



SPOLEČNOST
ČESKÝCH PATOLOGŮ

Systemové amyloidózy

DOPORUČENÝ POSTUP PRO BIOPTICKÉ VYŠETŘENÍ

Eva Honsová, Markéta Hermanová, Iva Svobodová, Jana Malušková, Jaromír Háček
Oponenti: Kateřina Kamarádová, Helena Hůlková



Doporučený postup pro diagnostiku systémových amyloidóz

Eva Honsová, Markéta Hermanová, Iva Svobodová, Jana Malušková, Jaromír Háček
Oponenti: Kateřina Kamarádová, Helena Hůlková

Amyloid může být kongo červeně negativní a v tom případě také nepolarizuje.
Zelená barva v polarizaci není absolutním požadavkem diagnózy amyloidu.

OBSAH

Úvod

1. Detekce amyloidu

- 1a. Barvení Kongo červení
- 1b. Polarizace

2. Určení typu amyloidu

- 2a. Imunofluorescence v typizaci amyloidu
- 2b. Laserová mikrodisekce, hmotnostní spektrometrie a další techniky v typizaci amyloidu

3. Ostatní techniky k detekci amyloidu

- 3a. Detekce amyloidu v elektronové mikroskopii
- 3b. Využití biopsie tukové tkáně v diagnostice amyloidu
- 3c. Využití biopsie kostní dřevě v diagnostice amyloidu

4. Lokalizovaná amyloidóza

5. Nástrahy detekce amyloidu

6. Terapeutické konsekvence typizace amyloidu

Závěr

Literatura

ÚVOD

Amyloidózy představují skupinu vzácných a heterogenních chorob, které spojuje ukládání abnormálně poskládaných proteinů v různých tkáních. Depozita amyloidu vznikají konformační změnou původně z rozpustných proteinů, které se chybně poskládají (s převahou β struktury skládaného listu) a agregují do nerozpustných a obtížně degradovatelných fibril amyloidu. Současná klasifikace stojí na identifikaci proteinu vytvářejícím fibrily v depozitech. Terminologicky jsou onemocnění značena A (amyloid) a následující znak zkratky deponovaného proteinu (L: lehké řetězce, TTR: transthyretin atd.). Mezi klinicky nejdůležitější lze v ČR zařadit systémové amyloidózy, kterými jsou AL, ATTR a AA. Nejčastějším typem je AL amyloidóza, která představuje závažné systémové onemocnění se vzrůstající prevalencí. Podle statistik USA vzrostla prevalence z 15,5/1milión v roce 2007 na 40,5 v roce 2015 (1). V posledních desetiletích byly odhaleny další typy amyloidóz a některé z nich jsou časté v určitých etnických skupinách. Lze sem zařadit např. amyloidózu s depozity ALECT2 (leukocyte chemotactic factor 2), která mezi Hispanci představuje 2. nejčastější typ systémové amyloidózy (2). U kavkazské rasy jde o velmi raritní onemocnění.

Diagnóza amyloidózy s určením typu amyloidu patří v histopatologii k velmi komplikovaným diagnózám. Je tomu tak proto, že depozita jsou v barvení hematoxylinem-eosinem (H&E) homogenní a eozinofilní jako všechny běžné proteiny. Většina typů amyloidu, a především všechny dominující

systémové formy mají afinitu k bazálním membránám a cévám. Onemocnění s depozity proteinů v cévách jsou velmi častá (především hypertenze a diabetes mellitus) a depozita u těchto chorob sdílí s amyloidem nejen stejnou morfologii v H&E, ale i lokalizaci v cévách. Drobná depozita amyloidu na začátku onemocnění jsou proto v rutinně barvených preparátech (bez použití speciálních metod) neidentifikovatelná. Amyloid může být zastížen v nejrůznějších tkáních s velmi variabilní distribucí, což ovlivňuje detekci a především typizaci. Identifikace objemných depozit obvykle nečiní problém, ale nečetná a velmi drobná depozita jsou obtížně diagnostikovatelná i v rukou zkušeného patologa. Právě na detekci časných fází onemocnění se soustředí klinická praxe, protože zastížení těchto stádií má největší šanci na příznivou terapeutickou odpověď. Dalším problémem detekce a typizace je fakt, že amyloid v depozitech není tvořený pouze fibrilární komponentou vlastního amyloidu, ale vždy obsahuje další komponenty (sérový amyloidový protein, glykosaminoglykany, především heparan sulfát a apolipoproteiny) a také v různém rozsahu „průsaky“ sérových proteinů. To sebou nese technické problémy a limitace v hodnocení různých diagnostických postupů/metod.

V posledních letech se zdála být velkým příslibem pro typizaci amyloidu laserová mikrodisekce s hmotnostní spektrometrií. V současnosti je problémem, že i tato metoda neidentifikuje fibrily amyloidu, ale proteiny tkáňového extraktu. Proto si sebou nese stejná rizika nejistého výsledku jako ostatní metody. Navíc pro hmotnostní spektrometrii je třeba

zachytit poměrně velká depozita amyloidu, a tak malé množství depozit je pod rozlišovacími limity této metody.

V praxi je k diagnostice amyloidu nezbytné velmi dobré vybavení (mikroskop s polarizací, imunofluorescencí a event. ELMI), to je jedním z důvodů, proč diagnostika amyloidu patří nejčastěji do rukou nefropatologů, kteří s těmito technikami rutinně pracují.

Obecně lze shrnout, že **diagnóza amyloidózy zahrnuje 2 kroky**. Prvním z nich je *detekce amyloidu* (rozpoznání, že se o amyloid jedná, které musí být vždy s jistotou). Druhým je *určení typu amyloidu* (AL, AA, transthyretin, fibrinogenA alfa atd.), což je nezbytným předpokladem pro léčbu amyloidu, která v posledním desetiletí zaznamenala dramatické změny.

1. Detekce amyloidu

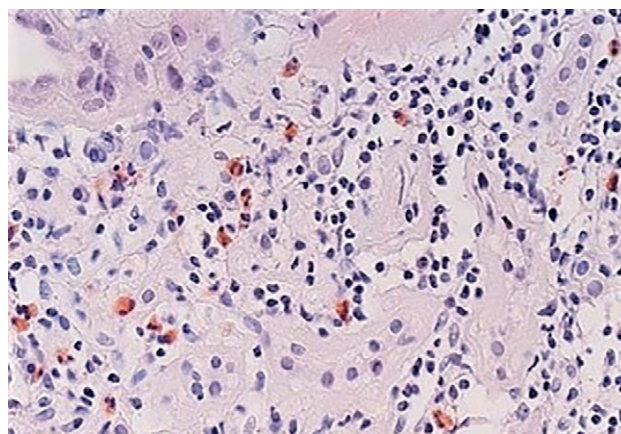
Průkaz amyloidu je proces o několika fázích.

1. První z nich je nutnost prokázat, že v depozitech je opravdu amyloid. Zlatým standardem je **barvení Kongo červení** (pozor: řez o síle 4-5 μm nebo silnější).
2. Nezbytným požadavkem je *použití polarizace*, s rozpoznáním anomálních barev event. se zeleným dvojlomem.
3. Následujícím krokem by měla být *další metoda k verifikaci depozit amyloidu* (Kongo ve fluorescenčním světle, thioflavin event. barvení saturnovou červení).

