

Vesebiopszia proteinúriában

Nadasdy Tibor

The Ohio State University, Columbus, OH

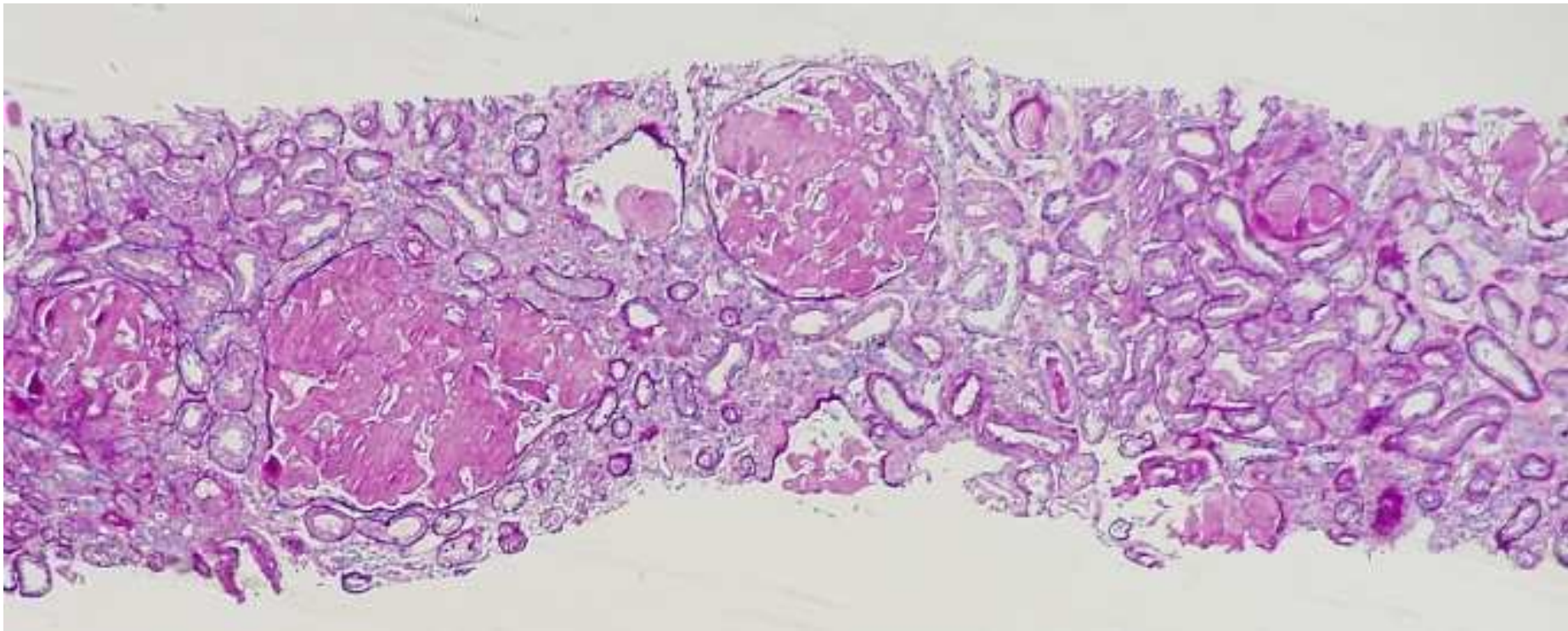
USA

ESETISMERTETÉS

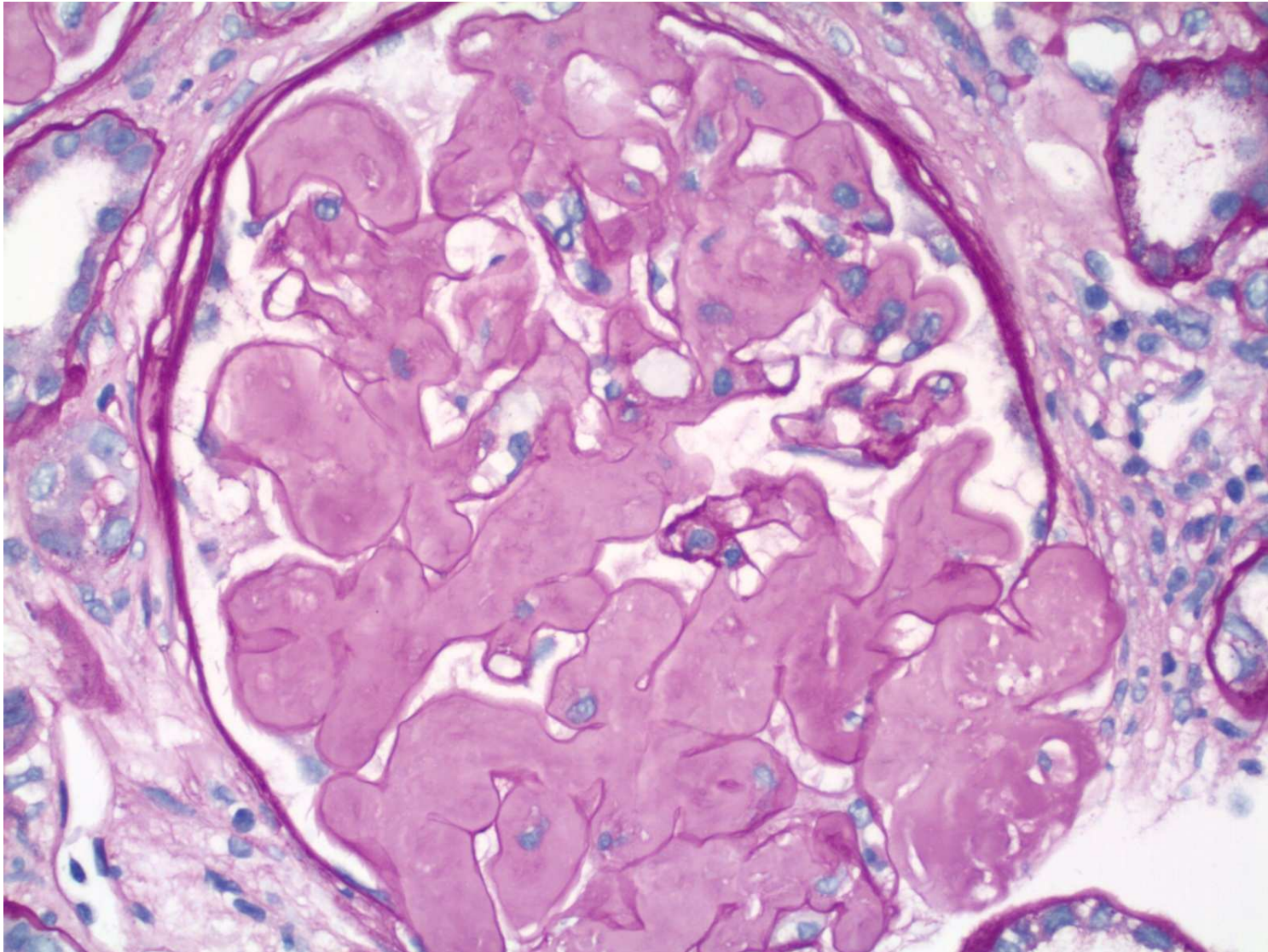
- 61 éves enyhén túlsúlyos beteg
 - kórelőzményében:
 - hipertónia, oszteoarthritisz, III. stádiumú krónikus veseelégtelenség
- évek óta fokozatosan súlyosbodó proteinúria
 - 2005: 0.6 g/nap
 - 2008 május: 1.6 g/nap
 - 2009 május: 3.6 g/nap
- szérum-kreatinin stabil értéken: 1.4 mg/dl (123 μ mol/L)

ESETISMERTETÉS

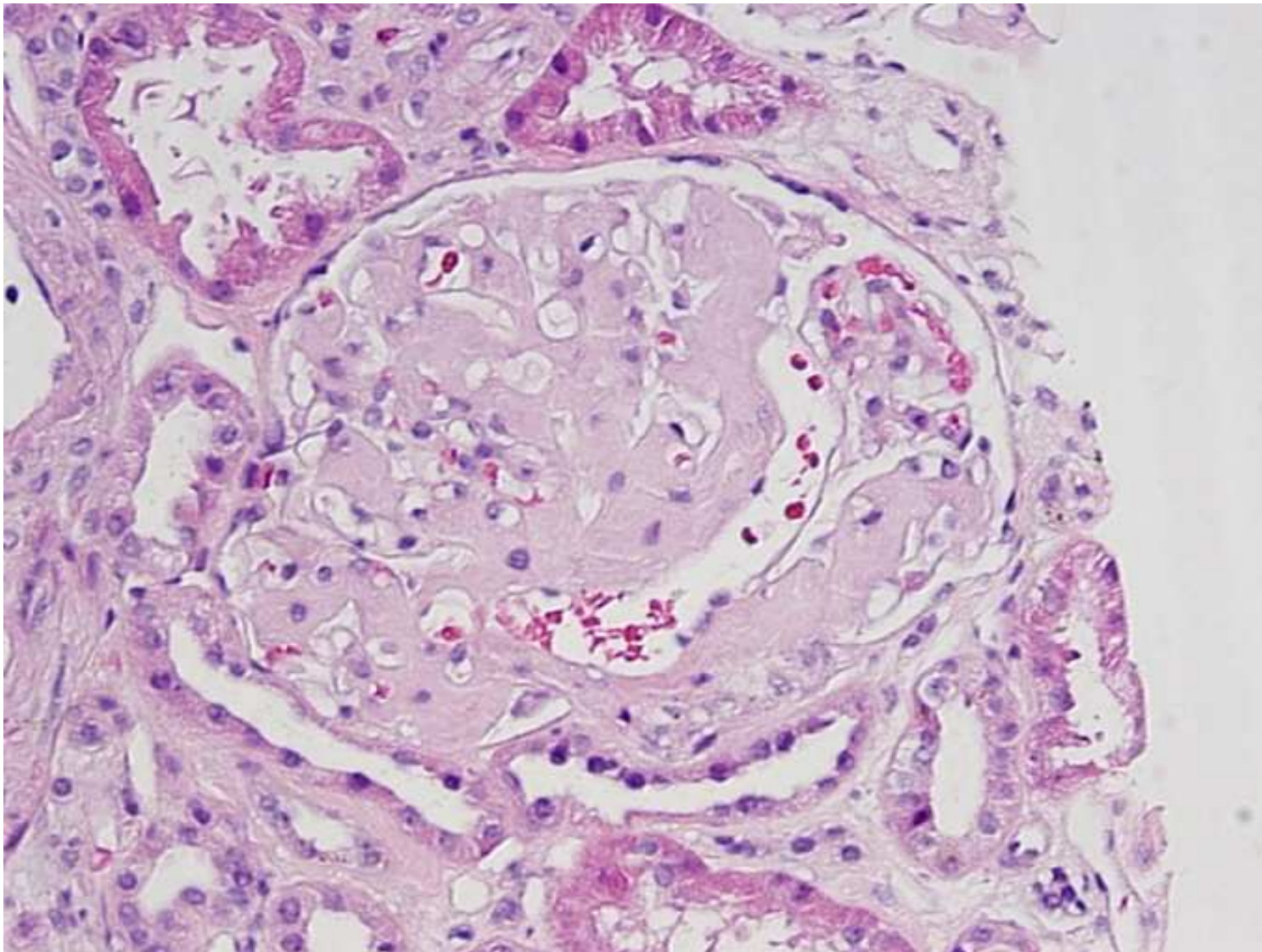
- Szerológiai próbák (ANA, hepatitis, ANCA) negatívak, szérum komplement szintek normálisak, vérnyomása jól kontrollált
- Szérum és vizelet immunofixáció nem mutatott monoklonális immunglobulint
- A beteg három anyai nagynénjének végstádiumú veseelégtelensége alakult ki
- Vesebiopszia történt 2009. július 7-én



