

PRECIZNÍ TYPIZACE AMYLOIDÓZY

Autor: Petruščáková M.

Školitel: Flodr P., MUDr., Ph.D. Ústav klinické a molekulární patologie LF UPOL a FNOL

Úvod

Amyloidóza je heterogenní skupina onemocnění, které jsou výsledkem extracelulárního ukládání abnormálních, ve většině případů fyziologicky nedegradovatelných fibrilárních proteinových agregátů v konformaci β -skládaného listu s variabilním tkáňovým tropizmem. Amyloidózy můžeme dělit na vrozené a získané, systémové a lokalizované. Současná nomenklatura (ISA 2022) rozlišuje 42 humánních amyloidových fibrilárních proteinů, ze kterých je 14 systémových, 24 lokalizovaných a 4 se mohou vyskytovat v obou variantách. Typ amyloidu určuje následný terapeutický postup.

Cíle

1. Morfometrická, topografická, imunohistochemická a proteomická analýza depozit amyloidu.
2. Aplikace multiplexního imunohistochemického vyšetření jako příklad komplexní analýzy komplikovaných případů.

Metodika

1. Materiál souboru bioptických vzorků fixovaných formalínem a zalitých do parafínových bloků (FFPE) různých orgánů (myokard, GIT, ledvina, měkké tkáně, LU, kosterní svalovina aj.) byl vyšetřen speciálními detekčními metodami Kongo červeně (CR) a Saturnové červeně (SR) včetně analýzy v polarizační mikroskopii (birefringence, dichroizmus) s určením procentuálního zastoupení depozita amyloidu vetkáni a jeho sublokalizace.
2. Byla aplikována IHC metoda proti nejčastějším typům amyloidózy (kappa, lambda, IgG, IgM, IgA, IgD, TTR, AA, lysozym, fibrinogen).
3. Byla provedena proteomická analýza (LC-MS/MS, Mgr. D. Holub, Ph.D.) po izolaci depozit pomocí laserové mikrodisekce (LCM, MUC. M. Petruščáková, MUDr. P. Flodr, Ph.D.).
4. Kombinované formy amyloidu byly analyzovány multiplexní IHC metodou (MUDr. D. Hraboš). Výsledky analyzovaného souboru byly statisticky zpracovány (odb. as. MUDr. J. Zapletalová, Ph.D.).