Diagnostické standardy a technické předpoklady vyšetření

1a. Barvení Kongo červení

Diagnostickým standardem je průkaz amyloidu Kongo červení s následným barevným dvojlomem v polarizovaném světle. Kongo červení je původně textilní barvivo. Technika histologického barvení je známá od r. 1922 a nese si znamení doby, kdy vznikla. Barvení Kongo červení a jeho různé modifikace používají v posledním kroku „odmytí přebytečného barviva“. Klasická metoda barvení Kongo červení provádí tzv. diferenciaci, tj. situace, kdy se přebytečné barvivo z řezů odmyvá a okem se kontroluje, zda ho v preparátu zbývá dostatečné množství. Různé modifikace barvení Kongo červení se liší jen tím, že odmyvají přebytečné barvivo po pevně stanovenou dobu. Z toho je zřejmé, že metoda je „laborantka de-



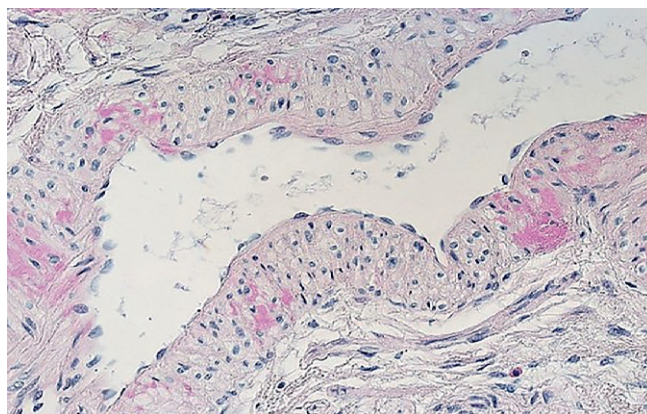
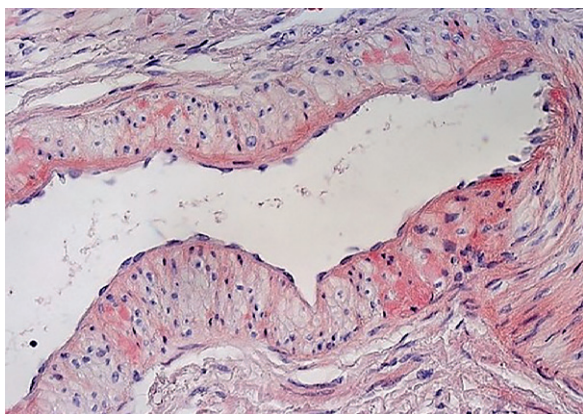
Obr. 1. Vnitřní kontrola barvení Kongo červení, kterou jsou eozinofily.

pendentní“ a výsledek není a ani nemůže být standardní. Navíc Kongo červení není vhodnou metodou průkazu amyloidu na dnes běžně krájených velmi tenkých řezech (2-3 μm); Kongo červení potřebuje řez silnější (5 a více μm). Proto prakticky každá laboratoř, která má s diagnostikou amyloidu zkušenosti, používá ještě některý z dalších průkazů k ověření/podpoře diagnózy; mezi nejčastější patří thioflavin, Kongo červení s fluorescencí a saturnová červení. To, že nestandardní výsledky barvení Kongo červení jsou v praxi běžné, je publikačně doloženo; problémy s nestandardními výsledky barvení Kongo červení udává 75 % nefropatologů (3).

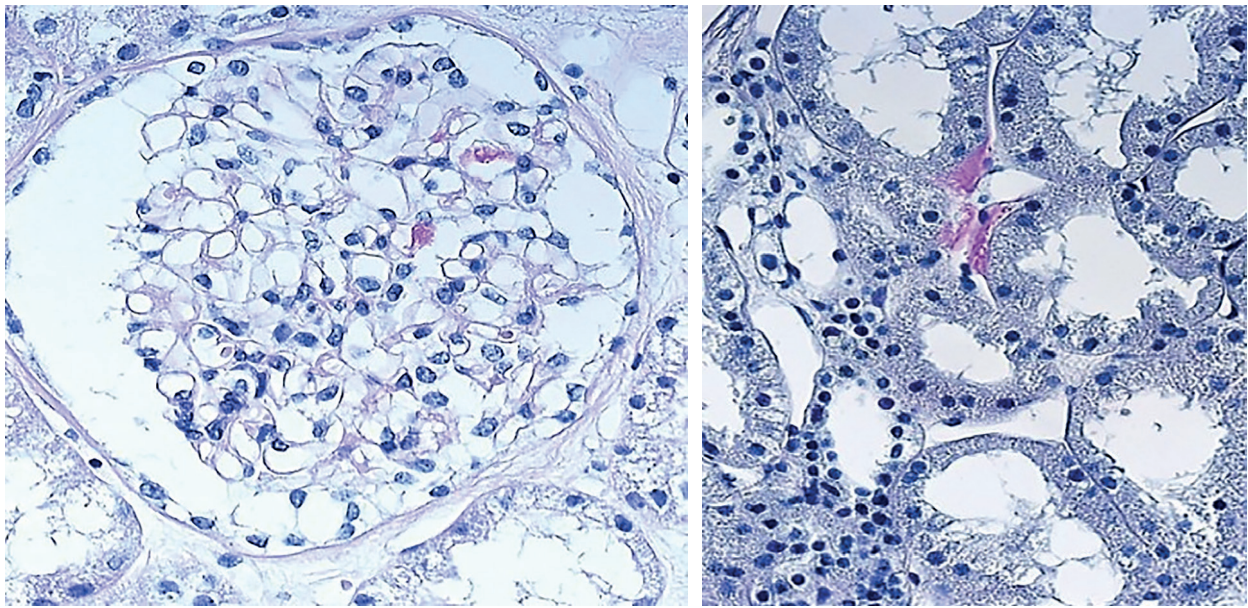
Opatrnosti je třeba zvl. v lokalitách s přítomností kolagenu (endomyokardiální biopsie, cévy), protože Kongo červení s kolagenem interferuje, a navíc kolagen vykazuje dvojlom v polarizovaném světle (s bílou barvou). Barvení Kongo červení by se mělo provádět vždy s pozitivní kontrolou (pozitivní kontrolou jsou také eozinofily ve vzorku, Obr. 1).

Velmi výhodnou technikou pro potvrzení detekce amyloidu je použití saturnové červeně, která s kolagenem neinterferuje a nebarví ani elastická vlákna (Obr. 2 – 5).

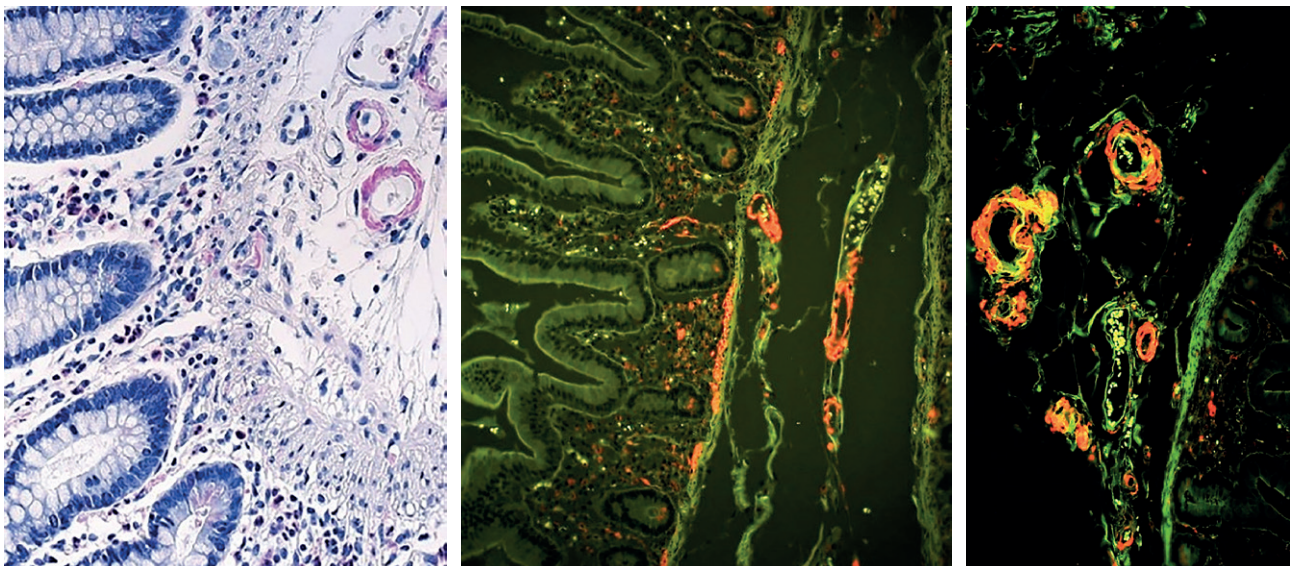
Použití thioflavinu má výhodu v jednoduché technice IF provedení, interpretace pozitivního výsledku je daleko jednodušší než u Kongo červeně. Nevýhodou je, že barvení není trvanlivé a pozitivní není jen amyloid.