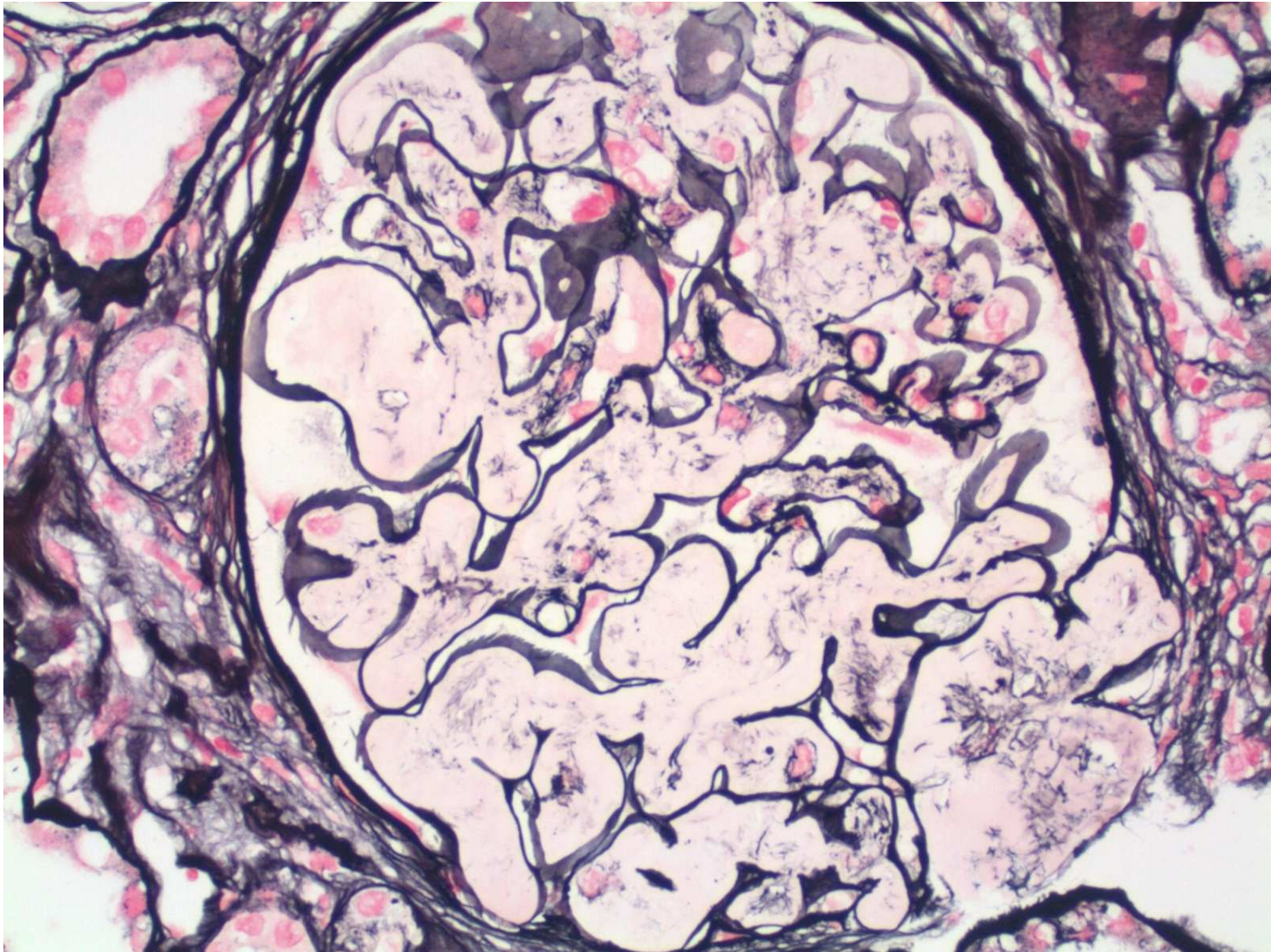
PAS: Megnagyobbodott, enyhén PAS pozitív anyaggal obliterált glomerulusok,
Enyhe intersticiális fibrózis



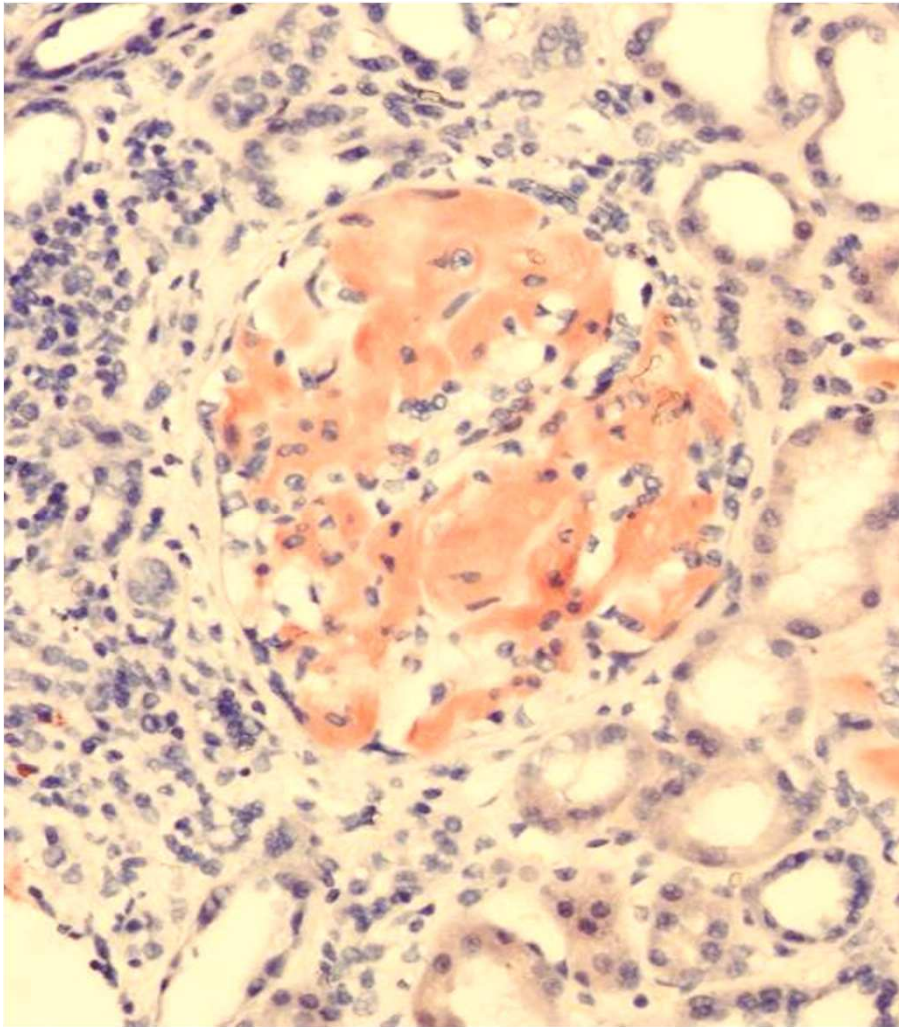
A lerakódott anyag kevésbé PAS pozitív, mint a glomeruláris bazál membránok