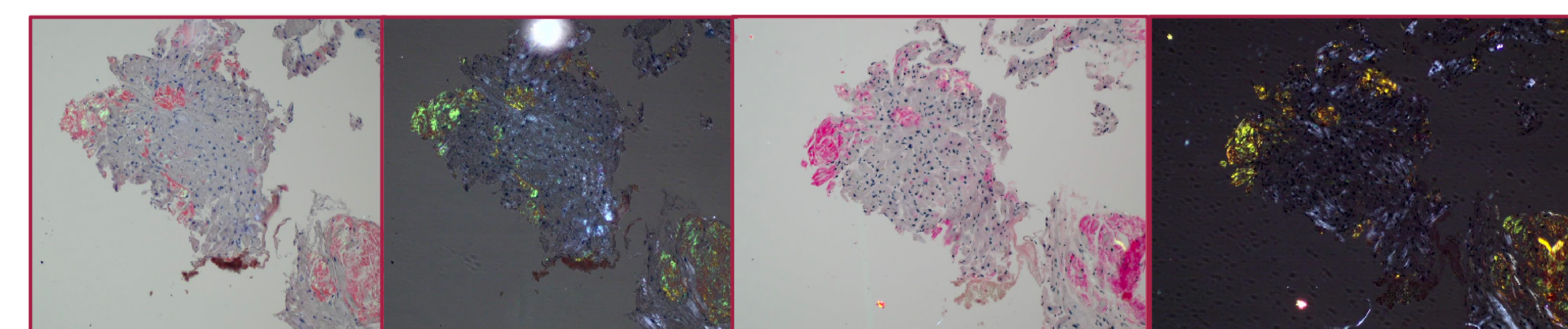
Výsledky

IHC typizace amyloidu/LC-MS	Pozitivní +/-LC-MS	Pozitivní ++/LC-MS	Pozitivní +++/LC-MS	neg. IHC/neg. LC-MS	neg. IHC/pozit. LC-MS	NA	suma
TTR	21--0	18--2	19--8	15	4	23	100
AL lambda	24--1	24--5	14--2	11	2	25	100
AL kappa	39--4	24--4	0--0	16	1	20	100
IgG	1--0	17--0	10--0	46	4	22	100
IgA	0--0	1--0	5--0	70	2	22	100
IgD	2--0	0--0	0--0	75	0	23	100
IgM	2--1	1--0	1--0	73	1	22	100
Lysozym	21--0	8--0	1--0	48	0	22	100
Fibrinogen	0--0	0--0	9--0	69	0	22	100

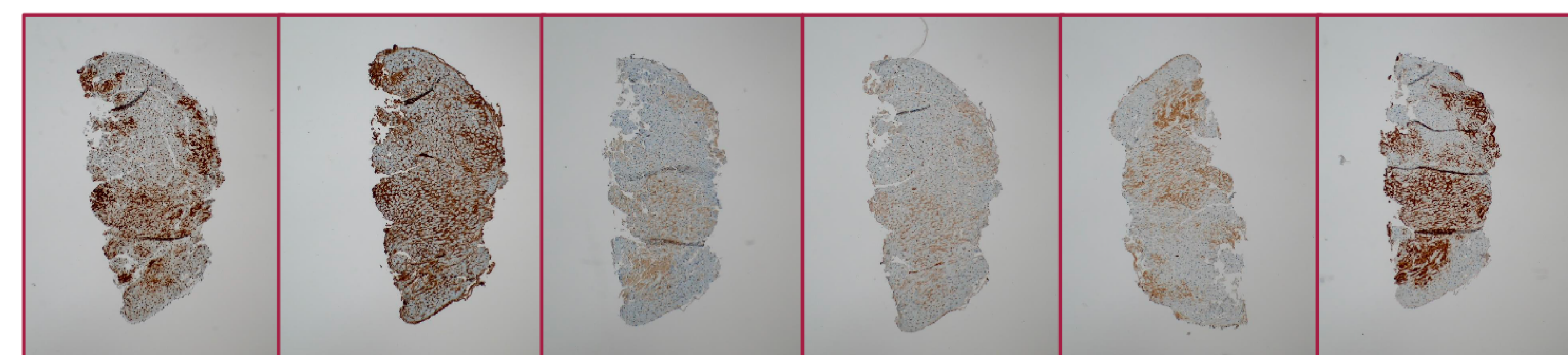
POZITIVITA = +++/ ++/ +							
IHC typizace amyloidu/LC-MS	Se	Sp	FN	FP	PPV	NPV	
TTR	71,4 %	23,8 %	28,6 %	76,2 %	17,2 %	78,9 %	Se senzitivita
AL lambda	80,0 %	16,9 %	20,0 %	83,1 %	12,9 %	84,6 %	Sp specifita
AL kappa	88,9 %	22,5 %	11,1 %	77,5 %	12,7 %	94,1 %	falešná negativita
IgG	0,0 %	62,2 %	100,0 %	37,8 %	0,0 %	92,0 %	falešná pozitivita
IgA	0,0 %	92,1 %	100,0 %	7,9 %	0,0 %	97,2 %	PPV pozitivní prediktivní hodnota
IgD	-	97,4 %	-	2,6 %	0,0 %	100,0 %	NPV negativní prediktivní hodnota
IgM	50,0 %	96,1 %	50,0 %	3,9 %	25,0 %	98,6 %	
Lysozym	-	61,5 %	-	38,5 %	0,0 %	100,0 %	
Fibrinogen	-	88,5 %	-	11,5 %	0,0 %	100,0 %	