Obr. 2 a 3. Svalová arterie s depozity amyloidu v barvení Kongo červení (s přibarvením elastiky a svaloviny vlevo). Vpravo stejná céva v barvení saturnovou červení.



Obr. 4 a 5. Depozita amyloidu v ledvině, barveno saturnovou červení. Takto malé množství depozit amyloidu Kongo červeně velmi pravděpodobně nezobrazí.



Obr. 6, 7 a 8. Obdobná situace s drobnými depozity amyloidu s cévách GIT (barveno saturnovou červení). Obr. uprostřed a detail vpravo ilustruje detekci amyloidu na sklech barvených saturnovou červení ve fluorescenčním světle. Metoda je velmi výhodná při detekci malého množství depozit, amyloid svítí červeně. Stejný výsledek bude u barvení Kongo červení (použitá je LED dioda s filtrem 495nm).

Dalším problémem a méně známou skutečností je fakt, že **amyloid může být Kongo červeně negativní**. V případě transthyretinové amyloidózy existují 2 typy fibril. Fibrily typu A a fibrily typu B. Pokud jsou ve vzorku vlákna typu B, zůstává vše, jak jsme zvyklí (vlákna jsou kongofilní s odpovídající polarizací). Na druhé **straně fibrily typu A afinitu ke Kongo červení nemají**, výsledek barvení Kongo červení může být velmi slabý nebo kompletně negativní a v tom případě se neprojeví ani efekt polarizace a výsledky obou metod budou negativní (4).

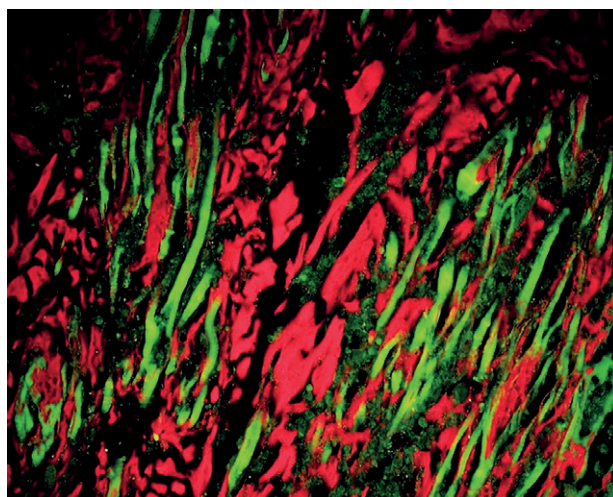
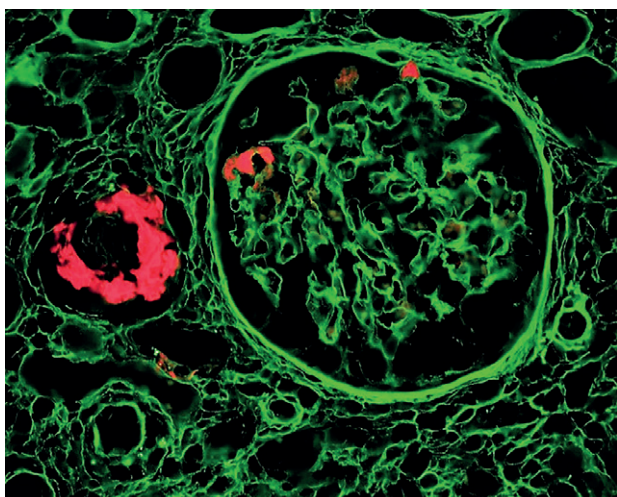
Podobně je doloženo, že některé případy AL amyloidu (verifikované hmotnostní spektrometrií) mohou být Kongo negativní nebo v některých lokalitách Kongo negativní a v dal-

ších Kongo pozitivní (5).

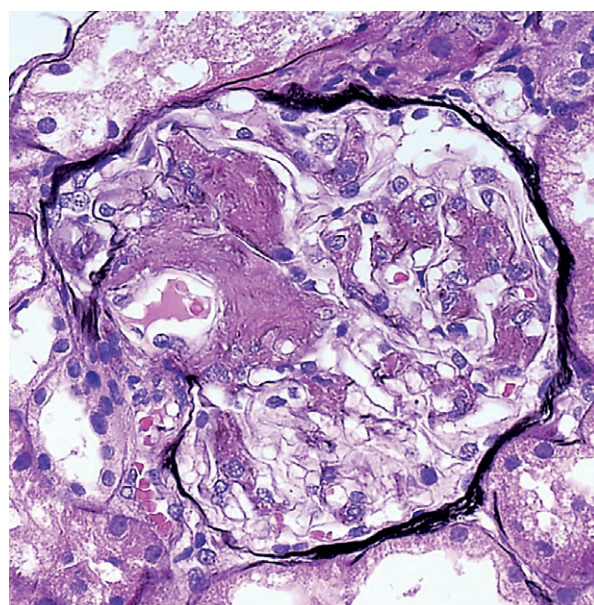
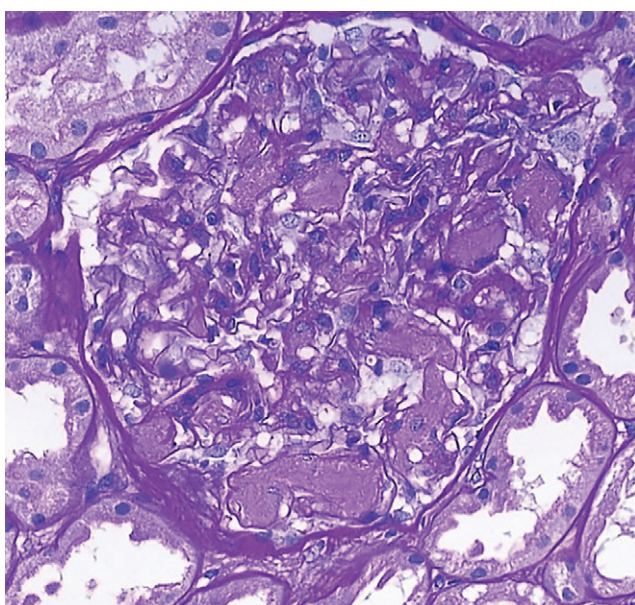
Na druhé straně v biopsiích ledvin mohou být Kongo pozitivní depozita nejen v případě amyloidu, ale i u jiných glomerulonefritid (6).

Nástrahy detekce amyloidu

Problémy detekce amyloidu mohou představovat cévy (Obr. 1 a 2), kde Kongo červeně přibarvuje více struktur, včetně elastických vláken. Dále všechny případy z různých lokalit s ojedinělými a drobnými depozity, která jsou v Kongo červeně obtížně detekovatelná a někdy až nedetekovatelná; v takových případech je třeba použít další techniky (Obr. 3-9).



Obr. 9 a 10. Kongo červeně ve fluorescenčním světle identifikuje amyloid v arteriole a drobná depozita v glomerulu. Vpravo jsou stejnou technikou detekovaná červená masivní depozita amyloidu v myokardu.



Obr. 11 a 12. Depozita amyloidu v glomerulu; vlevo barvení PAS se slabou pozitivitou depozit. Vpravo depozita v hilové arteriole a v mezangiu v barvení PASM.