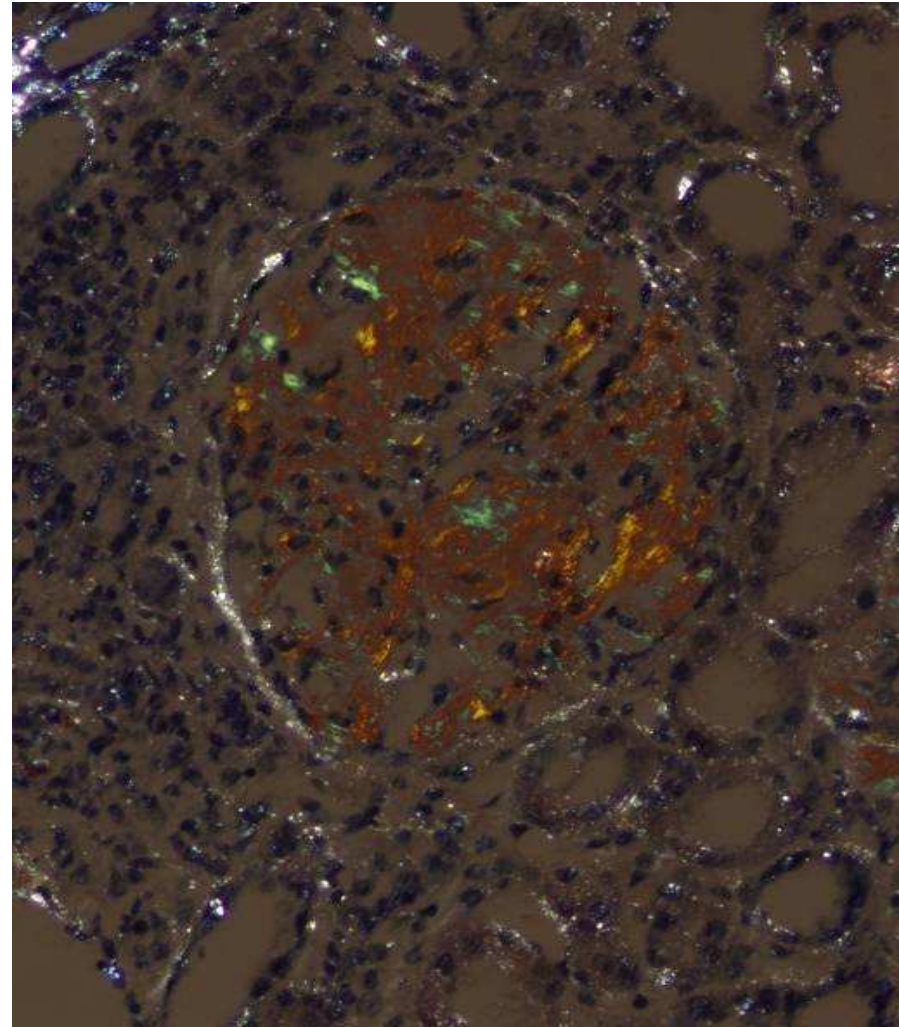
H&E: A glomerulusokban lerakódott anyag csak gyengén eozinofil



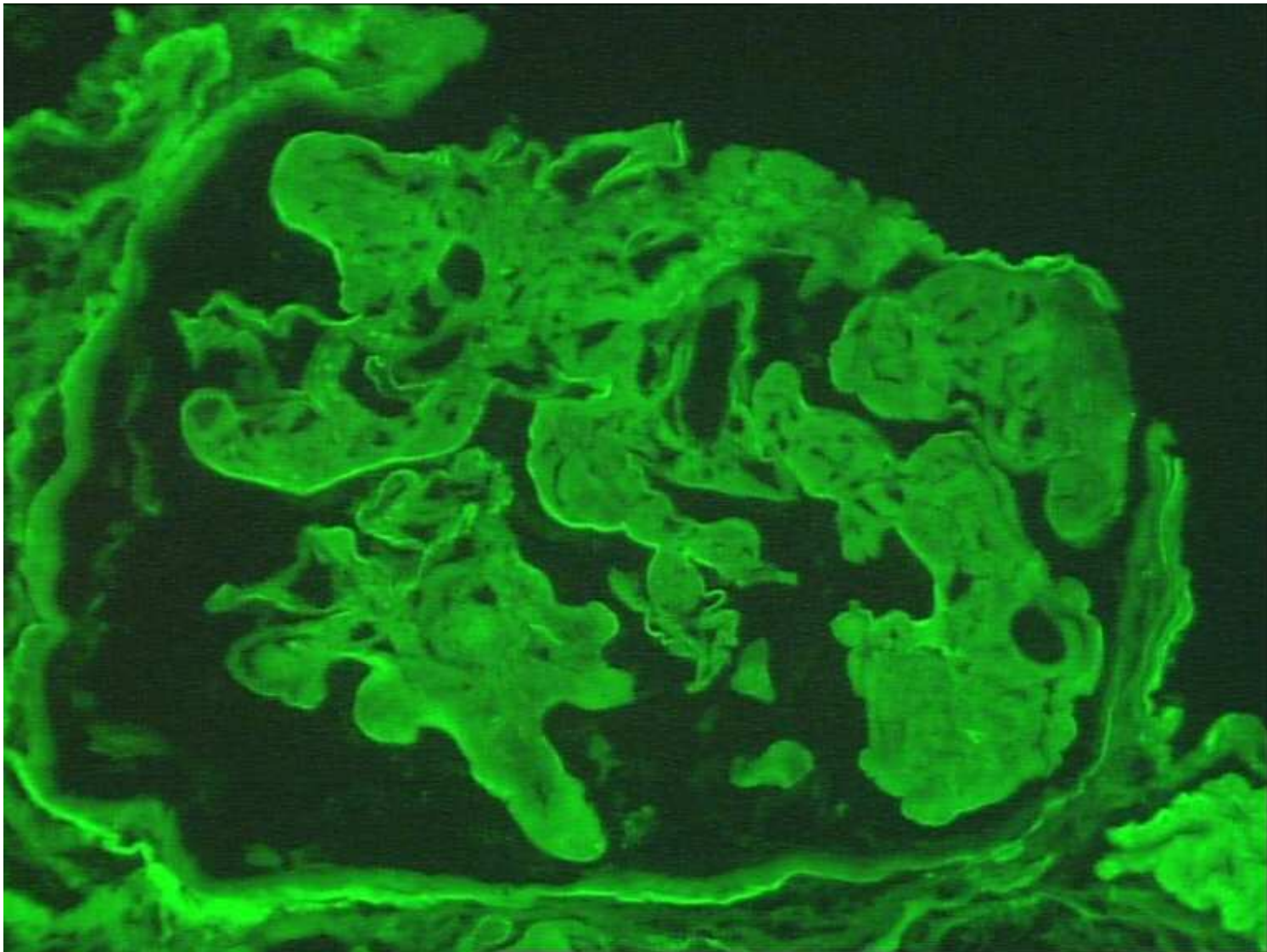
Jones-féle ezüst-methenamin reakció negatív a lerakódott anyagban