POZITIVITA = +++/ ++							
IHC typizace amyloidu/LC-MS	Se	Sp	FN	FP	PPV	NPV	
TTR	71,4 %	57,1 %	28,6 %	42,9 %	27,0 %	90,0 %	
AL lambda	70,0 %	52,3 %	30,0 %	47,7 %	18,4 %	91,9 %	
AL kappa	44,4 %	71,8 %	55,6 %	28,2 %	16,7 %	91,1 %	
IgG	0,0 %	63,5 %	100,0 %	36,5 %	0,0 %	92,2 %	
IgA	0,0 %	92,1 %	100,0 %	7,9 %	0,0 %	97,2 %	
IgD	-	100,0 %	-	0,0 %	-	100,0 %	
IgM	0,0 %	97,4 %	100,0 %	2,6 %	0,0 %	97,4 %	
Lysozym	-	88,5 %	-	11,5 %	0,0 %	100,0 %	
Fibrinogen	-	88,5 %	-	11,5 %	0,0 %	100,0 %	

POZITIVITA = +++							
IHC typizace amyloidu/LC-MS	Se	Sp	FN	FP	PPV	NPV	
TTR	57,1 %	82,5 %	42,9 %	17,5 %	42,1 %	89,7 %	
AL lambda	20,0 %	81,5 %	80,0 %	18,5 %	14,3 %	86,9 %	
AL kappa	0,0 %	100,0 %	100,0 %	0,0 %	-	88,8 %	
IgG	0,0 %	86,5 %	100,0 %	13,5 %	0,0 %	94,1 %	
IgA	0,0 %	93,4 %	100,0 %	6,6 %	0,0 %	97,3 %	
IgD	-	100,0 %	-	0,0 %	-	100,0 %	
IgM	0,0 %	98,7 %	100,0 %	1,3 %	0,0 %	97,4 %	
Lysozym	-	98,7 %	-	1,3 %	0,0 %	100,0 %	
Fibrinogen	-	88,5 %	-	11,5 %	0,0 %	100,0 %	



Kongo červeně Kongo červeně Saturnová červeně Saturnová červeně



AA IgG Kappa Lambda Lysozyme TTR

Závěr

Vypracovaný rozbor souboru bioptických vzorků v rámci detekce a typizace amyloidu včetně souvisejících subanalýz ukazuje na určitý stupeň heterogenity orgánového tropizmu, topografie sublokalizace v rámci orgánu (intersticiem a cévy), objemu a kompozice amyloidu s dominujícím konvenčním monotypickým amyloidogenním proteinem (většina depozit) a v malém procentu i kombinovaným amyloidovým složením z více amyloidogenních proteinů, což je podstatnou diagnostickou a terapeutickou výzvou. Speciální a IHC metody jsou rychlou a široce dostupnou diagnostickou metodou, která v IHC části vykazuje nižší validitu v porovnání s vysoce specializovanou, ale také časově náročnou proteomickou metodou LC-MS/MS po LCM izolaci depozit amyloidu. LCM/LC-MS/MS hraje podstatnou roli ve zvýšení preciznosti laboratorní diagnostiky amyloidózy s nedílnou terapeutickou konsekvencí. Novým metodickým přístupem pro topografickou detekci a typizaci amyloidu je multiplexní IHC vyšetření, které technickou a časovou náročností spadá mezi konvenční IHC metodu a současně aplikovanou metodu proteomickou.

References

- Telio D, Bailey D, Chen C, Crump M, Reece D, Kukreti V. Two distinct syndromes of lymphoma-associated AL amyloidosis: a case series and review of the literature. *Am J Hematol.* 2010 Oct;85(10):805-8. doi: 10.1002/ajh.21814. PMID: 20872959.
- Holub D, Flodrova P, Pika T, Flodr P, Hajduch M, Dzubak P. Mass Spectrometry Amyloid Typing Is Reproducible across Multiple Organ Sites. *Biomed Res Int.* 2019 Jan 31;2019:3689091. doi: 10.1155/2019/3689091. PMID: 30834260; PMCID: PMC6374819.
- Wechalekar, AD, Gillmore, JD, Hawkins, PN. Systemic amyloidosis. *Lancet* 2016; 387(15): 2641-2654.
- Kubo, Y, Tasaka, T, Sano, F, et al. Amyloid-associated amyloidosis in a HCV carrier with non-Hodgkin's lymphoma who had been treated with autologous stem cell transplantation and rituximab. *Leuk Lymphoma* 2007; 48(10): 2075-2078.