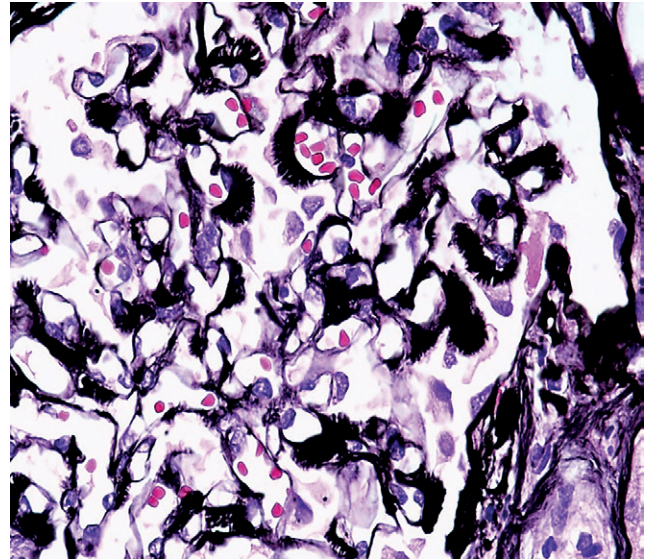
V případě biopsií ledvin patologové používají rutinně další barvení, která pomohou identifikovat i malá depozita amyloidu. Amyloid je typicky PAS slabě pozitivní (na rozdíl od ukládání lehkých řetězců LCDD, kde jsou depozita silně PAS pozitivní, Obr. 11). Podobně v barvení PASM (methanamine silver-Periodic acid-Schiff dobarvený HE) je obvykle amyloid negativní (Obr. 12, 13). Malá depozita v okolí GBM mohou vytvářet protruze do subepiteliálního prostoru ve tvaru tzv. kohoutích hřebíků, což usnadní detekci (Obr. 13).

V imunofluorescenci vykazuje většina depozit amyloidu negativní frakce komplementu (C3, C1q). Platí to ale pouze v širším centru Gaussovy křivky. Amyloid může být C3 silně pozitivní i plošně pozitivní ve stříbření (PASM) a v barvení PAS (Obr. 14).

1b. Polarizace Kongo červeně a barevný/zelený dvojlom v polarizovaném světle

Správný postup při polarizaci též není jednoduchou záležitostí, a kromě jiného je závislý na technickém vybavení mikroskopu (s možností rotace polarizátoru nebo analyzátoru). Fyzikálně optické vlastnosti Kongo červeně a jejího použití při detekci amyloidu jsou nad rámec tohoto textu a jejich vysvětlení (včetně principu polarizační mikroskopie, spolu s hodnocením absorpce vlnových délek a přechodů barev, a z toho vyplývajícími požadavky na rotaci) jsou součástí několika článků A. Howie (7, 8).

Pro patologa je důležité vědět, že *zelená barva v polarizaci není absolutním požadavkem diagnózy amyloidu*. Čistě zelená barva je naopak velmi výjimečná. Normálně patolog identifikuje 2 a více barev, často žlutou se zelenou a modrou se



Obr. 13 a 14. Depozita amyloidu v glomerulu v barvení PASM; vlevo obvyklá situace, depozita se nestříbří a v oválu jsou rozeznatelné protuze do subepiteliálního prostoru. Vpravo se depozita silně stříbří a fokálně jsou podobné úseky ve tvaru kohoutího hřebenu.

zelenou. Pokud je vidět více než jedna barva, obvykle změní svoji pozici během rotace polarizátoru nebo analyzátoru. Barvy přecházejí od oranžově-žluté, přes červenou, žlutozelenou, po zelenou a modrou. Celé toto spektrum je součástí diagnózy a tyto tzv. *anomální barvy jsou pro diagnózu amyloidu typické*. Literárně opakovaně udávaný tzv. „apple green“ je vidět pouze výjimečně, v ideálním stavu a v praxi je daleko častější žlutá-zelená, modrá-zelená nebo jen kombinace žluté a modré.

Polarizace je také významně ovlivněna použitím plastické folie místo krycího skla. Folie různých výrobců propouští různě světlo a limitují výsledky polarizace (9).

2. Určení typu amyloidu

Role patologa nekončí s diagnózou amyloidózy. Cílem a nezbytným předpokladem pro léčbu je **určení typu amyloidu**. V mnoha studiích bylo opakovaně publikováno, že antigenní místa jsou významně alterována během fixace a následného rutinního parafinového zpracování, proto je v praxi zvl. u detekce drobných depozit *nejspolehlivější metodou typizace systémových amyloidóz imunofluorescence (10)*.

2a. Imunofluorescence v typizaci amyloidu

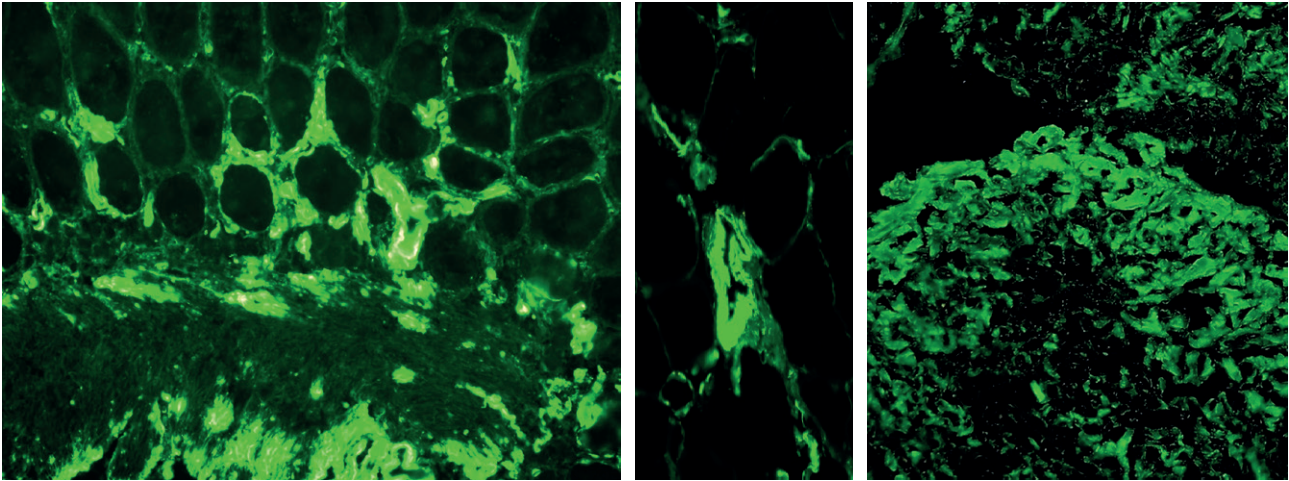
Používané techniky využívají reakce protilátky proti antigenu. V českém písemnictví se termín imunohistochemie používá pro metody prováděné ve formolem fixovaném, do parafinu zalitém vzorku, zatímco imunofluorescence je v principu podobná technika, která se provádí ze vzorku zmrazeného, bez fixace. K terminologickému chaosu přispívá to, že angličtina používá termín „immunohistochemistry“ jako nadřazený termín, pod kterým je často začleněna i imunofluorescence.

Alterace antigenních míst při parafinovém zpracování je problémem především detekce AL amyloidózy, kde je ještě třeba brát do úvahy, že lehké řetězce jsou extrémně varia-