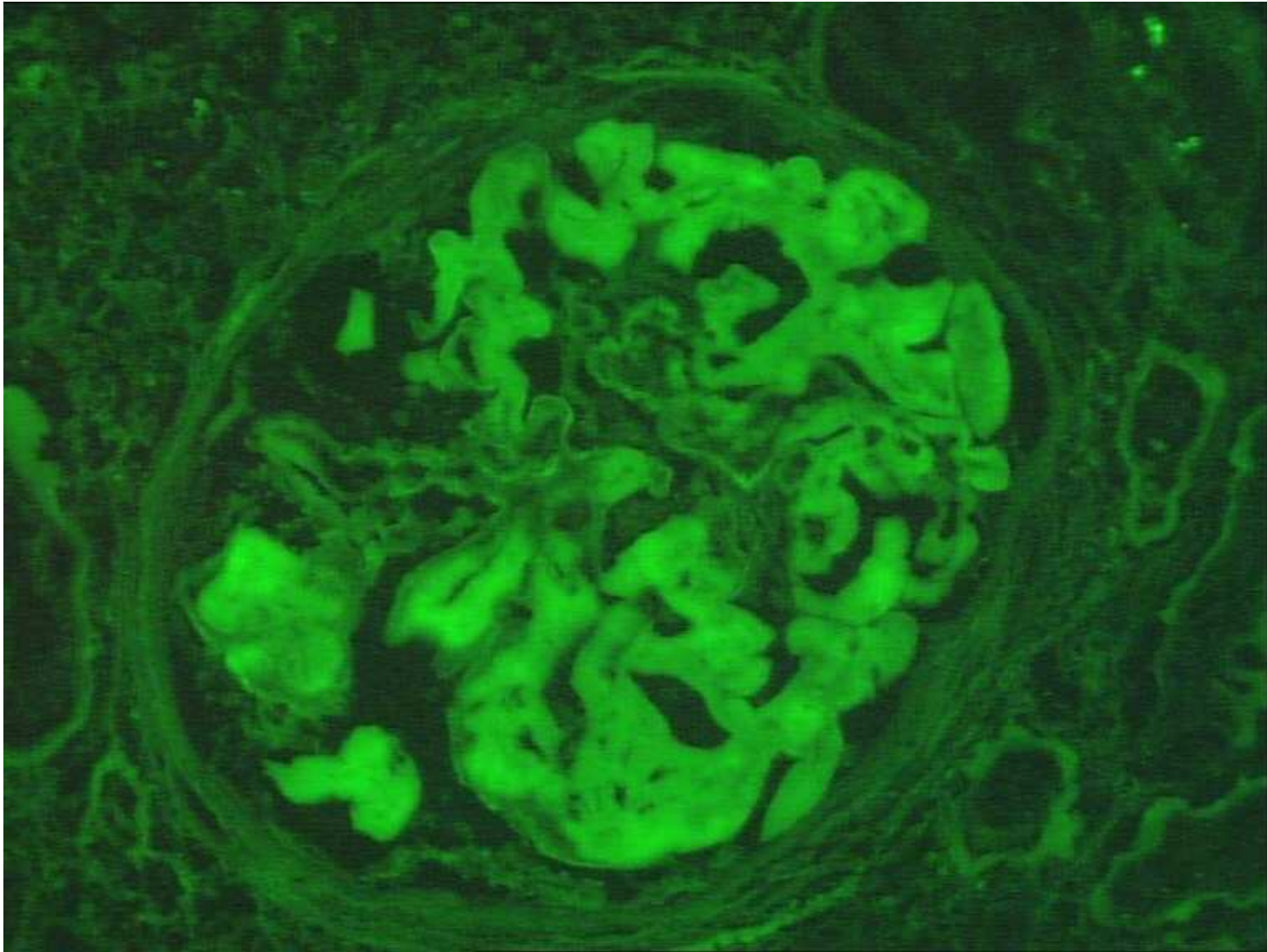
Kongóvörös



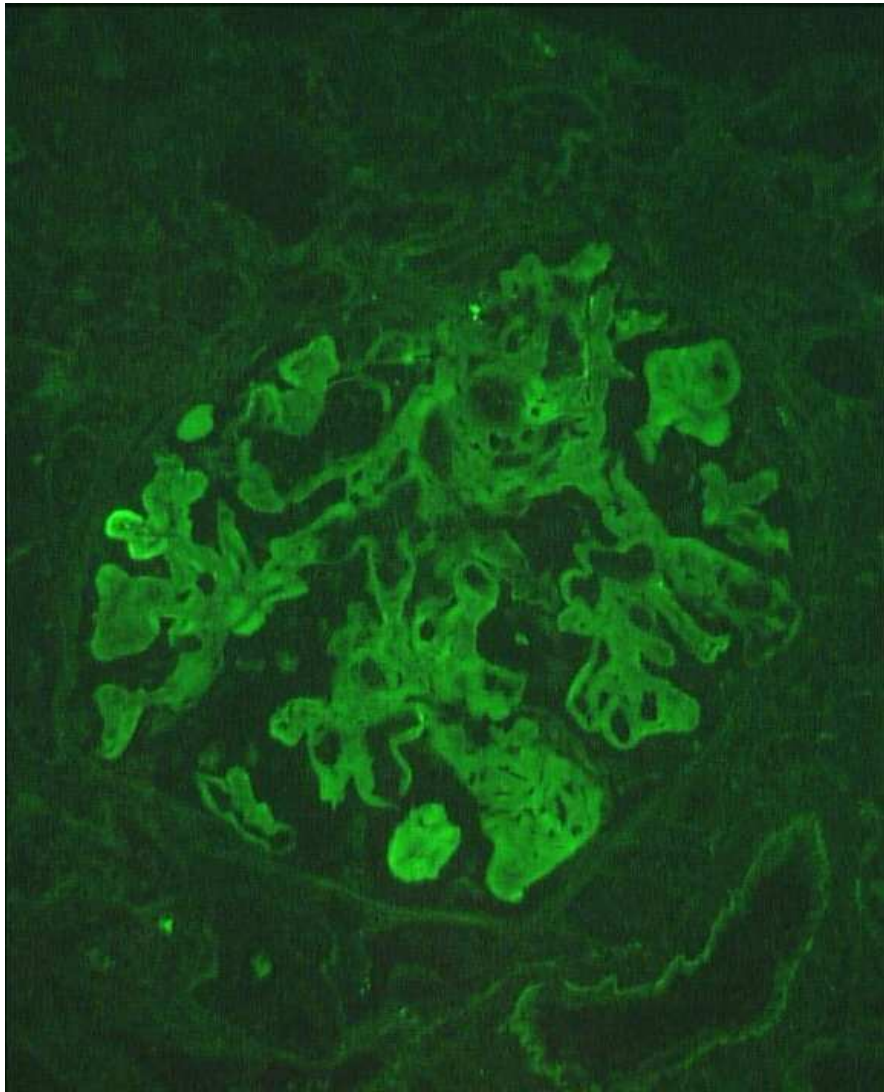
Kongóvörös polarizált fényben
"almazöld" kettős törés



