articles/rb.php/>