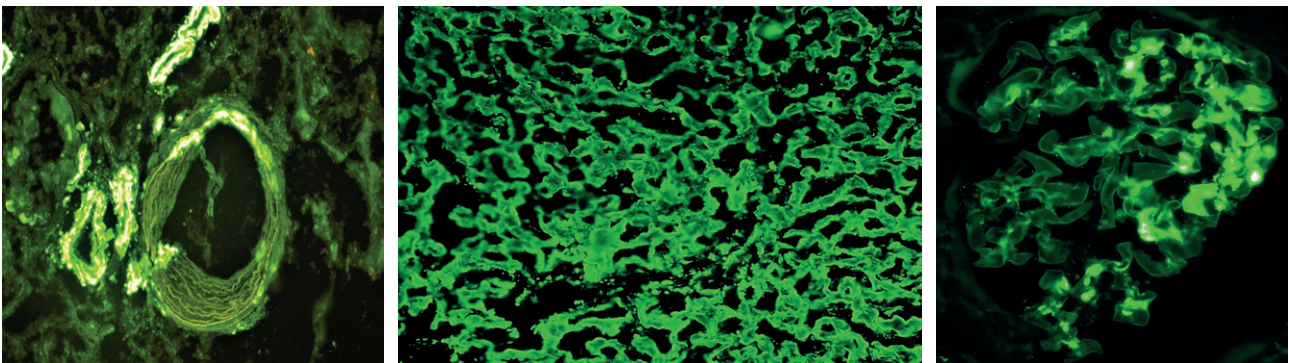
bilní a komerčně vyráběné protilátky jsou namířené proti konstantním doménám; to je jedním z důvodů, proč dosud *neexistují komerčně dostupné protilátky, které by spolehlivě detekovaly lambda nebo kappa řetězce amyloidu v parafinových řezech*. Kromě výše zmíněného se na problémech s detekcí podílí i fakt, že lehké řetězce jsou běžně součástí bílkovin séra a že musí být v průběhu technické části vyšetření (před vlastním hodnocením) z tkáně odstraněny. V parafinových řezech se tak děje natrávením; pokud se to zcela nepodaří, vytváří se „nespecifický“ pozitivní výsledek, který může vést k tragickým diagnostickým omylům. Na rozdíl od těchto technik, ve zmrazeném nativním materiálu se tyto proteiny z tkáně lehce odstraní prostým vymytím. Není tedy překvapením, že mnoho protilátek funguje nesrovnatelně lépe nebo pouze při detekci v nativní tj. nefixované zmrazené tkáni. Proto je pro úspěšnou typizaci amyloidu daleko výhodnější imunofluorescenční detekce (ze zmrazené nefixované tkáně), která má ještě tu výhodu, že je velmi rychlá a výsledek může být znám během 2-3 hodin (Obr. 15 – 20).

Použití fluorescence znamená *organizační změnu v odběru a transportu vzorku*. Tkáň nesmí oschnout, položí se a zabalí se do mulu namočeného ve fyziologickém roztoku, a pokud není možný okamžitý transport, uloží se do lednice nebo do chladicí tašky. Doprava do laboratoře na patologii by měla být do 1-2 hod. Tkáň se před transportem nezmrazuje! Imunofluorescenční vyšetření dokáže zpracovat jakékoli tkáň, včetně tuku, endoskopických biopsií z GIT či myokardu. Literárně je doloženo, že tato technika spolehlivě identifikuje 90-94 % amyloidóz v běžné nefropatologické praxi (11, 12).

Další možností, která se využívá v nefropatologii a lze ji úspěšně využít zvl. při vyšetřování endomyokardiálních biopsií je *provedení imunofluorescence z parafinu* (natrávení pronasou nebo jinou látkou). Výsledek má sice nižší citlivost, ale občas překvapí demaskováním antigenů transthyretinu i lehkých řetězců.



Obr. 15, 16 a 17. Výsledek IF: vlevo sliznice tlustého střeva, uprostřed drobná céva v tukové tkáni a vpravo myokard. Pokud je výsledek takto pozitivní je diagnostické rozhodnutí rychlé a zařazení nečiní potíže.



Obr. 18, 19 a 20. Výsledek IF: vlevo svalová arterie a arterioly dokumentuje pouze pozitivní depozita, elastická vlákna zůstávají zřetelná a jsou negativní. Uprostřed masivní depozita v Disseho prostorech v játrech. Vpravo depozita v mezangiu glomerulu.

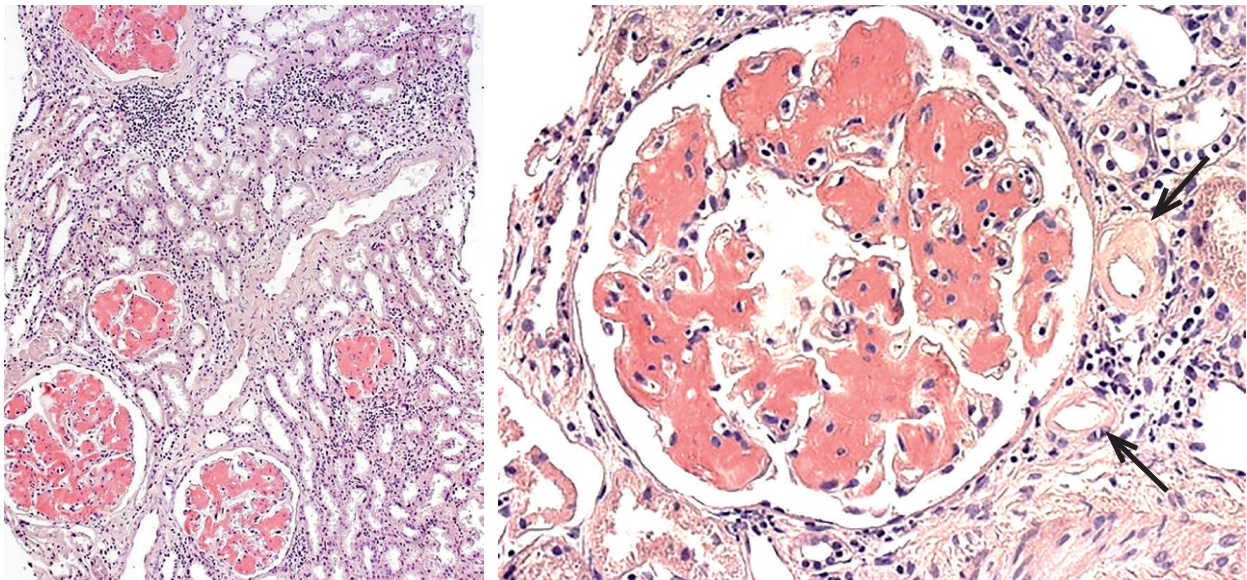
2b. Laserová mikrodisekce, hmotnostní spektrometrie a další techniky v typizaci amyloidu

Hmotnostní spektrometrie se zdá být metodou budoucnosti a má nezaměnitelné místo při detekci nových forem/typů amyloidů, proti kterým nejsou protilátky. V současnosti je problémem, že i tato metoda neidentifikuje fibrilu amyloidu, ale proteiny tkáňového extraktu. Proto si sebou nese stejná rizika nejistého výsledku jako metody předchozí. Navíc pro hmotnostní spektrometrii je třeba zachytit poměrně velká depozita amyloidu (13). Na druhé straně, aby byla léčba úspěšná, je z klinického pohledu nezbytné diagnostikovat onemocnění co nejdříve, tj. v době kdy depozita jsou velmi malá a svým rozložením v tkáni ojedinělá. To limituje využití hmotnostní spektrometrie v případě časných forem onemocnění, kde malé množství depozit je pod rozlišovacími limity této metody. Časná fáze onemocnění také limitují detekci amyloidu z tukové tkáně, protože onemocnění s minimálními depozity např. v ledvině, obvykle ještě nebude mít postiženou tukovou tkáň podkoží (14). Multicentrová studie zaměřená na určení typu amyloidu hmotnostní spektrometrií uvádí, že pouze v 37-55 % případů bylo možné specifikovat typ amyloidu touto metodou (15).