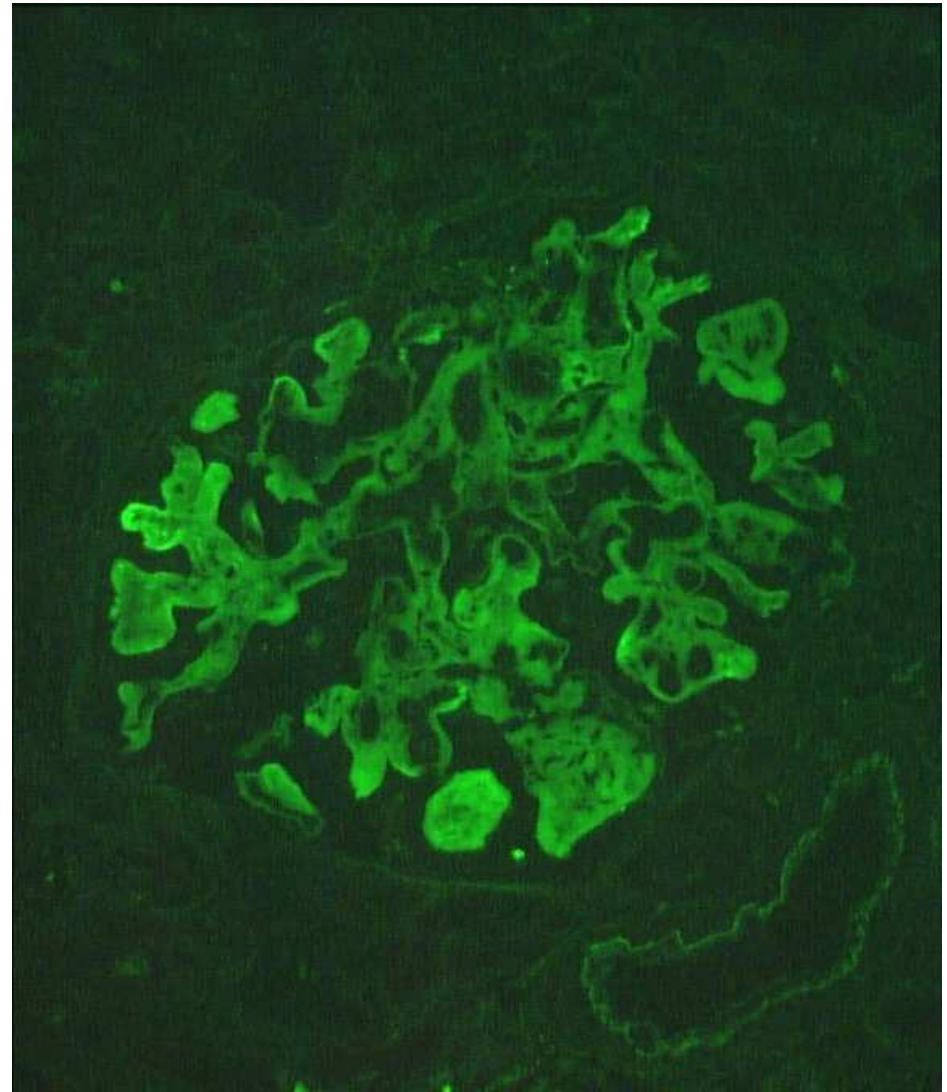
Direkt IF: albumin



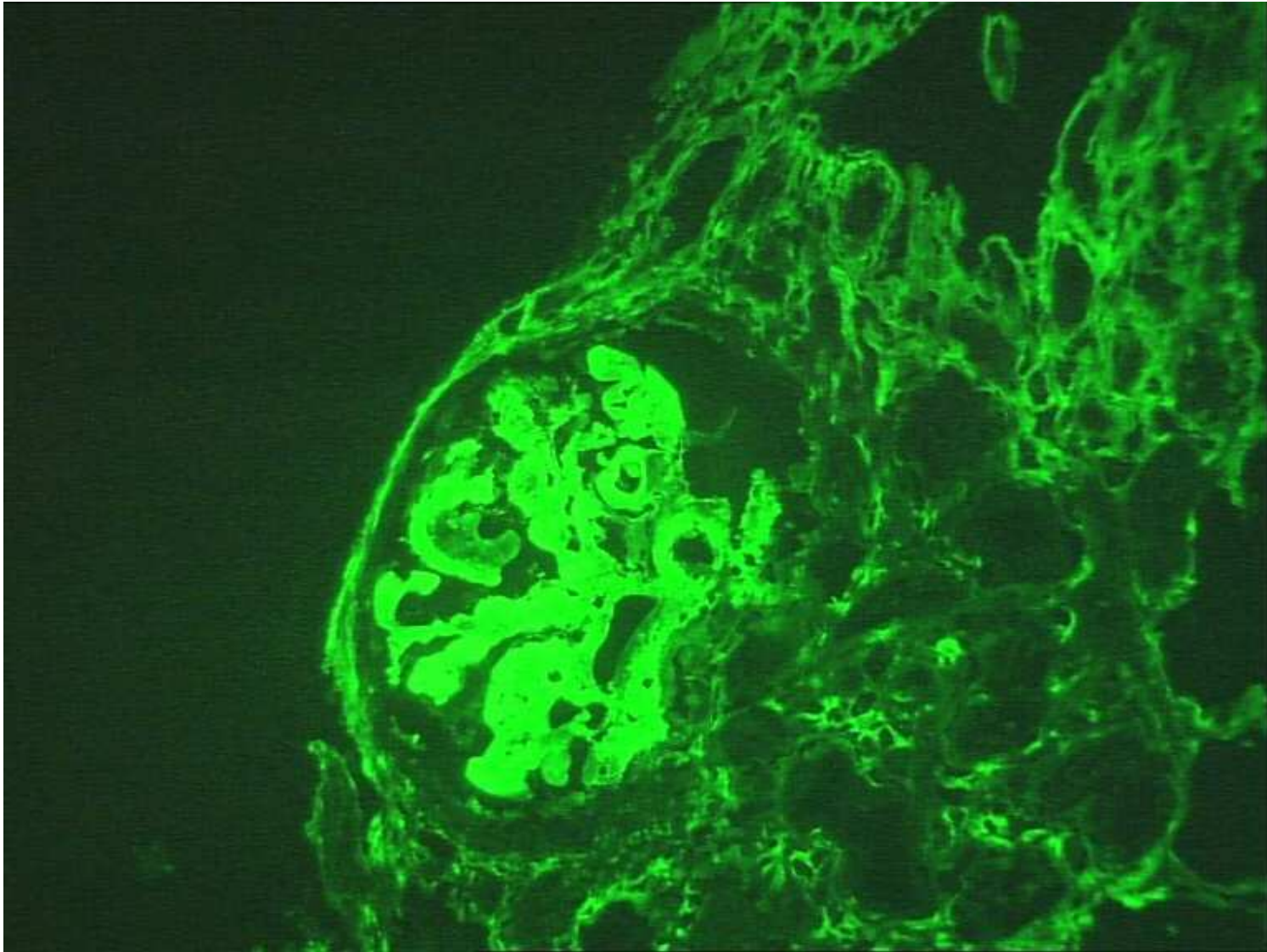
IgG



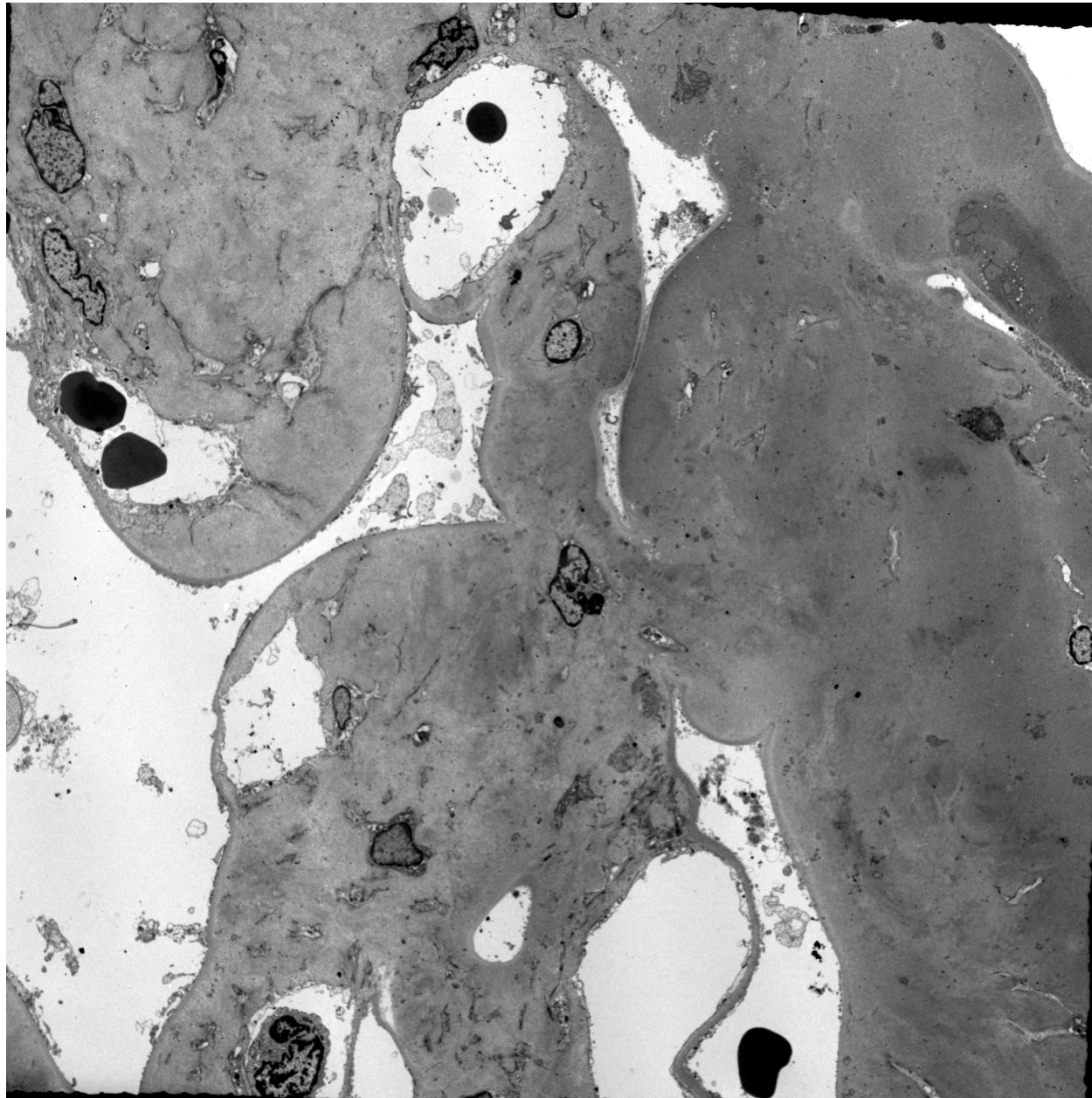
Kappa



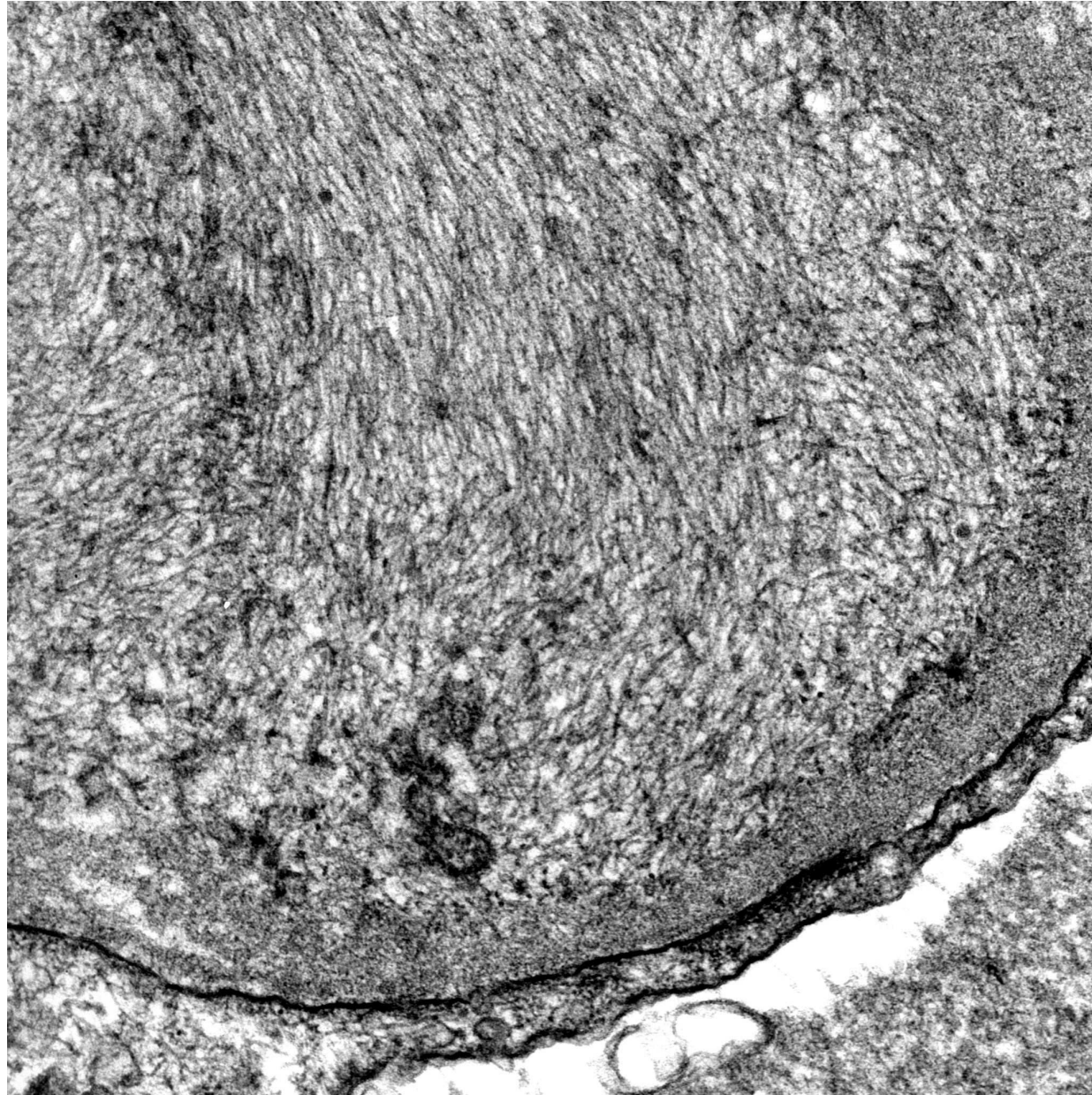
Lambda valamivel erősebb



Fibrinogén



Elektronmikroszkópia kihozza a masszív glomeruláris depozitumokat



Nagy nagyítással felismerhető a fibrilláris szubstruktúra a depzítumokban

Diagnózis

- Ideiglenes diagnózis
 - szokatlan, valószínűleg familiáris amiloidózis
- Tömegspektrometriás vizsgálat
 - amiloid depozitumok „fibrinogén A α ”-t tartalmaznak
- Végleges diagnózis
 - familiáris fibrinogén A α amiloidózis

Utánkövetés

- Genetikai vizsgálatok bizonyították, hogy a betegnek mutációja van a „fibrinogén A α ” génben (Glu526Val)
- Hematológia
 - negatív
- Súlyosbodó proteinúria
 - 6-8g/24h
- A beteget 2011. április 21-e óta dializálják

Fibrinogén A α amiloidózis

- Először 1993-ban írták le
- Génmutáció eredménye
 - az abnormális fibrinogént a máj termeli
- Valószínűleg gyakoribb, mint gondoljuk
 - leggyakoribb familiáris amiloidózis
- A legtöbbször a betegek 50-60-as éveiben manifesztálódnak a tünetek
- A legtöbb betegnél vesebetegség dominál proteinúriával
- Kardiovaszkuláris amiloid is előfordulhat
- A lép gyakran involvált
 - nem okoz klinikailag jelentős tüneteket
- Nem mindig egyértelmű a családi halmozódás

Fibrinogén A α amiloidózis kezelése

- Szimultán máj- és vese transzplantáció
 - Stangou et al: Blood 115:2998, 2010
 - 9-ből 6 beteg jól van (33-155 hónap után)
- Csak vese transzplantáció
 - Gillmore et al JASN 20:444, 2009
 - 19 Tx veséből 12 vese működik (1-12 év után)
 - 3 vese elveszett rekurráló amiloidózis miatt
- A vita nem eldöntött
 - valószínű, hogy olyan betegeknél, akiknek csak izolált vesebetegségük van a vese transzplantáció elégséges
 - nem kell feltétlenül “elpazarolni” egy egészséges májat