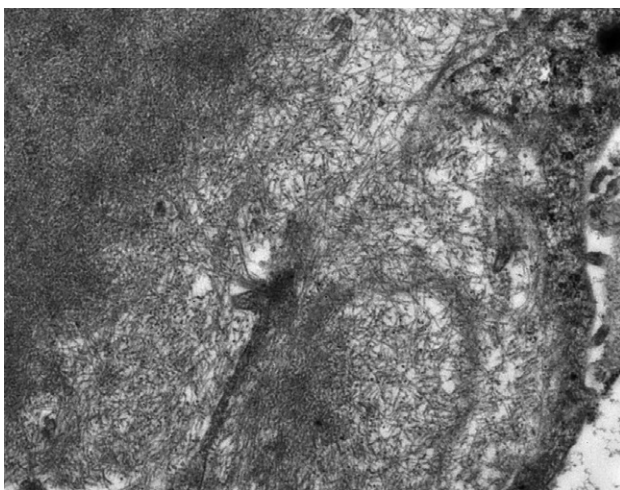
Hmotnostní spektrometrie se využívá především v případě postižení myokardu, které je v době diagnózy obvykle významné, protože se již klinicky manifestuje. *Podle současné platných doporučení nemusí být pro diagnózu transthyretinové amyloidózy provedena biopsie* (16). Algoritmus stojí na předpokladu, že nejčastějšími typy amyloidu, které postihují myokard, jsou AL a transthyretinové amyloidózy. Proto pokud má pacient klinicky vysoce pravděpodobně postižení myokardu amyloidózou, současně má negativní detekci lehkých řetězců ze séra a při použití imunofixace absenci monoklonálního proteinu v séru a v moči s tomu odpovídající scintigrafii skeletu; tak je onemocnění považováno za transthyretinovou amyloidózu a další verifikace není požadovaná (17). Pokud cokoli z předchozího není splněno, doplní se biopsie, často s hmotnostní spektrometrií. Jiná situace je v případě biopsií ledvin, kde depozita jsou často velmi malá a jejich množství je pod hranici detekce hmotnostní spektrometrií a v diagnostice včetně typizace se nejvíce uplatňuje imunofluorescence.

2c. Lokalizace a rozložení depozit neumožní určit typ amyloidu

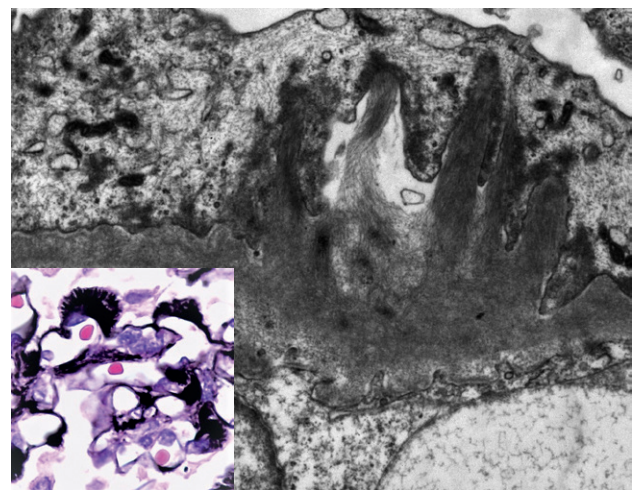
Podle *lokalizace a rozložení depozit* nelze určit, o jaký typ systémové amyloidózy se jedná. Výjimkou je v biopsiích ledvin



Obr. 21 a 22. Kongo červeň pozitivní depozita v glomerulech bez postižení cév (šipky v detailu vpravo). Morfologie amyloidu je vysoce suspektní z mutace řetězce fibrinogenu A α (potvrzeno IF a IH detekcí a také genetickým průkazem mutace).



Obr. 23. EM detail depozit amyloidu s nevětvenými náhodně orientovanými fibrilami.



24. EM. Fibrily amyloidu v ultrastruktuře procházející GBM a vytvářející morfologii tzv. kohoutího hřebínku. Tloušťka fibril amyloidu odpovídá fibrilám cytoskeletu podocyty.

pouze amyloidóza při mutaci řetězce fibrinogenu A α , při které jsou masivní depozita v glomerulech, a přitom nejsou postiženy arterioly ani jiné extraglomerulární cévy (Obr. 21, 22). Protože takové rozložení depozit se u AA ani AL amyloidu nevyskytuje, lze v těchto případech na základě morfologie vyslovit s vysokou pravděpodobností typ amyloidu. Diagnózu je nutné potvrdit imunofluorescenční nebo imunohistochemickou detekcí a následným genetickým vyšetřením.

3. Ostatní techniky detekce amyloidu

3a. Detekce amyloidu v elektronové mikroskopii

V **elektronové mikroskopii (EM)** jsou všechny typy amyloidu stejné; jde o nevětvené fibrily, které svojí tloušťkou od-

povídají fibrilám cytoskeletu podocytů (8-12 nm, Obr. 23, 24). V několika laboratořích na světě se k identifikaci typu depozit používá tzv. imuno-EM. Jde o techniku, která využívá výhod imunohistochemie (zde značení zlatem) a elektronové mikroskopie dohromady. Imuno-EM umožňuje vidět označené antigeny přesně v jejich lokalizaci (ve fibrilách). Jde o náročnou techniku, která vyžaduje jiný typ fixace a jiný typ zalévacích pryskyřic, než se běžně používá, a proto je její využití v praxi limitované. Na druhé straně *imuno-EM představuje jedinou dosud používanou techniku, která identifikuje přesně a pouze amyloidové fibrily.*

Diferenciální diagnostika onemocnění s fibrilárními depozity zahrnuje mnoho kategorií včetně diabetu, fibrilární glomerulopatie a dalších jednotek. V celém rozsahu je součástí specializace v nefropatologii.

3b. Využití biopsie tukové tkáně v diagnostice amyloidu

Přibližně sto let je známo, že AA amyloidóza pravidelně postihuje i tukovou tkáň v podkoží. Později se ukázalo, že ve stejné lokalitě jsou depozita i u AL a TTR amyloidózy. To vedlo ke snahám využít v diagnostice snadno dostupnou tukovou tkáň. Postupy, které lze použít, jsou v podstatě dva. Jedním z nich je aspirace tukové tkáně a druhým je biopsie malé kostičky (lalůčeků z excize) o hraně cca 10 milimetrů. Volba víceméně záleží na místních zvyklostech. Pro aspiraci je důležité použít jehlu „16-gauge“ a získat více než 100 mg tkáně. Senzitivita diagnózy amyloidu se u vyšetření aspirátu pohybovala v různých studiích od 50-90 %. Použití „kostky“ nebo spíše excidovaných lalůčeků tukové tkáně je pro patologa daleko jednodušší a současně diagnostická výtěžnost je vyšší, protože se vzorkem nakládá jako s každým jiným biopsickým materiálem. Vzorek lze rozdělit, polovinu do fluorescence a druhou část do parafinu pro standardní detekci Kongo červení. Hodnocení má oproti aspirátu mnoho výhod. Poskytuje totiž strukturální přehled v tkáni a patolog identifikuje nejen depozita amyloidu, ale i jejich lokalizaci, což nemalou měrou přispívá k větší diagnostické jistotě (18). Současně lze z bloku provést více řezů (nejméně by mělo být 10) a tím zvýšit záchyt drobných depozit amyloidu. Navíc na rozdíl od bloku, v aspirátu nelze spolehlivě provést další imunofluorescenční ani imunohistochemické vyšetření. Na druhé straně aspiraci lze snadno opakovat a získaný vzorek lze potom použít na jiné techniky (nyní převážně v rámci výzkumných aktivit jako např. k imunochemické analýze s měřením koncentrace amyloidogenních proteinů ELISOU s komerčně dostupným kitem, event. natrávení tuku a použití extraktu pro hmotnostní spektrometrii).

V klinické praxi nelze amyloid stanovovat procenty pravděpodobnosti, amyloid ve tkáni je nebo není; a v dalším kroku je nezbytná jeho typizace. To, že má pacient monoklonální gamapatií neznamená, že typ jeho amyloidu není hereditární. Ve věku nad 60 let má při hospitalizaci z jiných důvodů až 15-20 % populace monoklonální gamapatií. V současné době jsme první generací lékařů, která různé formy hereditárních amyloidů diagnostikuje s primomaniestací často v 5. a 6. decenniu.

Pozor je třeba dávat v případech s nodulárně formovanými depozity (to nejde v aspirátu spolehlivě posoudit), protože tato depozita mohou představovat iatrogenní ložiska amyloidu v místech aplikace léků (např. inzulínu u pacientů s diabetem). Proto je třeba klinika předem upozornit, aby se takovým místům při odběru vyhnul. Také není vhodnou lokalitou subepidermální oblast, kde mohou být depozita amyloidu, která nejsou součástí systémových onemocnění.

3c. Využití biopsie kostní dřevě v diagnostice amyloidu

Biopsie kostní dřevě představuje rutinní vyšetření u části pacientů s monoklonální gamapatií. Vedle stanovení procenta plasmatických buněk by měla být součástí vyšetření také detekce amyloidu. V případě cíleného vyšetření se amyloid prokáže v 50-60 % vzorků (19). Bez odpovídajícího barvení se amyloid často mine, protože ve většině případů bývá lokalizován ve stěně cév. Protože většina pacientů s AL amyloidózou jsou lidé s monoklo-

nální gamapatií (více než 80 %) a nikoli myelomem, detekce časných stádií amyloidózy pro ně znamená šanci na úspěšnou léčbu.

V odvápněných vzorcích není možno spolehlivě typizovat depozita amyloidu a je třeba se s klinikem domluvit na dalším postupu (např. biopsie tukové tkáně; u pacientů s proteinurií biopsie ledviny). To, že má pacient monoklonální gamapatií neznamená, že lze automaticky považovat depozita amyloidu za součást nadprodukce lehkých řetězců, a tedy za AL amyloidózu. Pacienti s hereditární i „wild-type“ transthyretinovou amyloidózou měli depozita v kostní dřevě ve 41 % a 30 % případů (20). Podobně u pacientů s AA amyloidózou byla v publikacích z 90. let identifikovaná depozita amyloidu v kostní dřevě u cca 80 % pacientů.

4. Lokalizovaná amyloidóza

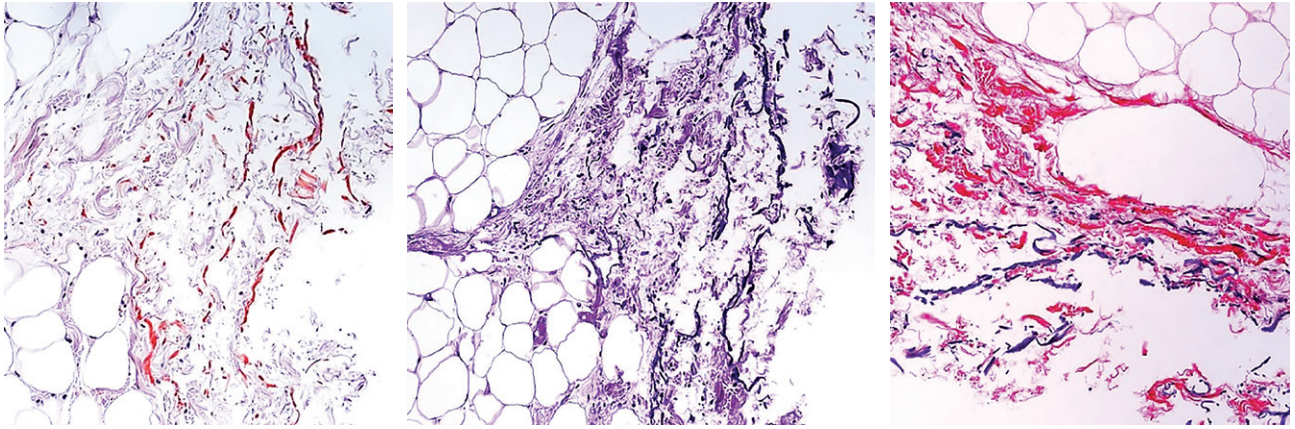
Pokud je v biopsii ložisko amyloidu a máme biopsii pouze tohoto ložiska, není patolog ten, kdo rozhoduje o tom, jestli jde o lokalizovanou nebo systémovou amyloidózu. K tomuto rozhodnutí je třeba spolupráce dalších specialistů (nefrologů, kardiologů a interpretace laboratorních výsledků). Depozita amyloidu vytvářející ložiska bývají obvykle v dýchacích nebo močových cestách, výjimečně v GIT. Většina lokalizovaných depozit je podle typizace odvozená od lehkých řetězců (AL). Pro pacienta má rozhodnutí o tom, jestli jde o lokalizovanou nebo systémovou formu zásadní význam, protože v případě lokalizované amyloidózy **bez ohledu na typizaci**, je metodou léčby sledování nebo chirurgický výkon.

Vzhledem k tomu, že odesílajícím lékařem je obvykle lékař ORL nebo jiných specializací, kde problematika amyloidu nepatří do diagnostického spektra, je nejlepší se na dalším postupu dohodnout nebo ho přímo uvést do poznámky a *doporučit postup laboratorního vyšetření* (identifikaci lehkých řetězců v séru pomocí Free light chain assaye, imunoelektroforézu séra a moči, detekci proteinurie, vyšetření myokardu, biopsie podkožního tuku atd.) a *posouzení příslušnými specialisty jiných odborností, kteří mají s danou problematikou zkušenosti*.

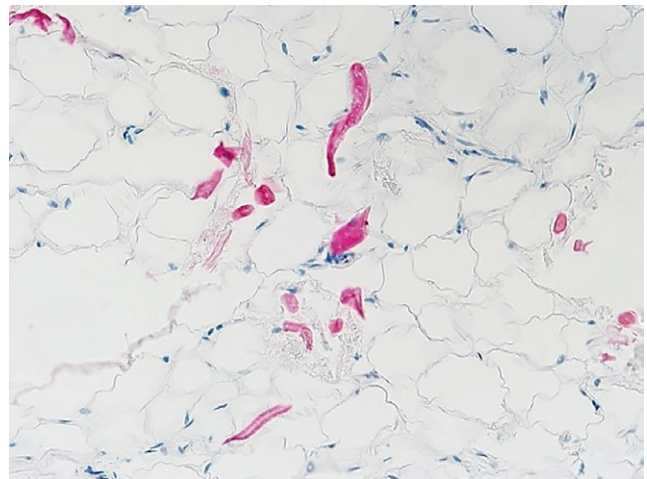
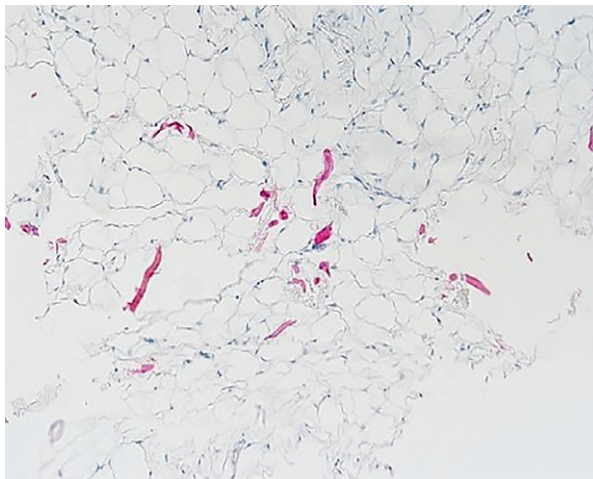
5. Nástrahy detekce amyloidu

Problémy detekce amyloidu nepředstavují pouze struktury s velkým množstvím kolagenu, jako jsou cévy a svaly, které jsou často zdrojem nejistoty při „přebarvení Kongo červení“. Na druhé straně v různých tkáních činí problémy detekce velmi malých a nečetných depozit, která lze snadno minout. V praxi se setkáváme s dalšími nástrahami detekce amyloidu.

Na prvním místě je třeba uvést **tepelně zhmžděné stopky polypů**, které jsou vždy silně pozitivní v barvení Kongo červení i saturnovou červení (21). Stejně tak elastická vlákna jsou vždy silně pozitivní v barvení Kongo červení (Obr. 25-27). V neposlední řadě mohou způsobit problémy úlomky gázy, ve kterých bývá vzorek zabalený, a které jsou vždy silně Kongo červeně pozitivní (Obr. 28, 29).



Obr. 25, 26 a 27. Diagnóza z tukové tkáně s přítomností elastických vláken v řídkém vazivu. Elastická vlákna jsou vždy pozitivní v barvení Kongo červení (vlevo). Uprostřed a vpravo stejná lokalita barvení HE s elastikou a Srel, které verifikují elastická vlákna. Proto je výhodné vyšetřovat tukovou tkáň v bioptických řezech a nikoli rozmačkanou z aspirátu, kde se struktura ztratí.