Amiloid

- Extracellulárisan abnormálisan lerakódó, kongóvörös pozitív anyag, fibrilláris ultrastruktúrával
- A normális α -helikális konfiguráció helyett, általában mutáció miatt, a fehérje struktúra megváltozik és egy úgynevezett „ β -pleated” konfigurációt vesz fel, amely inszolubilis proteint létrehozva lerakódik a különböző szövetekben
- Ma már legalább 25 különféle fehérjét találtak, amelyek amiloidot képesek formálni

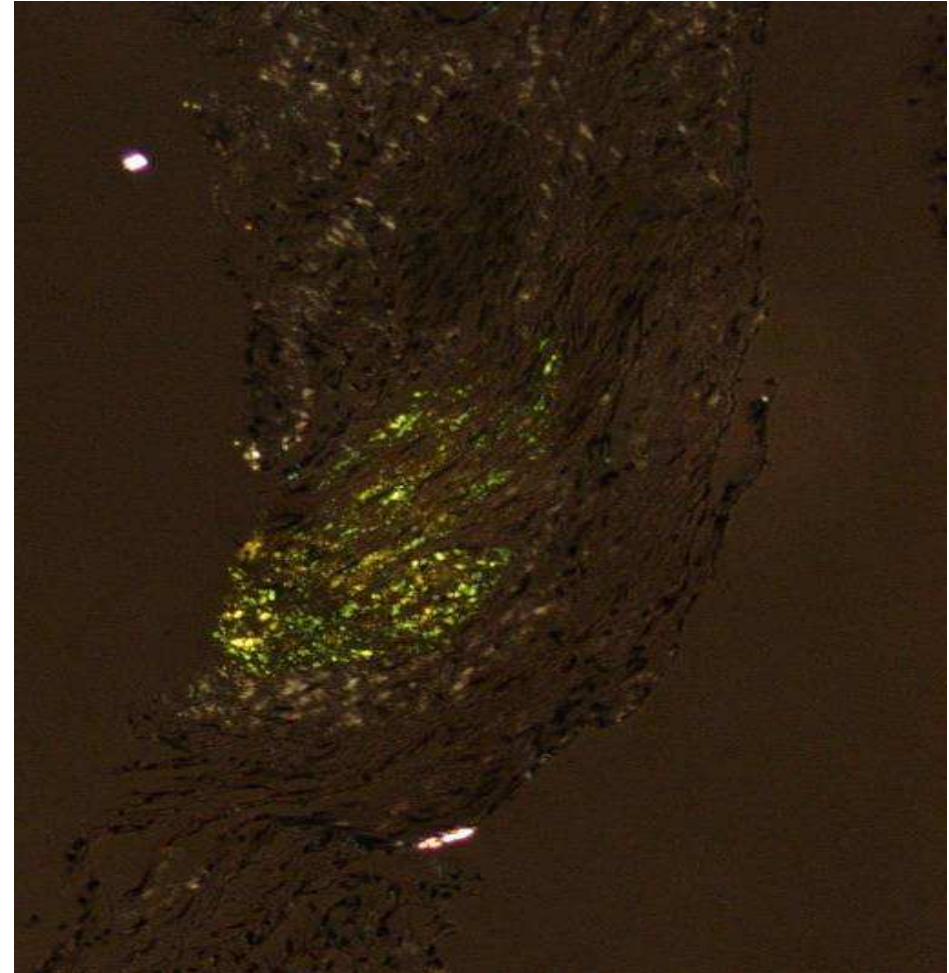
Amiloid diagnóza

- Szerv biopszia
 - vese, szív, máj, bél, nyelv, bőr, csontvelő
- Zsír biopszia (fat pad biopsy)
 - egyszerű, 85%-os specificitás (szerintem alacsonyabb)
- A diagnózis sokszor “véletlen”
 - klinikailag nem gondoltak rá
- Kongóvrös festést kell kérni, ha a szövettani metszetben
 - homogén extracelluláris depozitumok vannak
 - a betegnek monoklonális gammopátiája, krónikus gyulladós betegsége vagy akármilyen amiloidra gyanús tünete (proteinúria, krónikus hasmenés, restriktív kardiomiopátia, ortosztatikus hipotenzió, stb.) van.

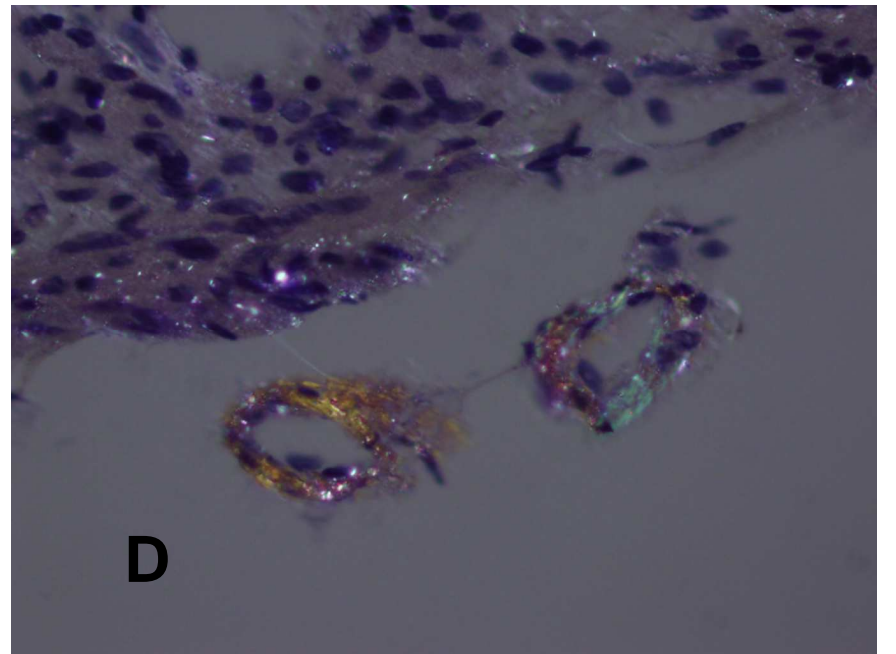
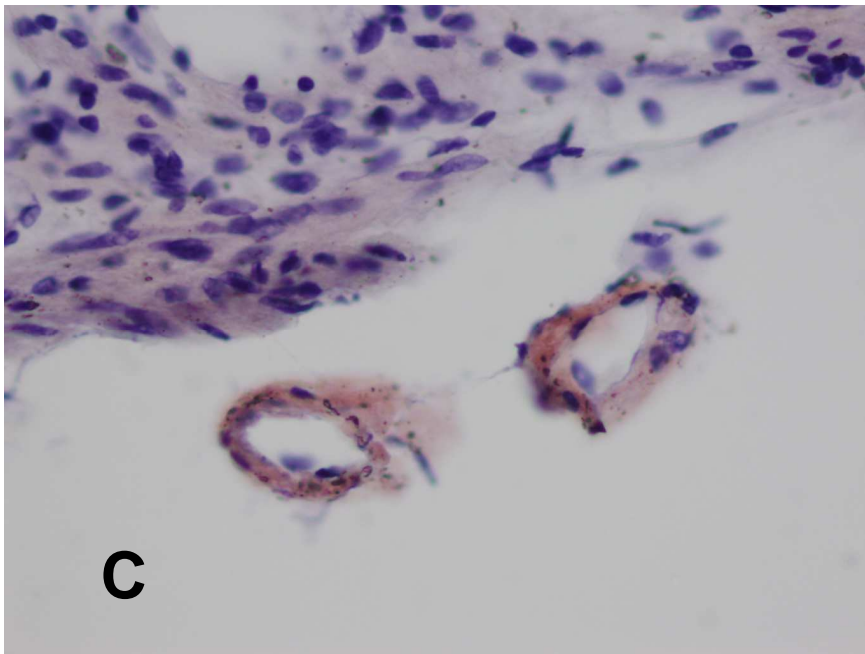
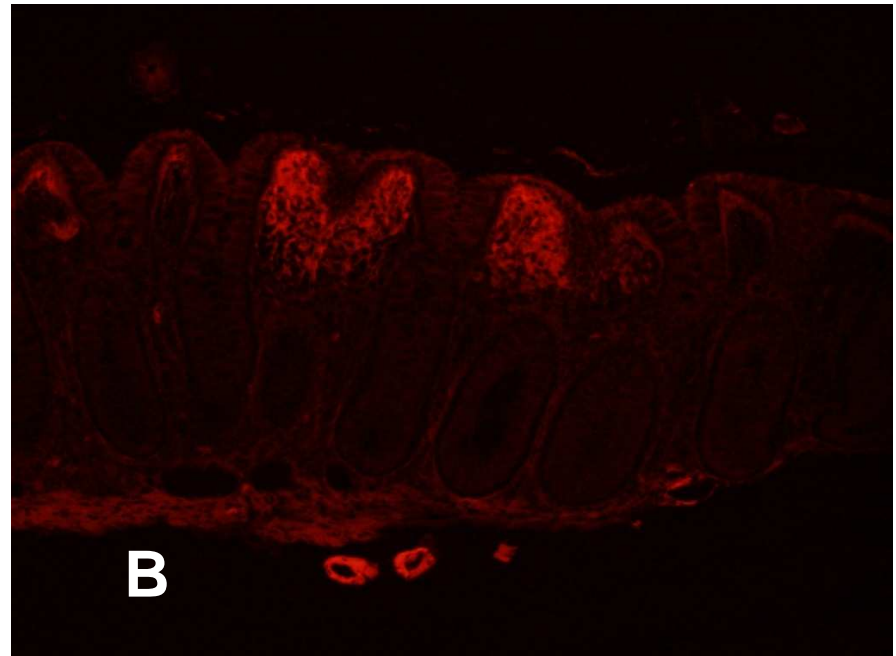
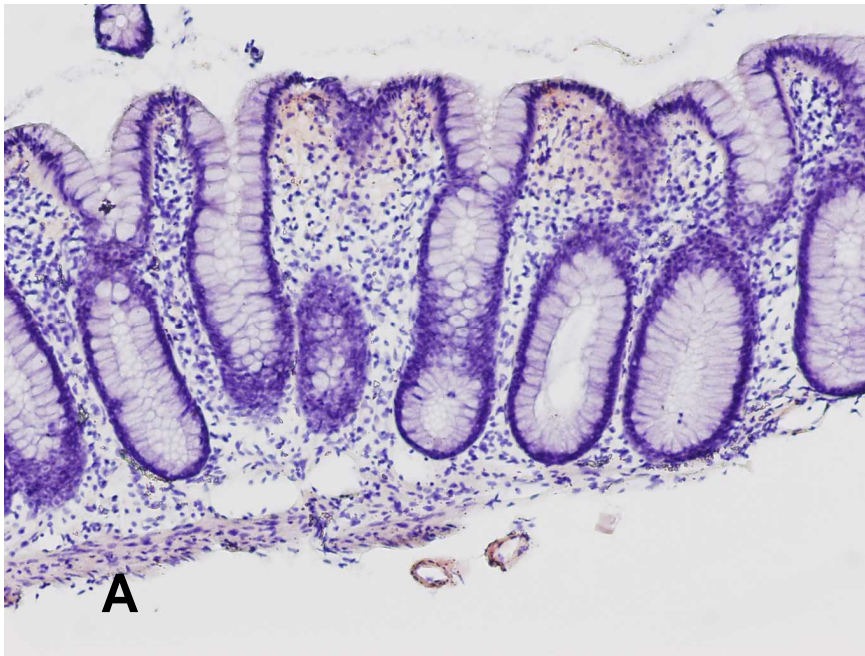
Az amiloid diagnóza

- **A kongóvörös festést 8-10 µm vastag metszeten kell elvégezni**
 - igazi specifikus pozitív festődés esetén, a polarizációs mikroszkóp alatt, a pozitív területek almazöld kettőstörést mutatnak a polarizáló filter körkörös mozgása közben
 - A mikroszkópból a szűrőket ell kell távolítani és maximális fényintenzitást kell használni
- **Nagyon fokális vagy enyhe Kongó-vörös festést könnyebb észrevenni, ha a metszetet fluoreszcens mikroszkópba tesszük**
 - élénk vörös fluoreszcenciát látunk (ez a specificitást nem, csak a szenzitivitást fokozza)
- **Elektron-mikroszkópiával 8-10 nm átmérőjű (néha lehet 7-12 nm), random orientációjú, egyenes fibrillumokat látunk**

Viszonylag enyhe amiloid depozíciót könnyű elnézni



Fokális kongóvörös pozitív amiloid depozitum látható a perirenális szövetben
(magában a vesebiopsziában nem volt amiloid)



Kongóvörös festés bélbiopsziában, viszonylag enyhe amiloid depozitumokkal.

A és C: rutin fénymikroszkóp

B: IF mikroszkóp

D: fénymikroszkóp polarizációval

Alternatív amiloid festések

- Thioflavin T vagy S
 - szenzitívebb, de kevésbé specifikus, mint a kongóvörös
- Kristályibolya
- Szíriuszvörös F3B
- Amiloid-P fehérje
 - immunfestés

Types of amyloid

Amyloid type	Fibril protein precursor	Systemic (S) or localized (L)	
Abbreviations: A β PP, A β protein precursor; apoA-I, apolipoprotein A-I; apoA-II, apolipoprotein A-II; β 2M, β 2-microglobulin; Ig, immunoglobulin; SSA, senile systemic amyloidosis; TTR, transthyretin.			
AL	Monoclonal Ig light chains	S or L	Amyloidosis associated with monoclonal plasma cell dyscrasias
AH	Monoclonal Ig heavy chains	S or L	Amyloidosis associated with monoclonal plasma cell dyscrasias
AA	Serum amyloid A protein	S	Reactive systemic amyloidosis associated with chronic inflammatory diseases
A β 2M	β 2M	S	Amyloidosis associated with long-term hemodialysis
ATTR	Genetically variant TTR Wild type TTR	S S	Familial (autosomal dominant) amyloid polyneuropathy SSA
ACys	Genetically variant cystatin	S	Hereditary cerebral hemorrhage with cerebral and systemic amyloidosis
AGe	Genetically variant gelsolin	S	Familial autosomal dominant systemic amyloidosis Predominant cranial nerve involvement with lattice corneal dystrophy
ALys	Genetically variant lysozyme	S	Familial autosomal dominant systemic amyloidosis Non-neuropathic with prominent visceral involvement
AApoAI	Genetically variant apoA-I	S	Familial autosomal dominant systemic amyloidosis Predominantly non-neuropathic with prominent visceral involvement
AApoAII	Genetically variant apoA-II	S	Familial autosomal dominant systemic amyloidosis Non-neuropathic with prominent renal involvement
AFib	Genetically variant fibrinogen A α -chain	S	Familial autosomal dominant systemic amyloidosis Non-neuropathic with prominent renal involvement
ALECT2	Leukocyte chemotactic factor 2	L	Acquired renal amyloidosis
AMed	Lactadherin	L	Age-related amyloidosis localized to the aortic media
AANF	Atrial natriuretic factor	L	Amyloidosis localized to the cardiac atria Mainly occurs in patients with atrial fibrillation
Acal	(Pro)calcitonin	L	Occurs in C-cell thyroid tumors
APrP	Prion protein	L	Spongiform encephalopathy
AIAPP	Islet amyloid polypeptide	L	Amyloidosis involving islets of Langerhans
ALac	Lactoferrin	L	Familial amyloidosis involving the cornea
A β	A β PP	L	Amyloidosis associated with Alzheimer disease, aging

Types of systemic amyloidosis

Amyloid type	Fibril protein precursor	Systemic (S) or localized (L)	Clinical syndrome
AL	Monoclonal Ig light chains	S	Amyloidosis associated with monoclonal plasma cell dyscrasias
AH	Monoclonal Ig heavy chains	S	Amyloidosis associated with monoclonal plasma cell dyscrasias
AA	Serum amyloid A protein	S	Reactive systemic amyloidosis associated with chronic inflammatory diseases
ATTR	Genetically variant TTR Wild type TTR	S	Familial (autosomal dominant) amyloid polyneuropathy SSA
ACys	Genetically variant cystatin	S	Hereditary cerebral hemorrhage with cerebral and systemic amyloidosis
AGe	Genetically variant gelsolin	S	Familial autosomal dominant systemic amyloidosis Predominant cranial nerve involvement with lattice corneal dystrophy
ALys	Genetically variant lysozyme	S	Familial autosomal dominant systemic amyloidosis Non-neuropathic with prominent visceral involvement
AApoAI	Genetically variant apoA-I	S	Familial autosomal dominant systemic amyloidosis Predominantly non-neuropathic with prominent visceral involvement
AApoAII	Genetically variant apoA-II	S	Familial autosomal dominant systemic amyloidosis Non-neuropathic with prominent renal involvement
AFib	Genetically variant fibrinogen A α -chain	S	Familial autosomal dominant systemic amyloidosis Non-neuropathic with prominent renal involvement

Common patterns of amyloid deposition in systemic amyloidosis*

Site of Involvement	AL	AA	ATTR	SSA	AApoI	AApoII	ALys	AFib	A β 2M
Kidney	+++	+++	+	-	++	++	+++	+++	-
Heart	+++	+	+++	+++	++	+	(+)	+	(+)
Peripheral nervous system	++	-	+++	+	+	-	-	-	-
Autonomic nervous system	++	++	+++	-	-	-	-	-	-
Liver	++	++	-	-	++	-	++	+	(+)
Spleen	+	++	-	-	++	-	+	+	(+)
Skin	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gastrointestinal tract	++	+	-	-	-	-	++	-	--
Musculoskeletal system	++	-	(+)	-	-	-	-	-	+++
Thyroid	+	+	-	-	-	-	-	-	(+)
Adrenal glands	+	+	-	-	-	-	-	-	(+)
Eyes	-	-	++	-	-	-	-	-	-
Testis	(+)	-	-	-	++	-	-	-	-
Tongue	+++	(+)	-	-	-	-	-	-	-
Factor X deficiency	+	-	-	-	-	-	-	-	-

* These patterns may be variable and cannot be considered diagnostic

Amiloidózis kezelése (példák)

- AL (és AH):
 - hematopoietikus őssejt-transzplantáció
 - kemoterápia
- AA: a kiváltó betegséget kell kezelni
 - colchicine
 - gyulladásgátlók (pl.: anti-IL-1R, anti-TNF α)
 - experimentális gyógyszerek
 - Eprodisate (megakadályozza a fibrillumok kialakulását – több fajta amiloidózisban is beválhat)
- ATTR (transthyretin):
 - máj vagy máj és szív transzplantáció
- Egyéb genetikus formák
 - A fő célszerv (pl. vese) transzplantációja (pl. fibrinogen A α amiloidózis) esetleg májátültetéssel kombinálva

Az amiloidózis diagnózisa önmagában
nem elegendő

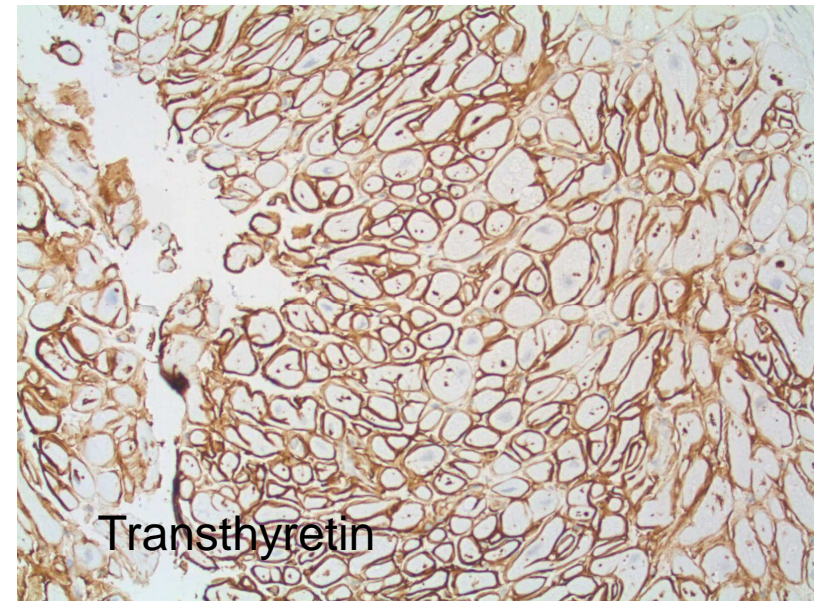
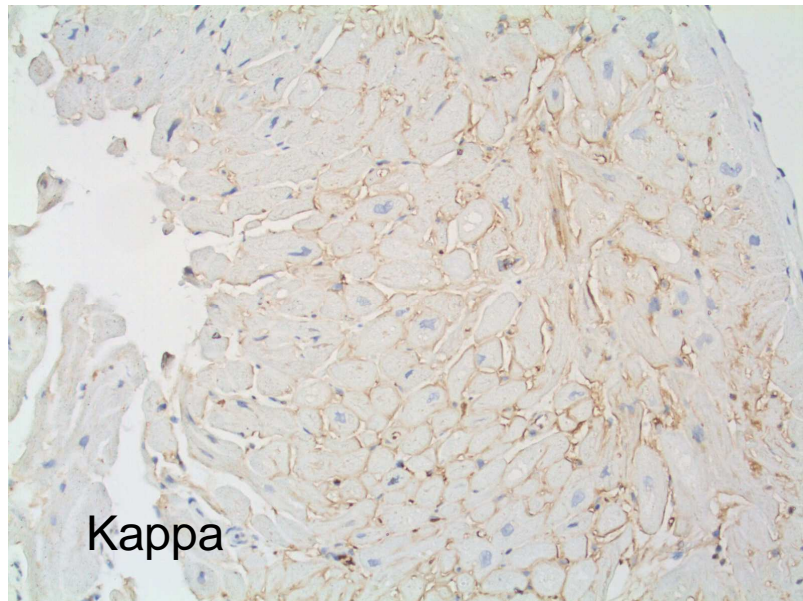
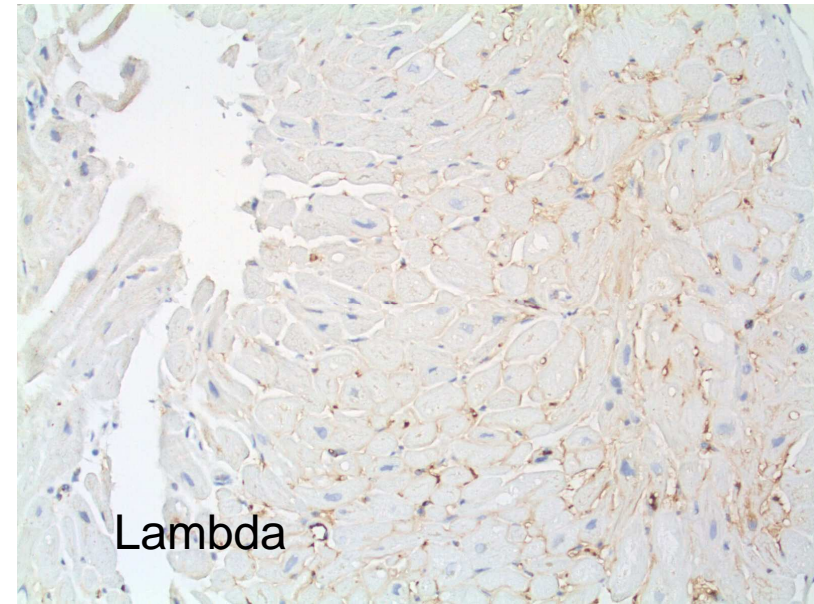
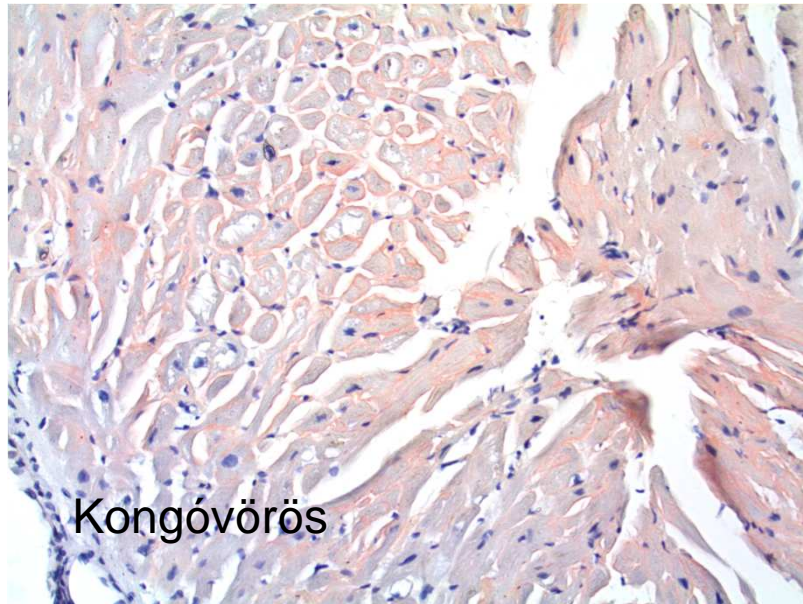
Az amiloidózis típusát is meg kell
határozni

Nehézségek az amiloid típusok diagnosztikájában

- Az immunhisztokémiai diagnózis gyakran ad álpozitív, esetleg álnegatív eredményt
- Az amiloid “ragadós”
 - *In vivo* sok egyéb anyagot, pl. szérum fehérjéket (transthyretin, immunoglobulinok), glikoproteineket köthet meg
- Sokszor az immunhisztokémia során az ellenanyagok az amiloidhoz nem specifikusan kötődnek
- A konvencionális ellenanyagok nem mindig ismerik fel a mutáns könnyűláncot (immunoglobulint)

Szívbiopszia egy betegből AL (lambda könnyű lánc) amiloidózissal

A lambda immunfestés álnegatív, a transthyretin immunfestés álpozitív



Példák a téves diagnózisra

- Lachman HJ et al. N Engl J Med 346:1786-91, 2002.
 - 350 beteg közül, akiket eredetileg AL amiloidózisnak diagnosztizáltak, 34-nek másfajta amiloidózisa volt
- Satoşkar A et al Arch Pathol 131: 917-22, 2007
 - immunofluoreszcencia is megbízhatatlan (sok az álpozitív és álnegatív)
- Satoşkar A et al. Am J Surg Pathol 2011, in press
 - immunoperoxidáz festések, különösen transthyretin ellenanyaggal, megbízhatatlanok (sok az álpozitív)
- Chee CE et al. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 10:177-180, 2010
 - Immunfestések megbízhatatlanok
 - Tömeg-spektrometriát kell használni minden kérdéses esetben az amiloidózis klasszifikációjához

Az amiloidózis klasszifikációja I.

- Immunohisztokémia/immunofluoreszcencia
 - megfelelő lehet típusos esetekben
 - például
 - krónikus gyulladós betegség, monoklonális immunoglobulin nem detektálható, immunfestések negatívak kivéve a pozitív AA festést: **AA amiloidózis**
 - monoklonális immunoglobulin a szérumban/vizeletben, immunfestések negatívak kivéve egy könnyűlánc festést (kappa vagy lambda) és az ellenanyag ugyanazt a könnyű láncot festi (általában lambda), amit a szérumban és/vagy a vizeletben detektáltak: **AL amiloidózis**

Az amiloidózis klasszifikációja II.

- Az anyagot el kell küldeni tömegspektrometriára
 - ha az immunfestések nem egyértelműek vagy
 - ha akármilyen diszkrepancia van az immunfestések és a laboratóriumi eredmények között
 - például
 - a betegnek monoklonális gammopátiája van, de az immunfestés nem hozza ki egyértelműen ugyanazt a könnyűláncot az amiloidban, amit a szérumban és/vagy a vizeletben találtak
 - Könnyűlánc festődés van, de a betegnek nincs detektálható monoklonális gammopátiája
 - több, mint egy ellenanyaggal van pozitív festődés az amiloidban
 - negatív vagy gyenge immunfestés valamennyi ellenanyaggal

Az amiloidózis klasszifikációja tömegspektrometriával (Tandem Mass Spectrometry)

- Az amiloid eltávolítása a metszetből lézer mikrodisszekcióval
- Az eltávolított anyag tripszines emésztése
- Liquid-kromatográfiás analízis „elektrospray tandem tömegspektrometriával”
- Nagyon érzékeny és specifikus módszer, meglepően kis mennyiségű amiloidból
 - ami a paraffin blokkban maradt, meg lehet határozni az amiloid típusát.
- A módszer beállítása: kb. 1 millió \$ az USA-ban
- Egy teszt ára: \$900 (Mayo Clinic)

Összefoglalva

- Az amiloidózis nem mindig könnyű diagnózis
 - ha nem gondolunk rá vagy korai stádiumban van, el lehet nézni a depozitumokat
- Az amiloidózis típusát meg kell határozni, mert a különféle típusok kezelése különböző
- Ha az immunfestések nem egyértelműek vagy nem egyeznek a laborleletekkel, tömegspektrometriás vizsgálat a diagnosztikus eljárás
- Ha kicsi a biopszia és amiloidot tartalmaz, legjobb elküldeni az anyagot tömegspektrometriára immunfestések nélkül