Obr. 28, 29. Úlomky gázy jsou vždy intenzivně pozitivní v Kongo červení (Kongo je konec konců textilní barvivo).

6. Terapeutické konsekvence typizace amyloidu

Různé typy amyloidóz vyžadují zcela odlišnou terapii. V posledních desetiletích jsou k dispozici terapeutické prostředky, které dramaticky ovlivňují produkci amyloidogenních proteinů nebo je dokáží stabilizovat a tím zabránit jejich ukládání.

V případě nejběžnější **AL amyloidózy** jde u většiny případů o *komplikaci monoklonální gamapatie* (většina pacientů nesplňuje kritéria pro dg. mnohotného myelomu) a standardem je omezení tvorby patologických proteinů. U méně pokročilého onemocnění je metodou léčby chemoterapie event. transplantace kmenových buněk. U pokročilých případů lze použít léčbu proteasomovými inhibitory, které navodí apoptózu, ke které jsou proliferující nádorové buňky citlivější než normální buňky. Další možností je použití imunomodulačních látek včetně monoklonálních protilátek.

U **transthyretinové amyloidózy** jsou nyní dostupné léky, které dokáží stabilizovat játry syntetizované tetramery transthyretinu a bránit jejich disociaci do monomérů, které pak

vytváří amyloidové fibrily. Některé preparáty působí u wild-type i některých variant mutovaného proteinu. Metodu volby představuje transplantace jater jako eliminace tvorby mutovaného proteinu.

Pro **AA amyloidózu** je klíčové omezit chronický zánět, který může být součástí chronických infekčních nebo autoimunitních onemocnění a také mutací ovlivňujících zánětlivé procesy. V současnosti jsou dostupné preparáty, které snižují hladinu SAA v séru blokadou receptoru interleukinu 6.

Výhodné by bylo mít preparát, který by dokázal navodit degradaci uložených fibril. Slibný výzkum v této oblasti byl bohužel před několika lety zastaven, vzhledem k nákladům a malému počtu nemocných.

ZÁVĚR

Diagnóza amyloidózy s určením typu amyloidu není jednoduchá záležitost, i když je v rukou zkušeného patologa s velmi dobrým laboratorním zázemím. Pokud se patolog zaměřený na tzv. „surgical pathology“ dostane do situace, kdy

se má k diagnóze amyloidu vyjádřit, je nejlepším a nejbezpečnějším rozhodnutím poslat vzorek na pracoviště, které má s diagnostikou a typizací amyloidu zkušenosti.

Obecně lze shrnout následující:

- „Pokud potřebuješ diagnostikovat a typizovat amyloid: **po-užij vše, s čím máš zkušenost a co ti může pomoci**“ (rada od M. Picken na semináři v Praze).
- Barvení Kongo červení by se mělo provádět vždy s kontrolou.
- Detekce amyloidu je nejcitlivější při prohlížení preparátu obarveného Kongo červení nebo saturnovou červení ve fluorescenci.
- Při detekci malých depozit je nezbytné použít při hodnocení všech dostupných metod: Kongo červeně v normálním

světle, Kongo červeně v IF spolu s další podpůrnou metodou (např. thioflavin, saturnová červeně).

- Tam, kde je klinická suspekce na amyloid, nelze z jednoho řezu amyloid vyloučit. Hodnotit by se mělo nejméně 10 řezů.
- Hodnocení by měl provádět zkušený patolog s odpovídajícím vybavením (kvalitní mikroskop s IF, polarizace s rotací, v temné místnosti).
- Chirurgická biopsie tukové tkáně podkoží umožňuje dg. amyloidu s větší jistotou než aspirát tukové tkáně, protože umožní rozpoznat strukturu.
- Nefropatologové jsou nejčastějšími diagnostiky amyloidózy; mají vybavení a zkušenosti s technikami (polarizace, imunofluorescence) a jsou proto nejvhodnějšími kandidáty pro vyšetřování takových případů.

LITERATURA

1. Quock TP, Yan T, Chang E et al. Epidemiology of AL amyloidosis: a real world study using US claim data. *Blood Adv.* 2018; 2(10):1046-1053.
2. Sethi S. and Theis JD. Pathology and diagnosis of renal non-AL amyloidosis. *J Nephrol.* 2018; 31:343-350.
3. Picken M. Current practice in amyloid detection and typing among renal pathologists. *Amyloid* 2011; 73-75.)
4. Suhr OB, Lundgren E, Westermark P. One mutation, two distinct disease variants: unravelling the impact of transthyretin amyloid fibril composition. *J Intern Med.* 2017; 337-347.
5. Bowen K, Shah N, Lewin M. AL-Amyloidosis Presenting with Negative Congo Red Staining in the Setting of High Clinical Suspicion: A Case Report. *Case Reports in Nephrology.* 2012; doi:10.1155/2012/593460
6. Alexander MP, Dasari S, Vrana JA et al. Congoophilic Fibrillary Glomerulonephritis: A Case Series. *Am J Kidney Dis.* 2018; 72:325-336.
7. Howie A, Brewer DB. Optical properties of amyloid stained by Congo red: history and mechanisms. *Micron.* 2009; 40:285-301.
8. Howie A, Owen-Casey MP. Discrepancies between descriptions and illustrations of colours in Congo red-stained amyloid, and explanation of discrepant colours. *Amyloid* 2010; 17:109-117.
9. El-Meanawy A, Mueller C & Iczkowski KA. Improving sensitivity of amyloid detection by Congo red stain by using polarizing microscope and avoiding pitfalls. *Diagnostic Pathology.* 2019; 14:57 <https://doi.org/10.1186/s13000-019-0822-4>
10. Picken MM. Amyloid and related diseases. Chapter 19 (Options for Amyloid Typing in Renal Pathology). 2012;239-248.
11. Von Hutten H, Mihatsch M, Röcken C. Prevalence and origin of amyloid in kidney biopsies. *Am J Surg Pathol.* 2009; 33(8):1198-205.
12. Bauerová L, Honsová E, Ryšavá R. Systémové amyloidózy v biopsiích ledvin. *Cesk Patol.* 2009; 45(3):64-68.
13. Mollee P, Boros S, Loo D, Ruelcke JE, Lakis VA, Cao KL, et al. Implementation and evaluation of amyloidosis subtyping by laser-capture microdissection and tandem mass spectrometry. *Clin Proteomics.* 2016 Oct; 13(1): 30.
14. Westermark P. Amyloid diagnosis, subcutaneous adipose tissue, immunohistochemistry and mass spectrometry. *Amyloid* 2011; 18(4):175-176.
15. Linke R. On typing amyloidosis using immunohistochemistry. Detailed illustrations, review and a note on mass spectrometry. *Prog Histochem Cytochem.* 2012; 47(2):61-132.
16. Gillmore JD, Maurer MS, Falk RH, Merlini G, Damy T, Dispenzieri A, et al. Nonbiopsy diagnosis of cardiac transthyretin amyloidosis. *Circulation.* 2016; 133(24): 2404-12.
17. Brouwers S, Laptseva N, Gerber B et al. Cardiac amyloidosis. *Cardiovascular Med.* 2018; 211(11):282-289.
18. Picken M, Westermark P. Amyloid detection and typing: summary of current practice and recommendations of the consensus group. *Amyloid.* 2011; 18 Suppl 1:48-50.
19. Wisniowski B and Wechalekar A. Confirming the diagnosis of amyloidosis. *Acta Haematol.* 2020;143:312-321.
20. Fine NM, Arruda-Olson AM, Dispenzieri A et al. Yield of noncardiac biopsy for the diagnosis of transthyretin cardiac amyloidosis. *Am J Cardiol.* 2014;113(10):1723-1727.
21. Fernandez-Flores A. Positive staining with Congo red in tissues with heat artifact due to cautery. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2009; 50:203-206.

Za podporu vydání doporučeného postupu děkujeme společnosti:

