

Diagnostika amyloidózy z pohledu patologa

Látalová P., Flodr P., Tichý M.

Ústav klinické a molekulární patologie

LF UP a FN Olomouc





Úvodem - vzácná jednotka i pro patologa

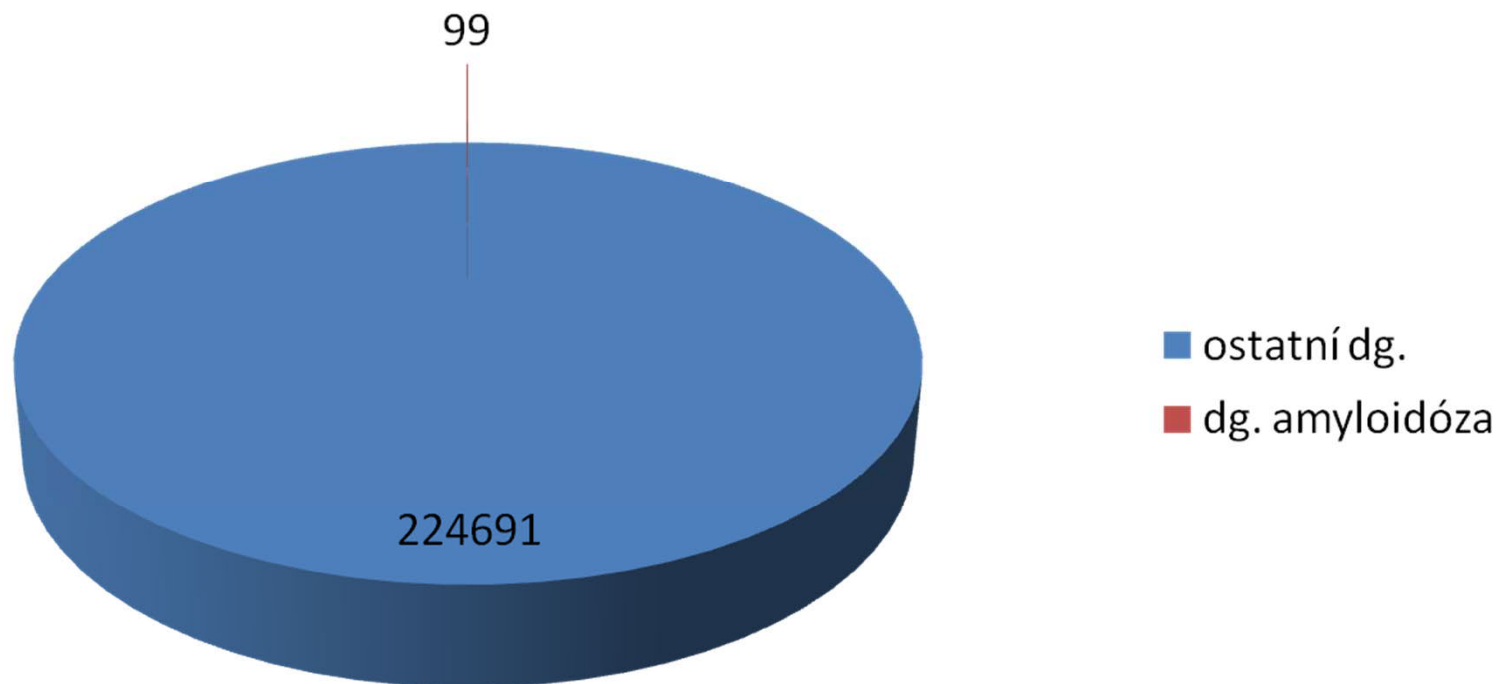
Statistika Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc

r. 2005 – duben 2013

- **99 vyšetření**, v jejichž diagnostickém závěru byla uvedena amyloidóza (79 pacientů)
- ~ **0,044%** všech provedených vyšetření bioptických a nekroptických

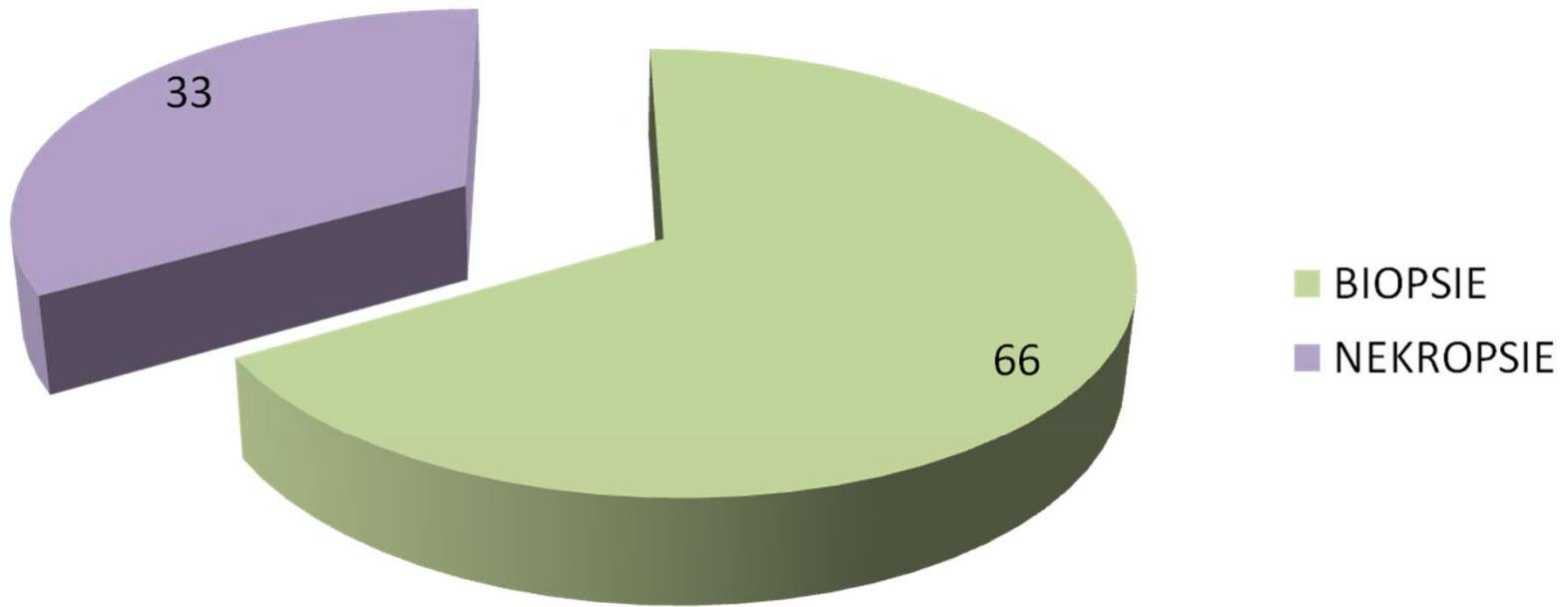
Bioptická + nekroptická vyšetření 2005 – 2013

224790 vyšetření celkem

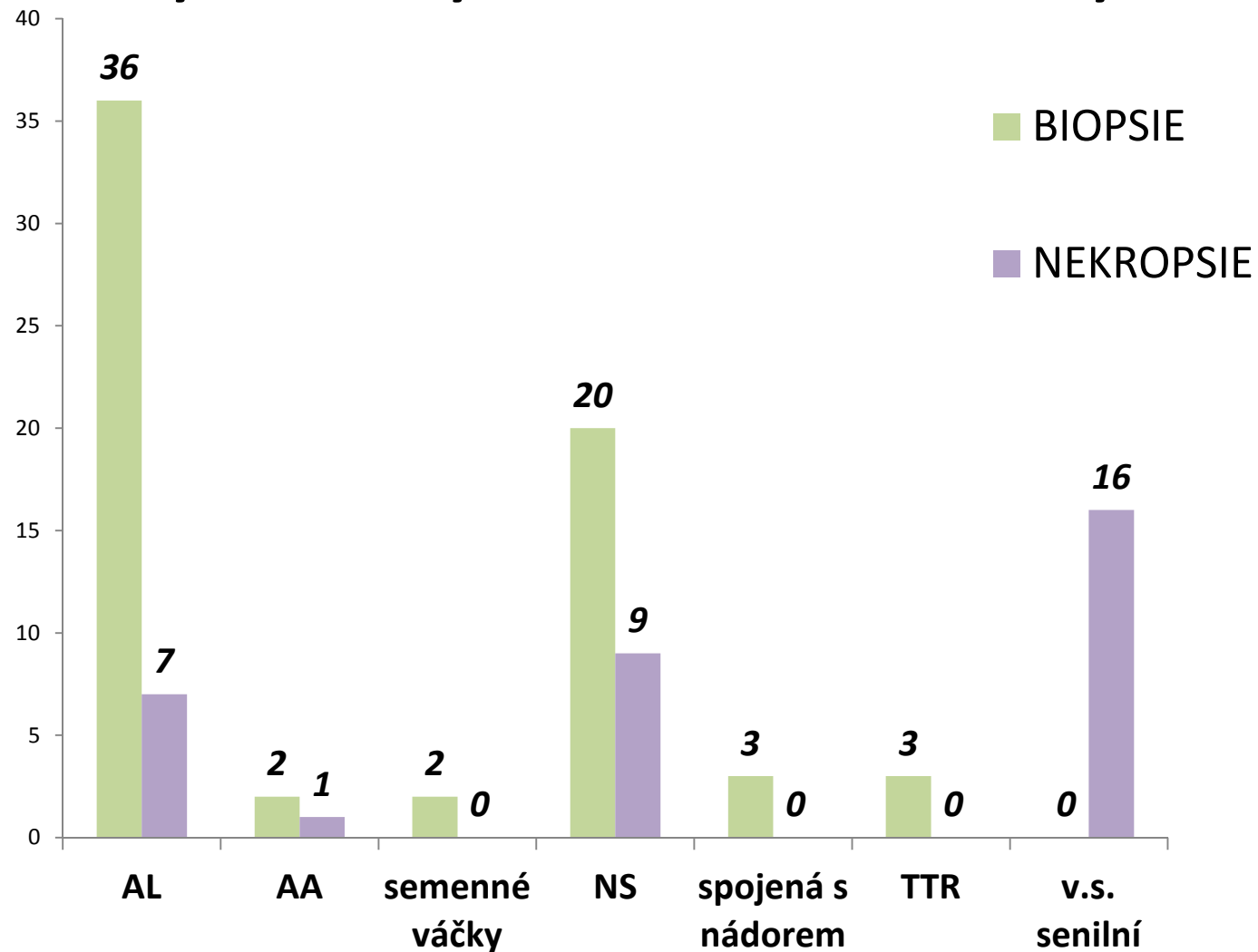


Podíl bioptických a nekroptických vyšetření s dg. amyloidózy

Dg. amyloidózy (99 vyšetření)



Zastoupení jednotlivých podtypů amyloidózy v souhrnu 99 vyšetření

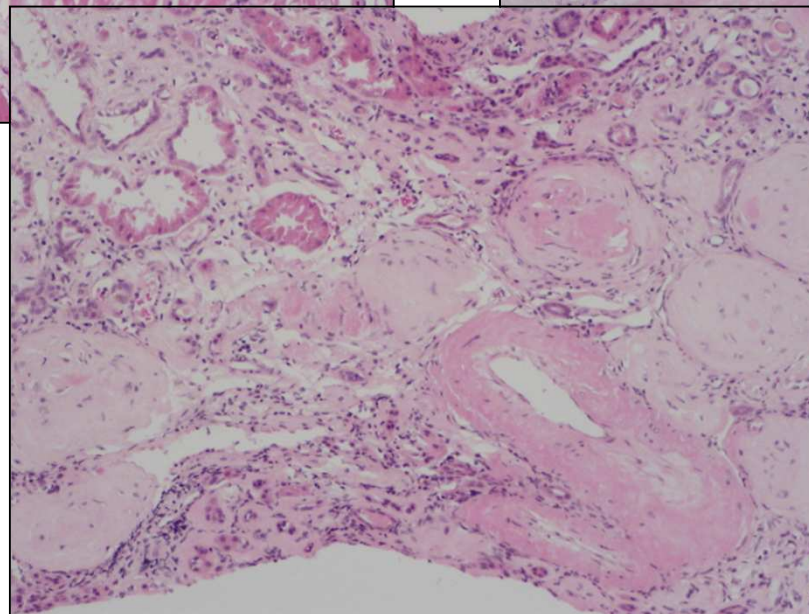
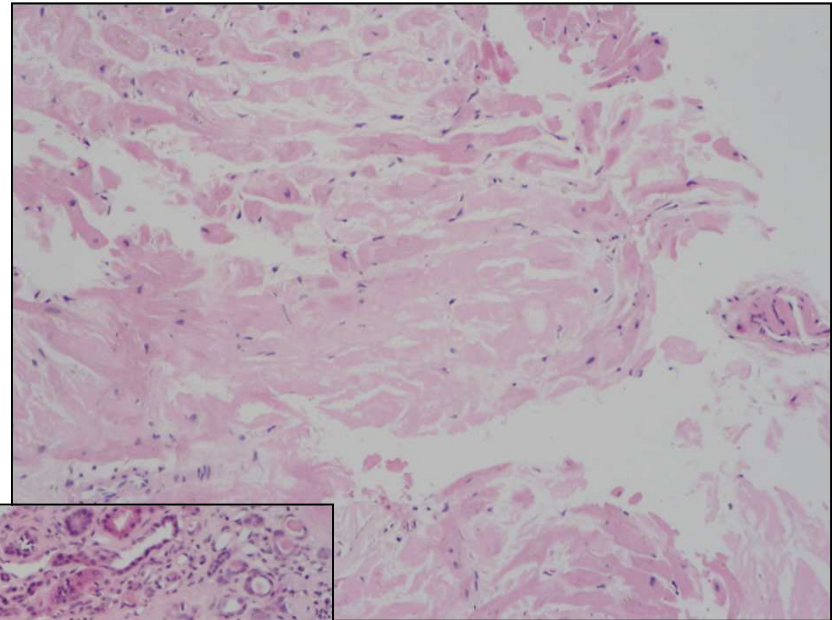
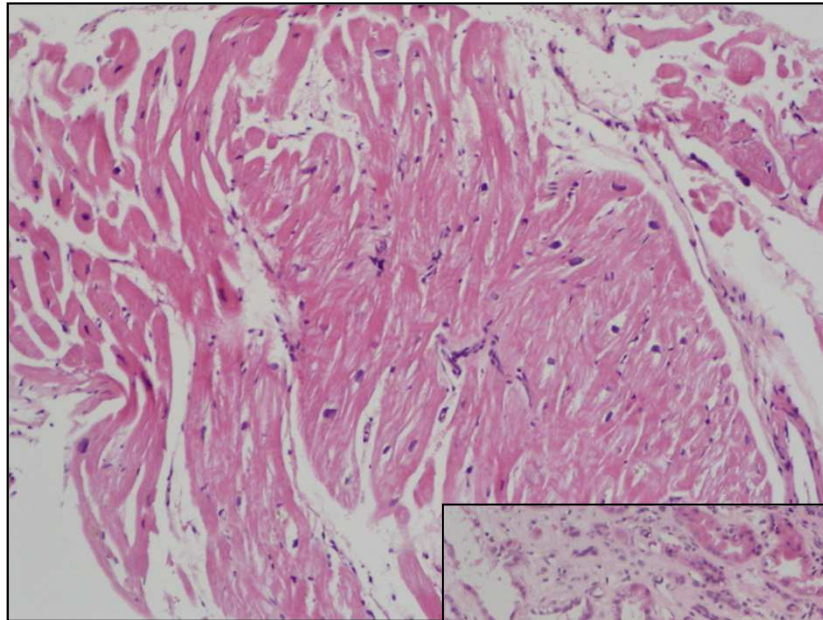


Je vzácná,...

ale umíme ji poznat.

Pojmeme podezření

(základní preparát v barvení hematoxylin-eozin)



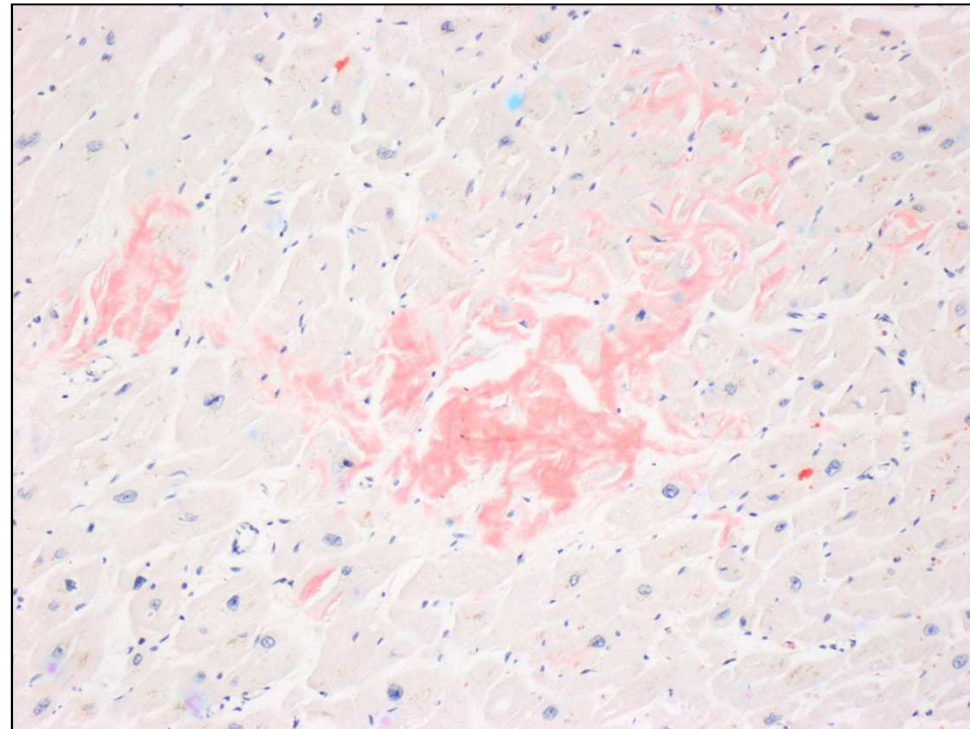
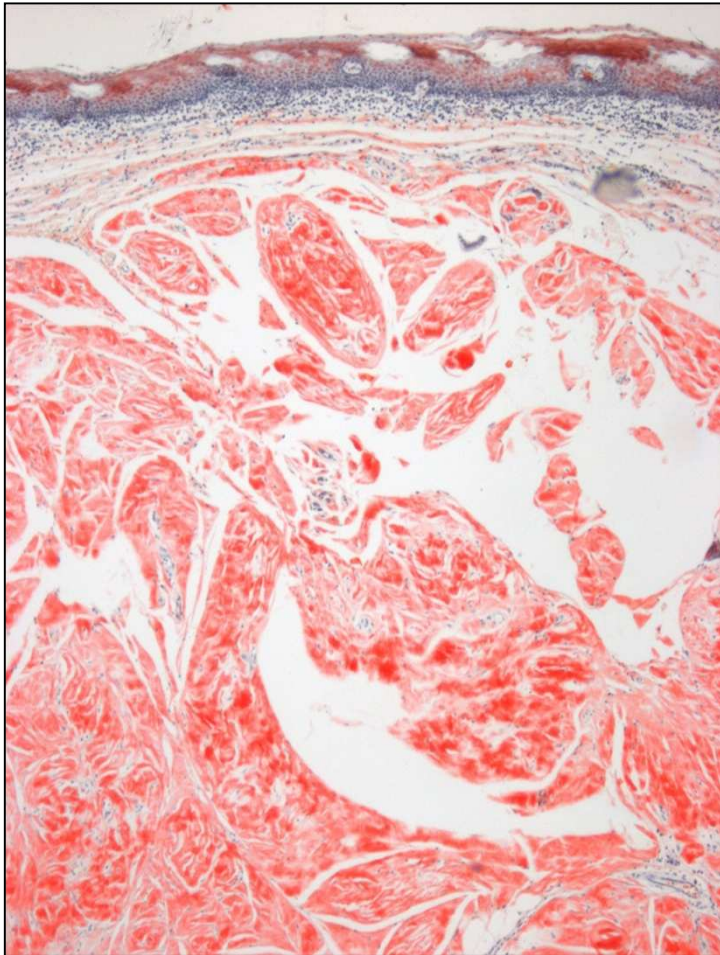
Spec. barvicí metody (Kongo červeně, metylzeleně)



Spec. barvicí metody (Kongo červeň, metylzeleně)



Spec. barvicí metody (Kongo červeně)



Polarizační vyšetření

- využití fyzikálních vlastností amyloidu
- β -struktura amyloidu indukuje optické efekty v polarizovaném světle

Polarizační vyšetření – optické jevy

- **Dvojlom** (=birefringence) – schopnost některých látek rozdělit paprsek světla na dva, které mají navzájem kolmé roviny
 - tzv. řádný a mimořádný paprsek
- **Dichroismus** – schopnost látky absorbovat různou část světelného spektra v různých rovinách

Polarizační vyšetření

- Polarizační mikroskop – optický mikroskop se dvěma speciálními filtry ve své optické ose – **polarizátor** (mezi zdrojem světla a preparátem) a **analyzátor** (mezi preparátem a okulárem)
- Pozorování v tzv. **Cross-Nikolově poloze**
 - roviny obou filtrů jsou k sobě kolmé - nastavení otočným polarizátorem do takové polohy, kdy zorné pole co nejvíce ztmavne
 - jednolomné látky (voda, cytoplazma) zůstávají temné, dvojlomné látky (krystaly, některé molekuly) se zobrazí světle na tmavém pozadí, protože pouze jeden ze dvou paprsků prochází analyzátozem – ten, který je rovnoběžný s jeho rovinou
 - pozorovaná barva závisí na výšce vrstvy dvojlomné látky

Physical basis of colors seen in Congo red-stained amyloid in polarized light

Alexander J Howie¹, Douglas B Brewer², Daniel Howell³ and Adrian P Jones³

Amyloid stained by Congo red is traditionally said to show apple-green birefringence in polarized light, although in practice various colors may be seen between accurately crossed polarizing filters, called polarizer and analyzer. Other colors are seen as the polarizer and analyzer are uncrossed and sometimes when the slide is rotated. Previously, there has been no satisfactory explanation of these properties. Birefringence means that a material has two refractive indices, depending on its orientation in polarized light. Birefringence can change linearly polarized light to elliptically polarized, which allows light to pass a crossed analyzer. The birefringence of orientated Congo red varied with wavelength and was maximal near its absorption peak, changing from negative (slow axis of transmission perpendicular to smears or amyloid fibrils) on the shortwave side of the peak to positive (slow axis parallel) on the longwave side. This was explained by a property of any light-absorbing substance called anomalous dispersion of the refractive index around an absorption peak. Negative birefringence gave transmission of blue, positive gave yellow, and the mixture was perceived as green. This explains how green occurs in ideal conditions. Additional or strain birefringence in the optical system, such as in glass slides, partly or completely eliminated blue or yellow, giving yellow/green or yellow, and blue/green or blue, which are commonly seen in practice and in illustrations. With uncrossing of polarizer or analyzer, birefringent effects declined and dichroic effects appeared, giving progressive changes from green to red as the plane of polarization approached the absorbing axis and from green to colorless in the opposite way. This asymmetry of effects is useful to pathologists as a confirmation of amyloid. Rather than showing 'apple-green birefringence in polarized light' as often reported, Congo red-stained amyloid, when examined between crossed polarizer and analyzer, should more accurately be said to show anomalous colors.

Laboratory Investigation (2008) 88, 232–242; doi:10.1038/labinvest.3700714; published online 31 December 2007

KEYWORDS: amyloid; anomalous colors; birefringence; Congo red; polarization

Many pathologists use Congo red to make a diagnosis of amyloid and state the common opinion that in polarized light, Congo red-stained amyloid shows apple-green birefringence, sometimes called apple-green dichroism. Is this opinion correct? A cursory glance at published micrographs said to illustrate this color reveals that most show more than one color and that some do not even show green. In everyday practice, a diligent pathologist may have been dissuaded from a diagnosis of amyloid, or at least puzzled, if green was not the only color or if green was not seen. If the general opinion is correct despite these findings and illustrations, what is the explanation of the green color? If it is not correct, what is the explanation of the colors seen, and what is a better expression to use? Does an understanding of the mechanisms help the pathologist in practice or give an insight into the interaction between Congo red and amyloid?

No previous explanation of the mechanisms has been satisfactory, partly because of incomplete accounts of the properties of Congo red-stained amyloid. We investigated these using polarizing microscopy.^{1–3} Because some principles of polarizing microscopy may not be widely known, they are given here to help understand this study.

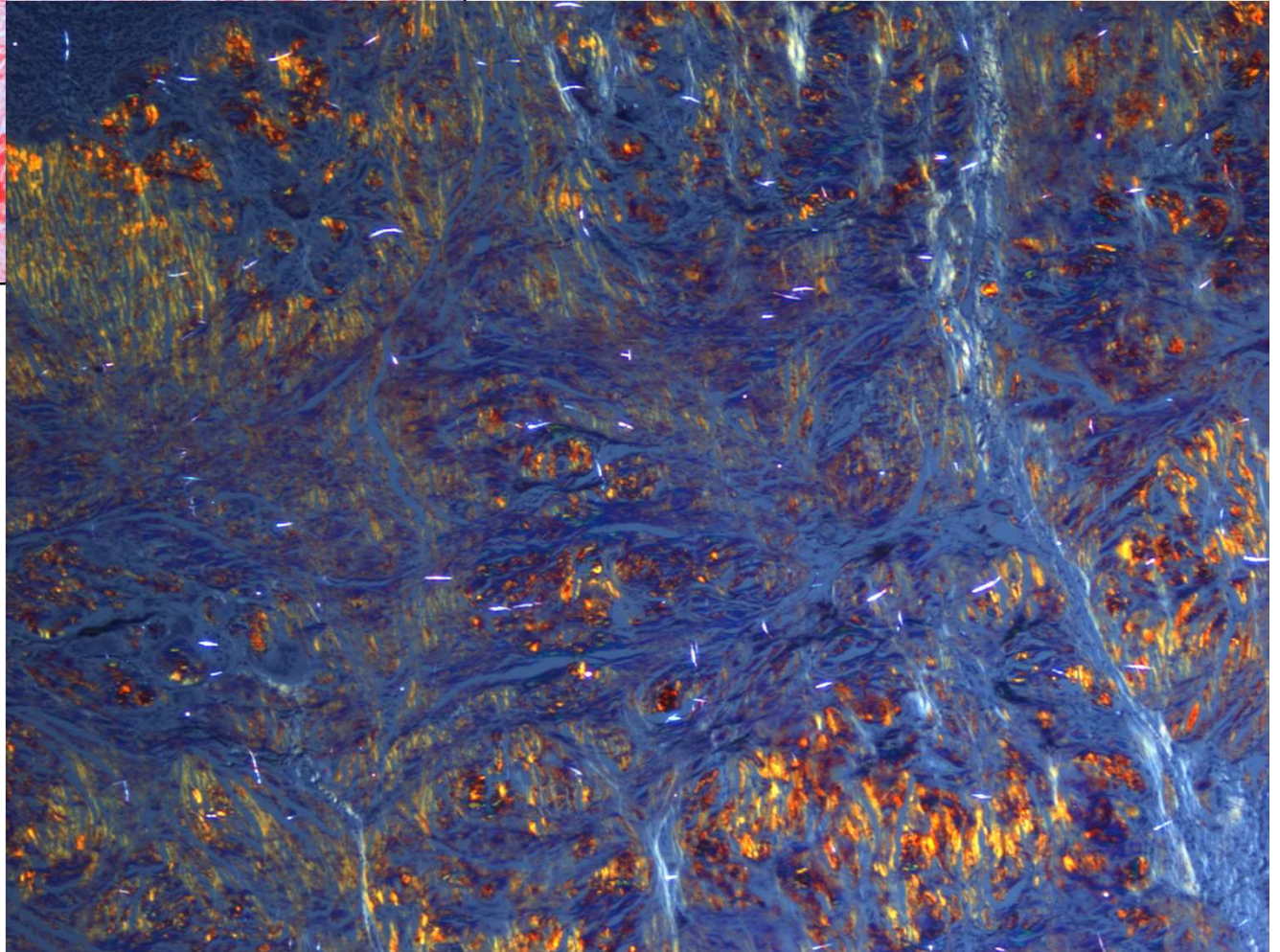
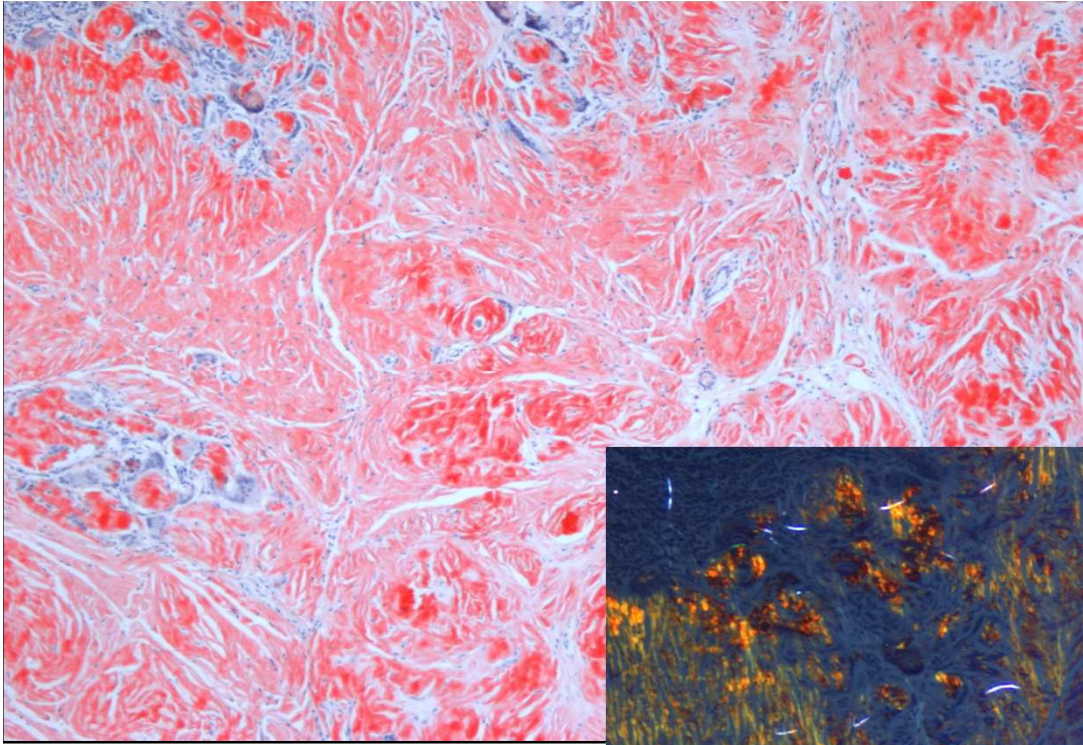
Polarizing Microscopy

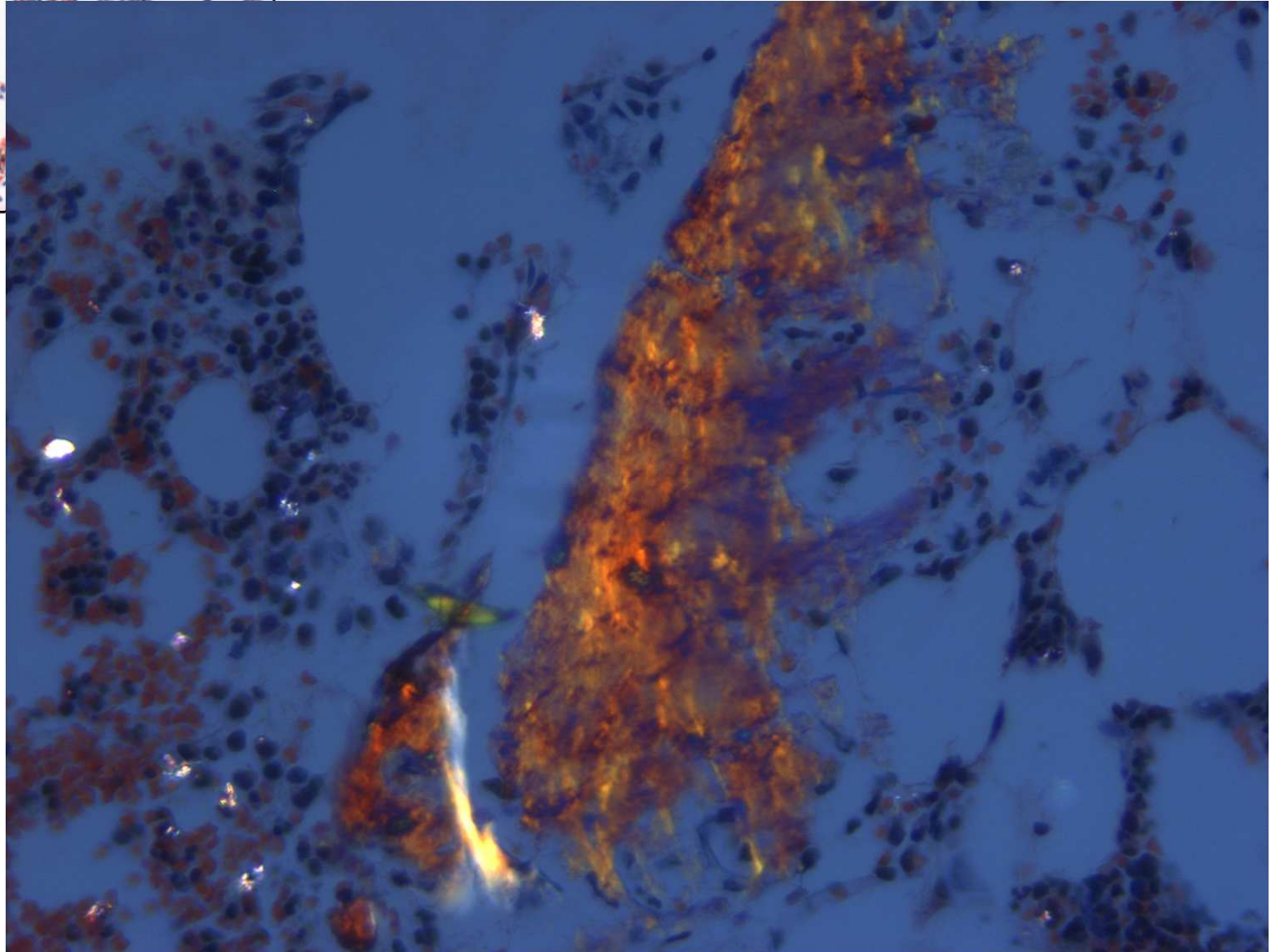
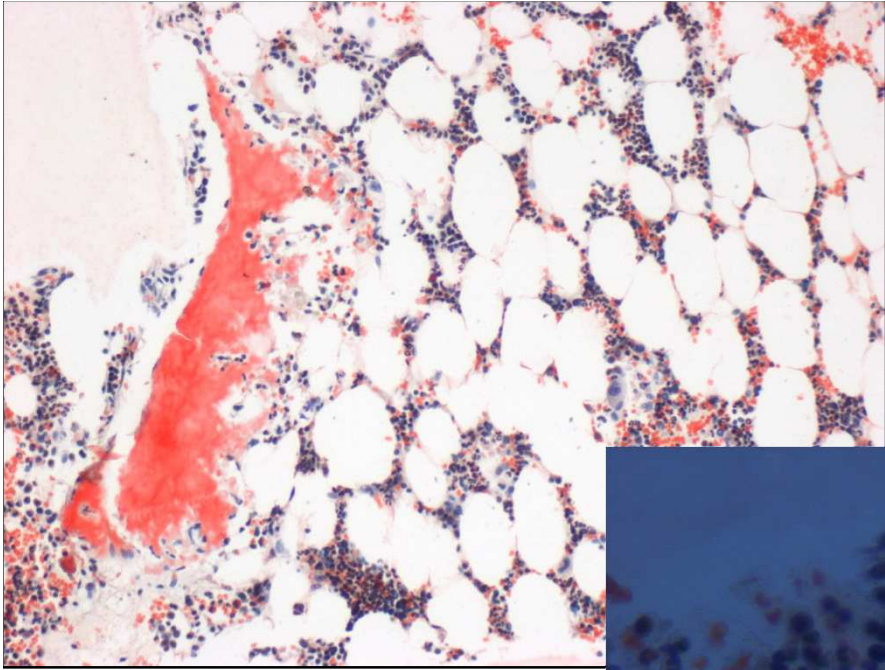
Polarization means that light waves vibrate in only one plane. One way to achieve this is by use of the polarizing filters available for microscopes, called a polarizer when inserted in the optical path between light source and specimen stage and an analyzer when inserted between the specimen stage and eyepieces. Polarization effects are generally identical if either filter is inserted on its own, or if either is rotated. If just a

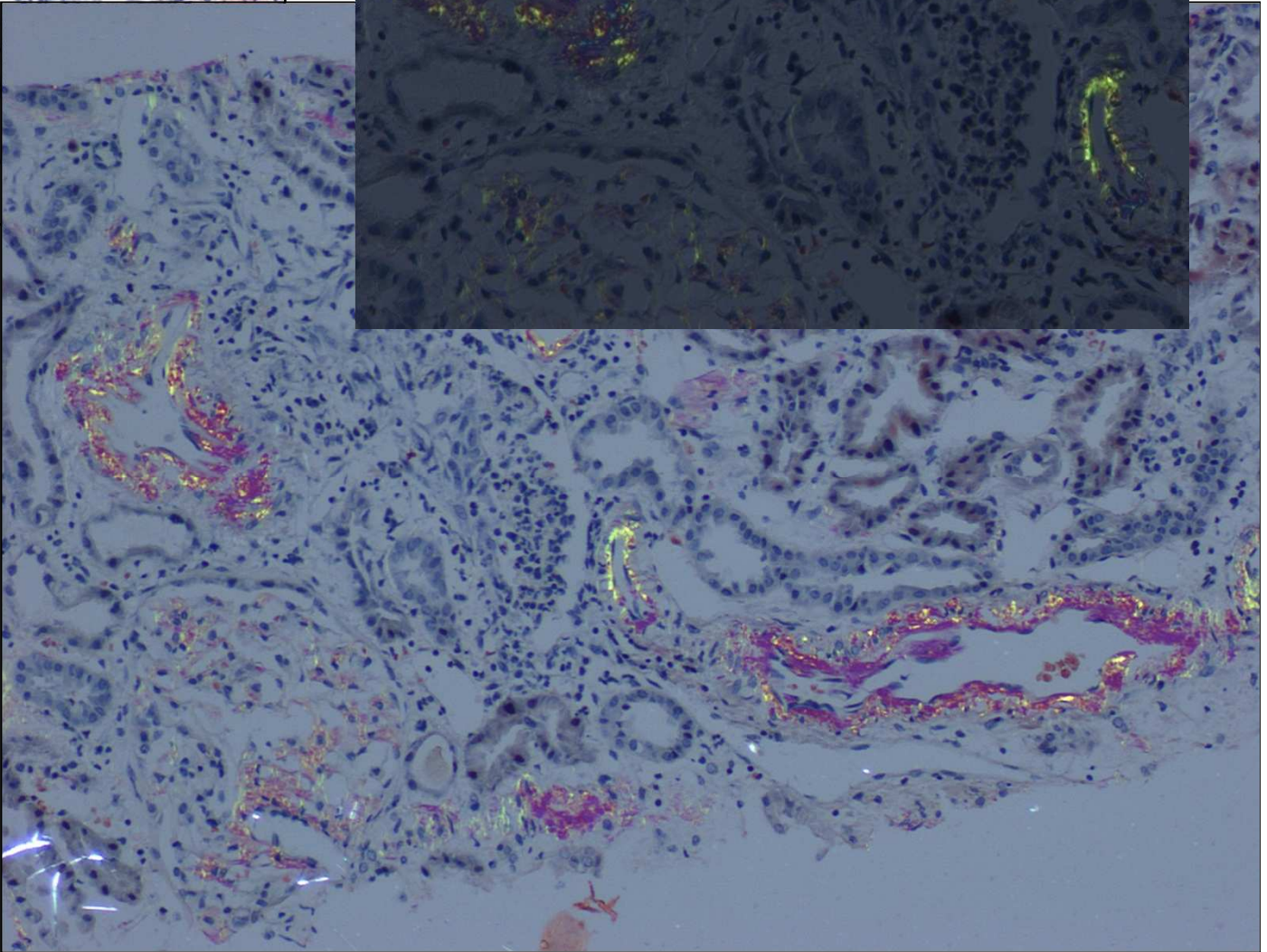
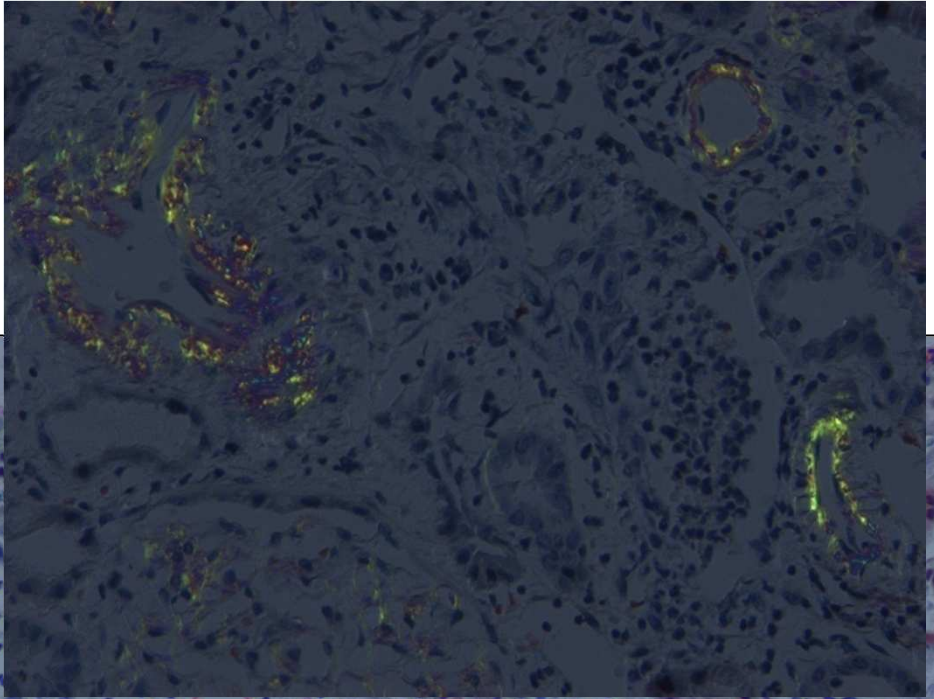
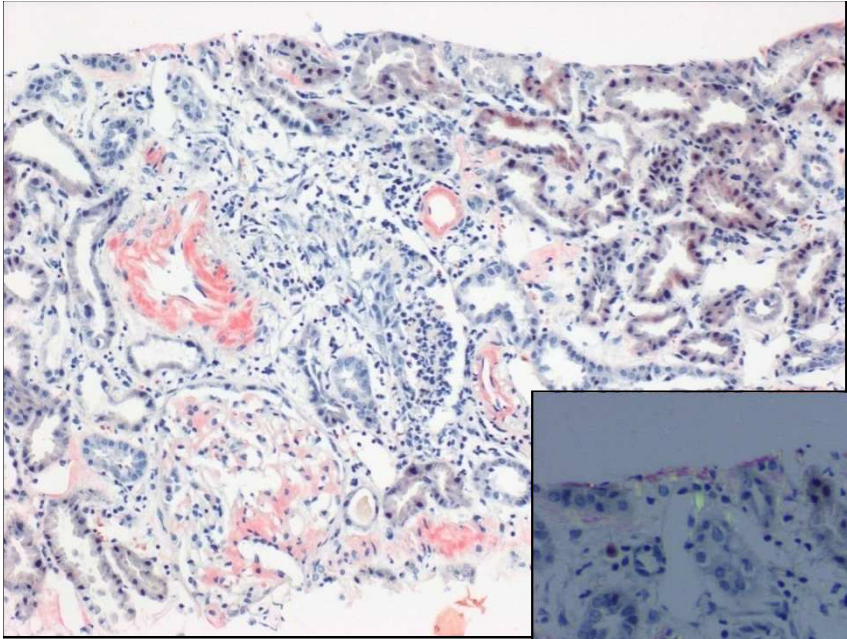
¹Department of Pathology, University College London, London, UK; ²Department of Pathology, University of Birmingham, Birmingham, UK and ³Department of Earth Sciences, University College London, London, UK

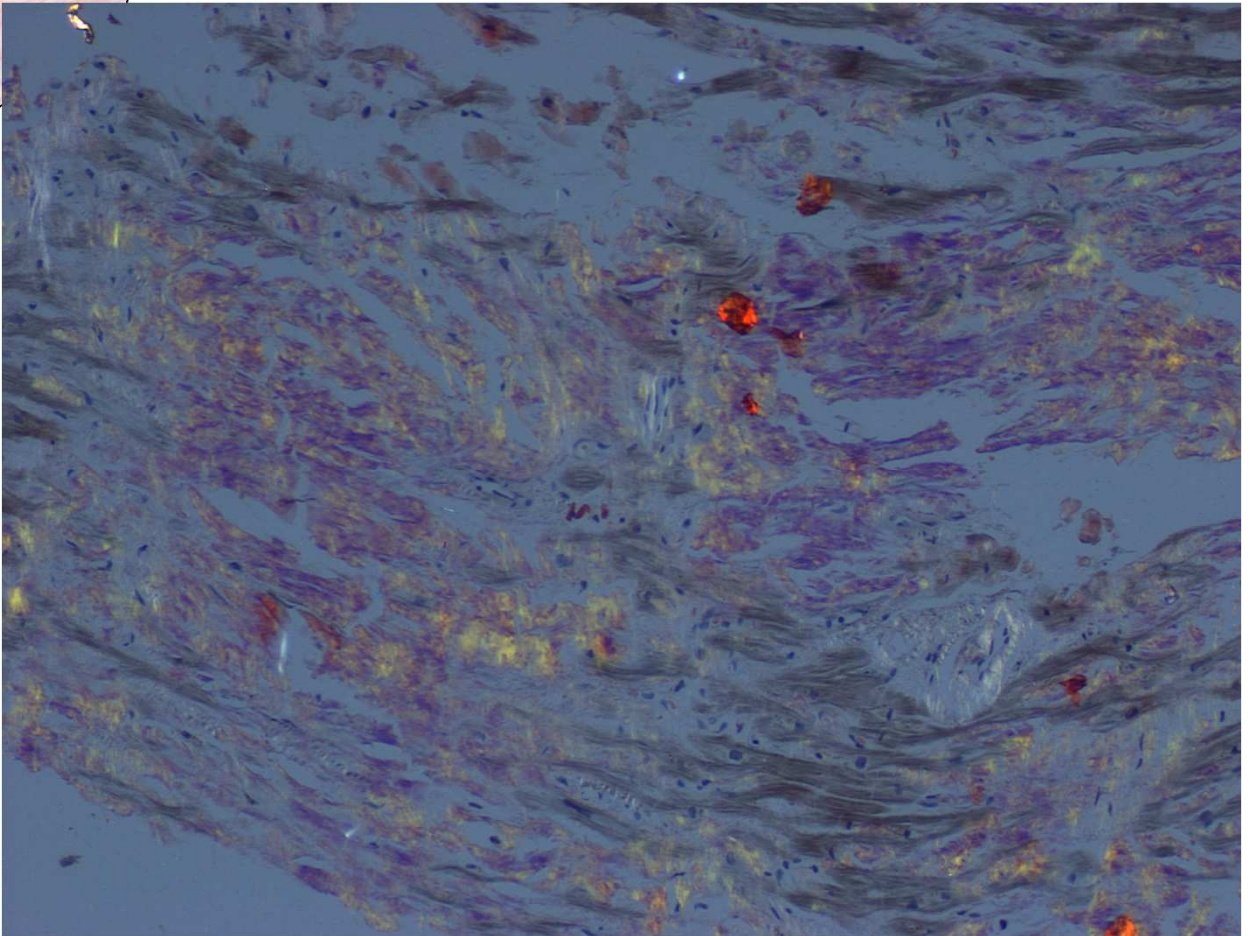
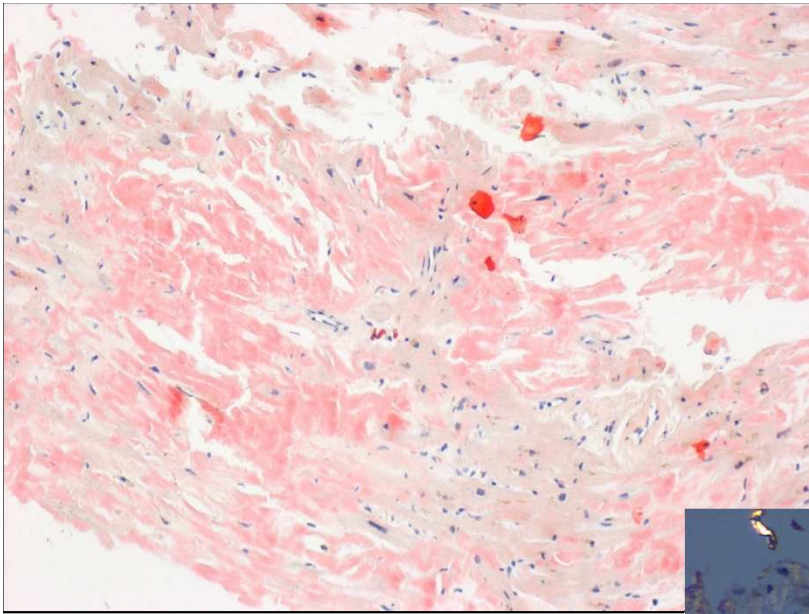
Correspondence: Professor AJ Howie, MD, Department of Cellular Pathology, Royal Free Hospital, London NW3 2QG, UK. E-mail: a.j.howie@medsch.ucl.ac.uk

Received 3 September 2007; revised 21 November 2007; accepted 21 November 2007





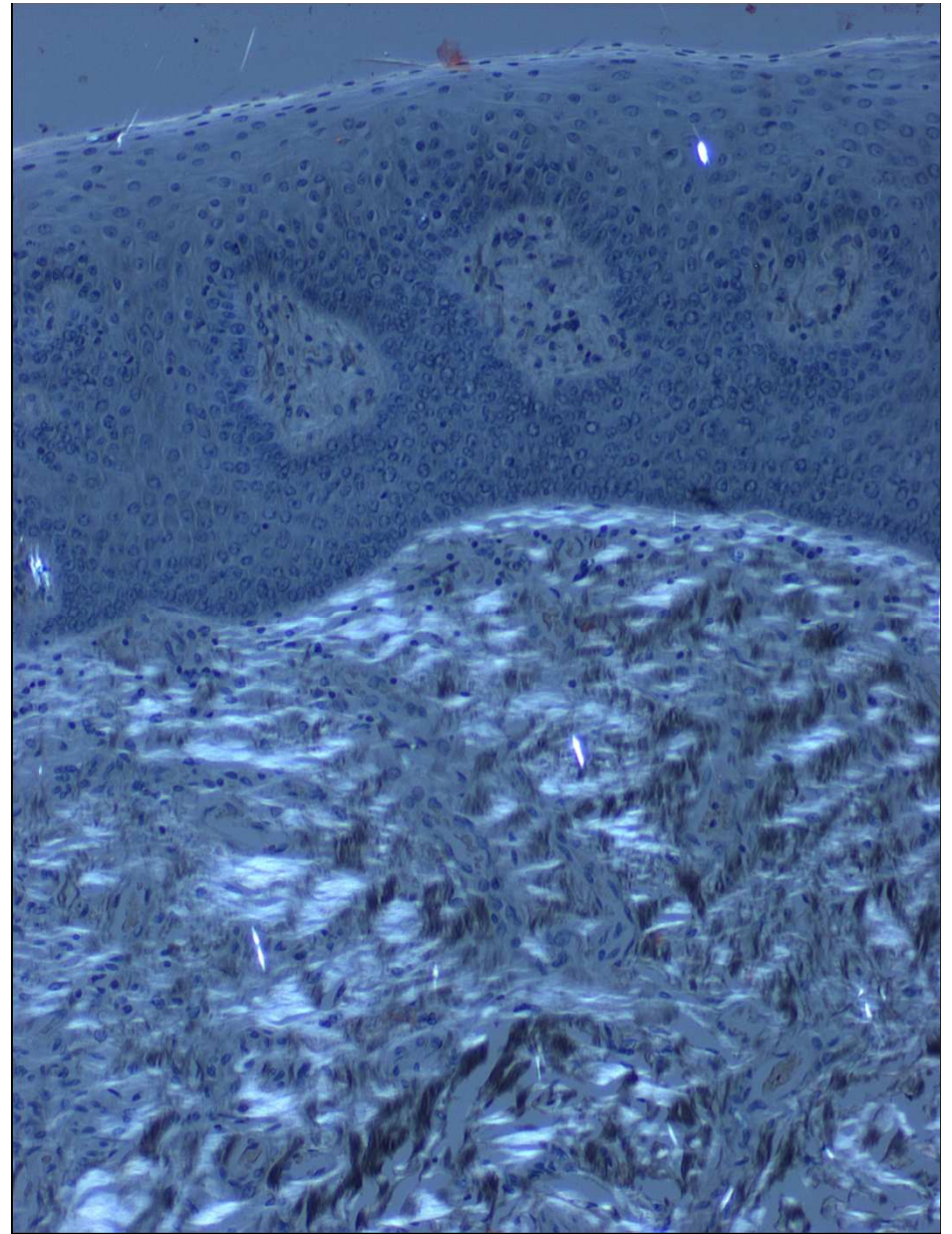
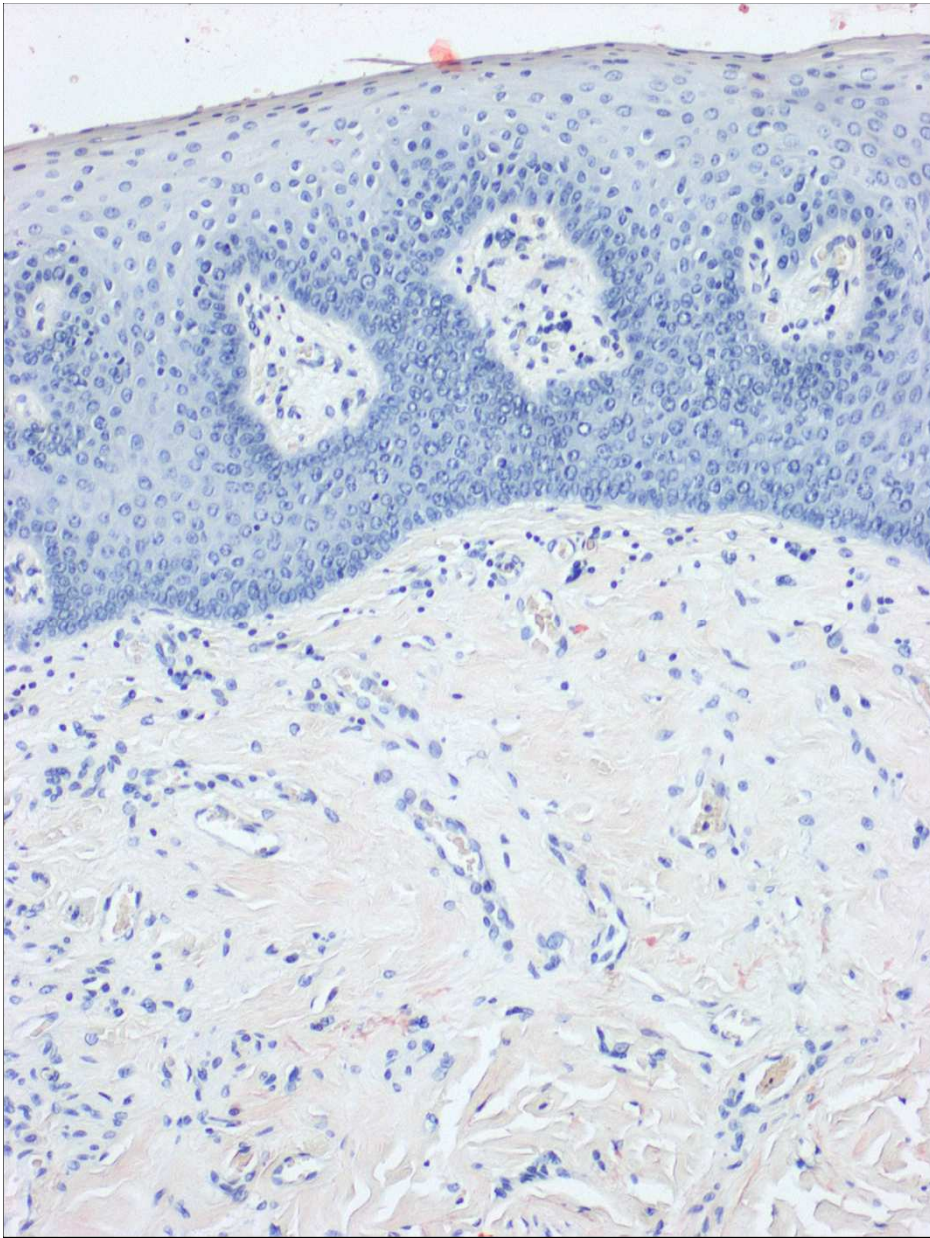




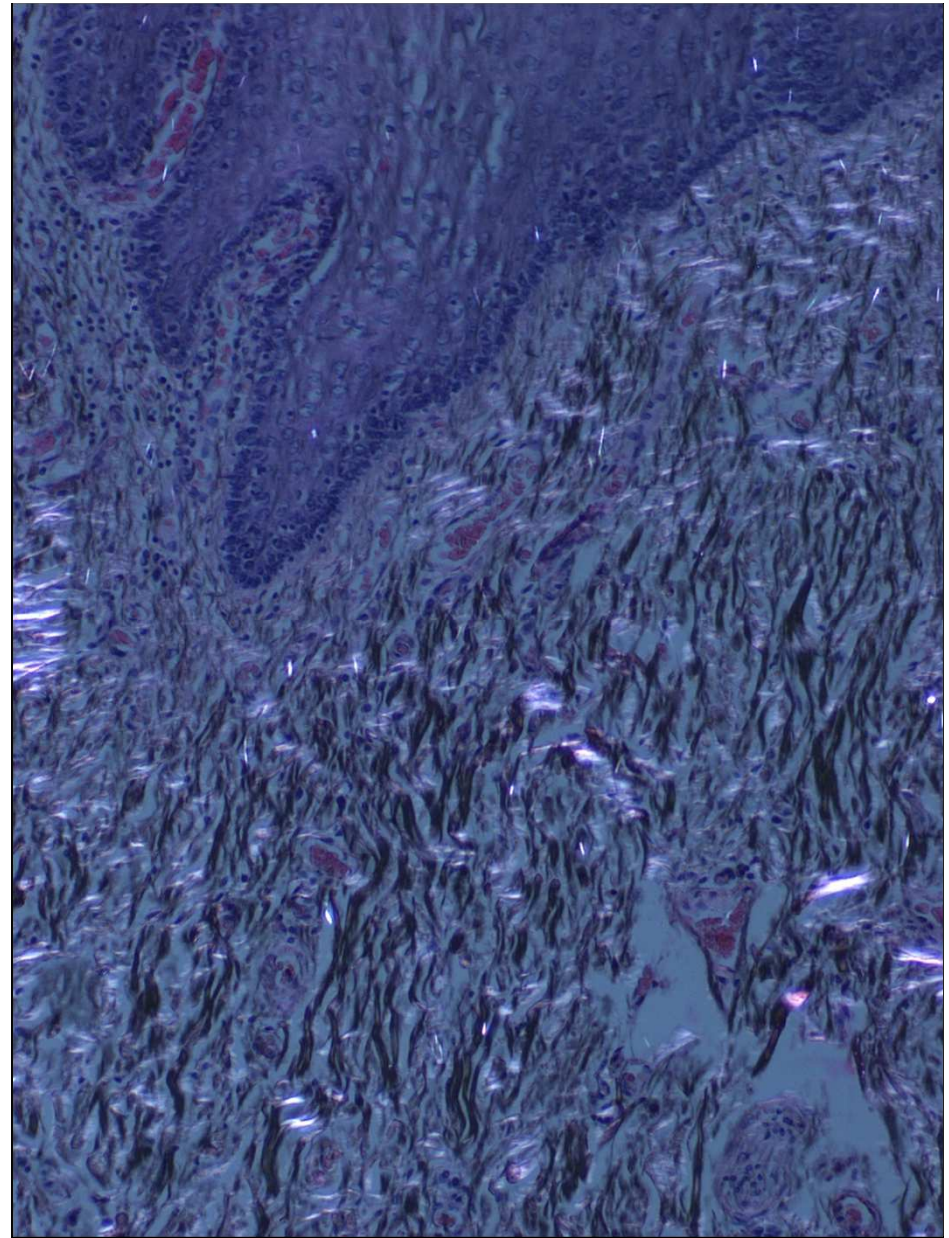
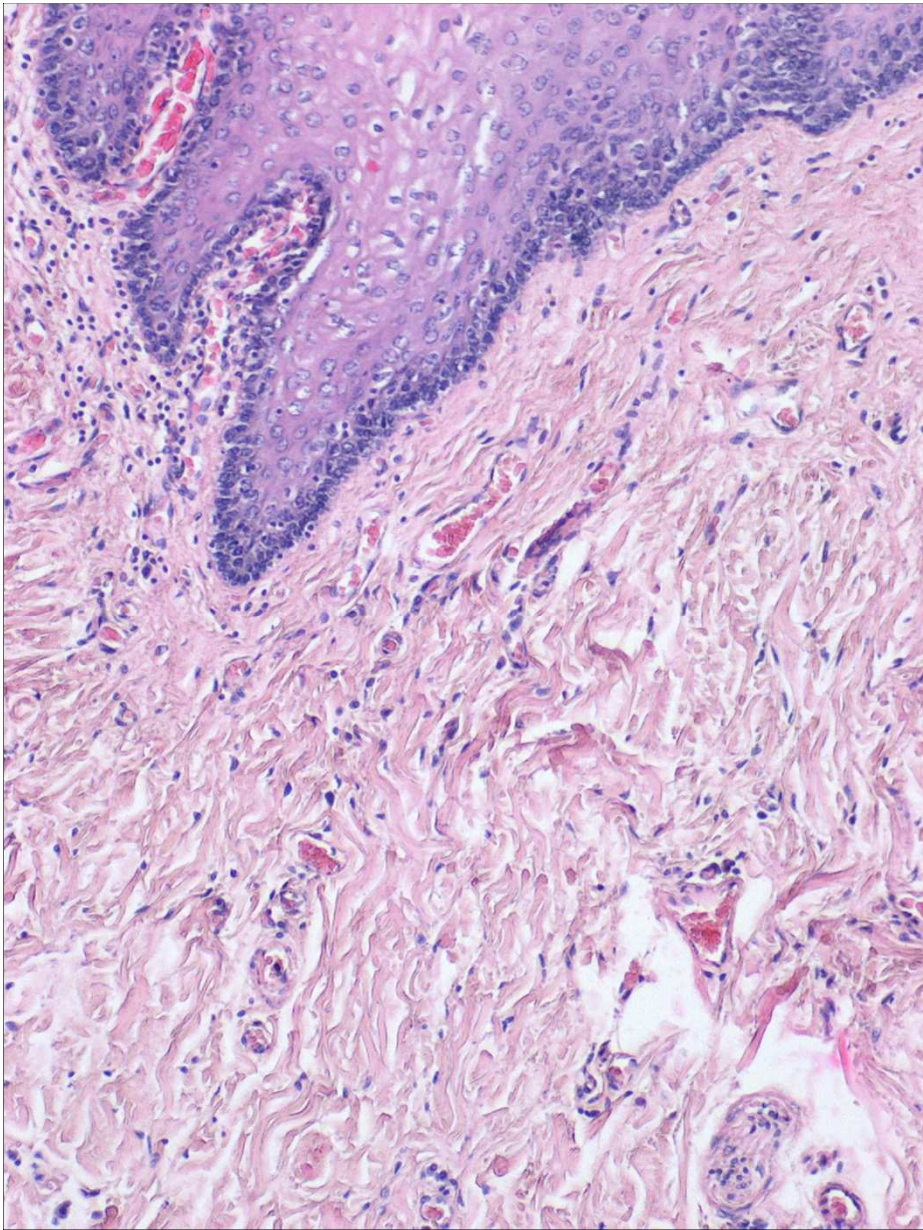
Ne všechno, co vykazuje dvojlom,
je amyloid...



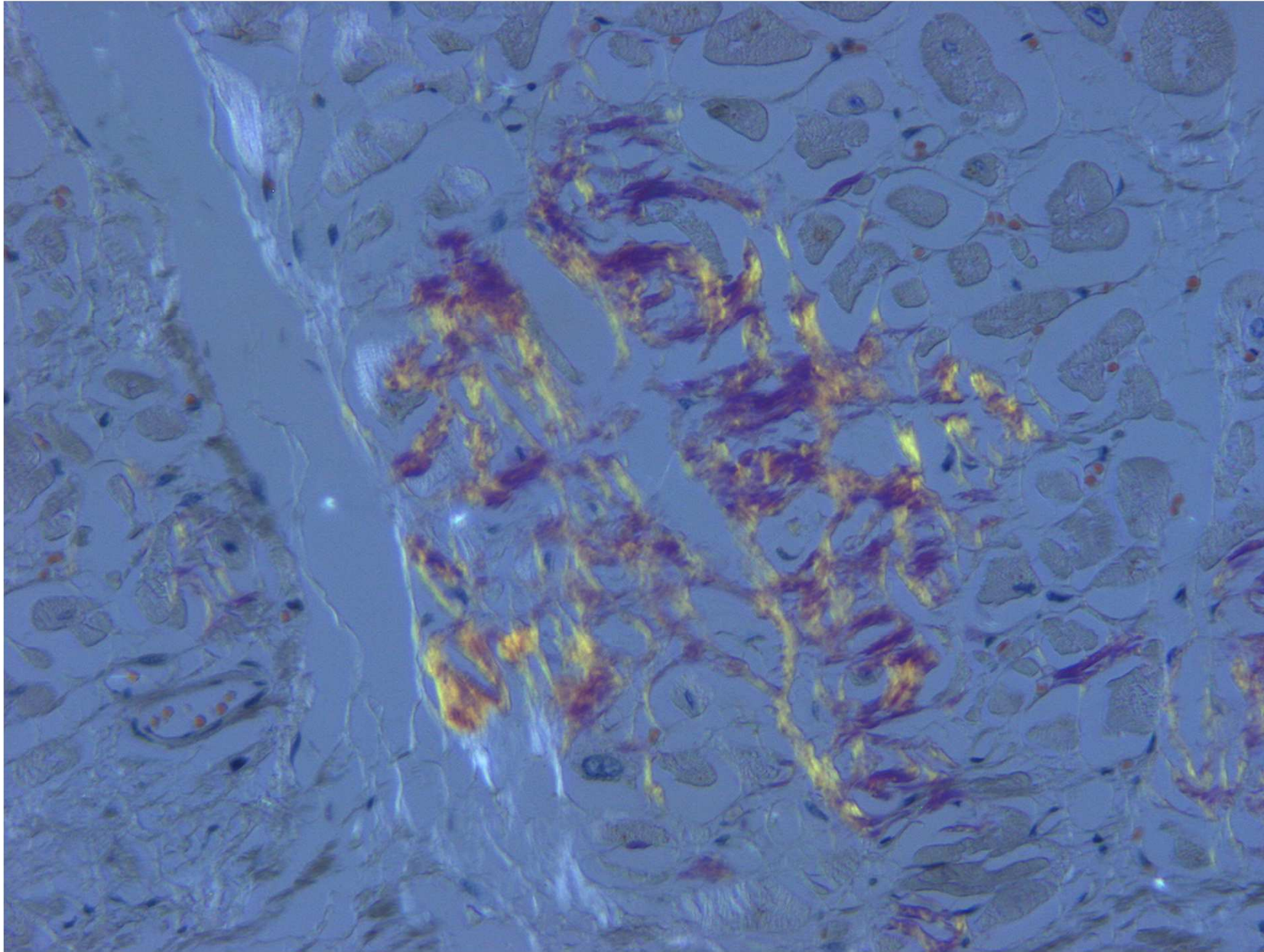
Urátové krystaly (dna)



Podslizniční vazivo jazyka
(Kongo červeň)



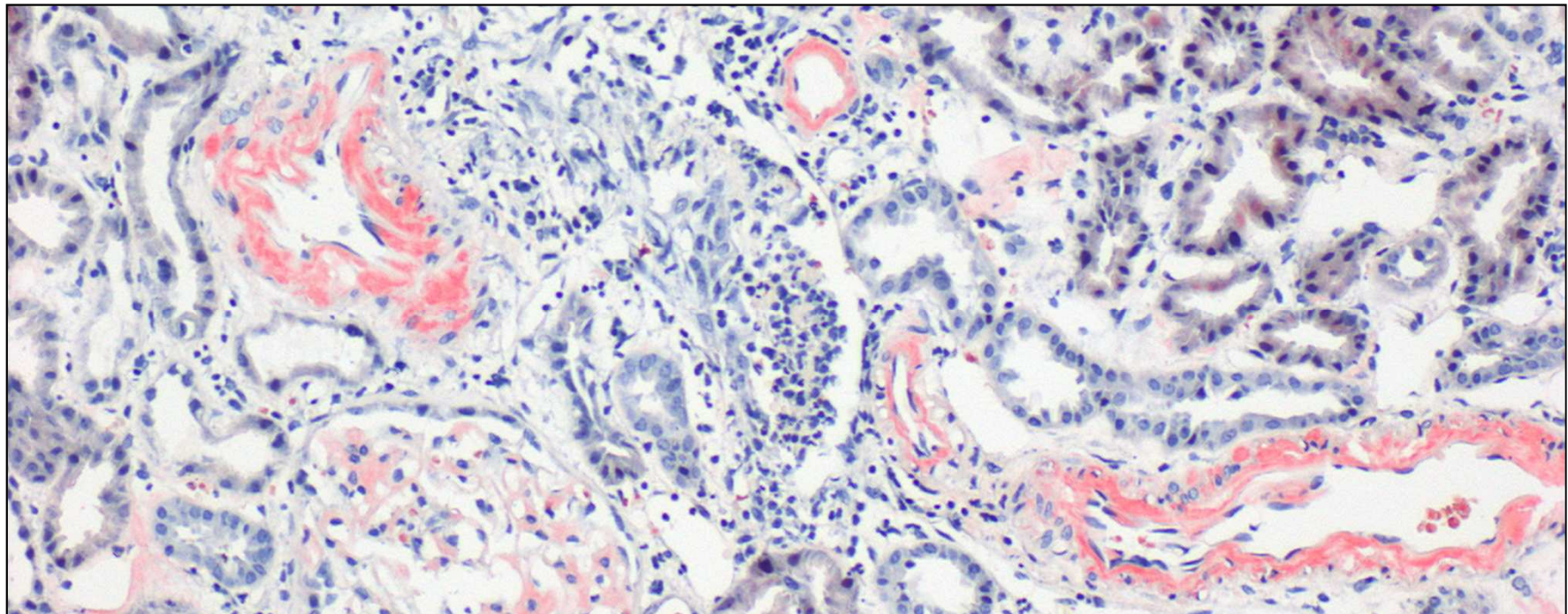
Podslizniční vazivo jazyka (**hematoxylin-eozin**)



Bílá birefringence vaziva + zelenooranžová birefringence amyloidu
v myokardu

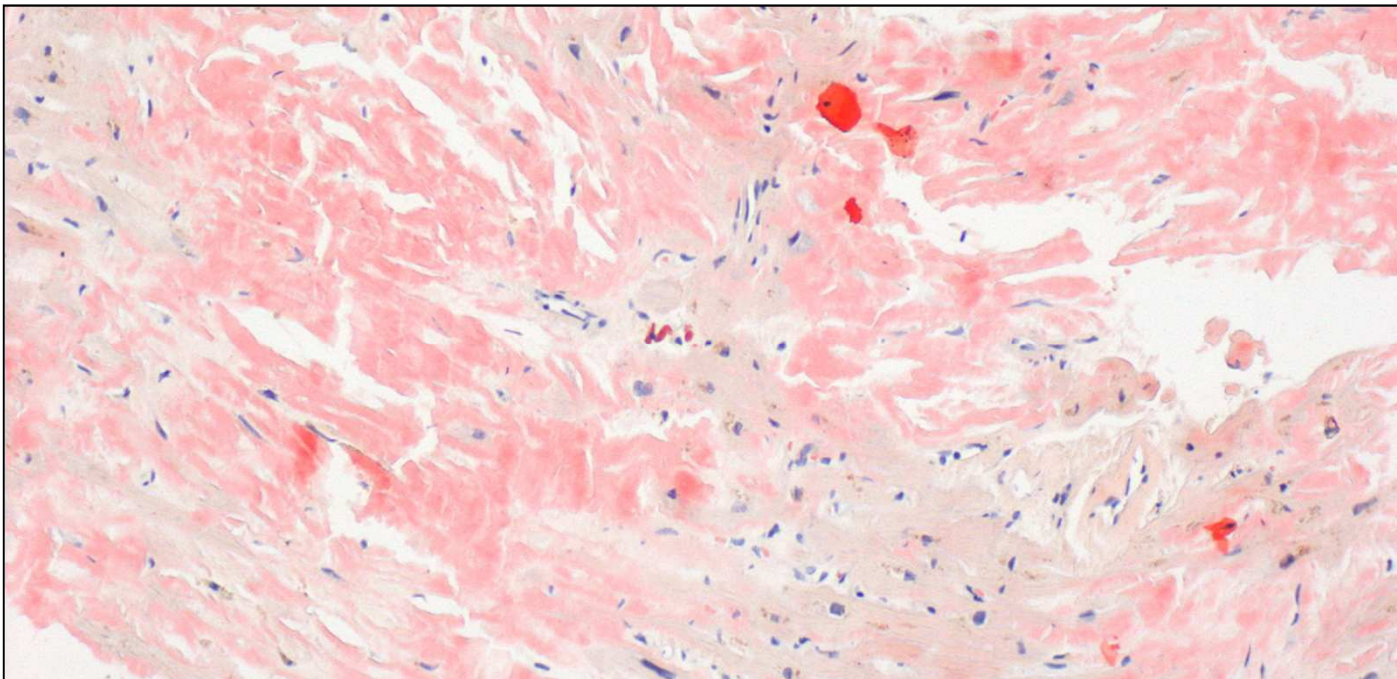
Výskyt amyloidu ve tkáních

- ***stěny cév***
- intersticiium
- oblast bazálních membrán



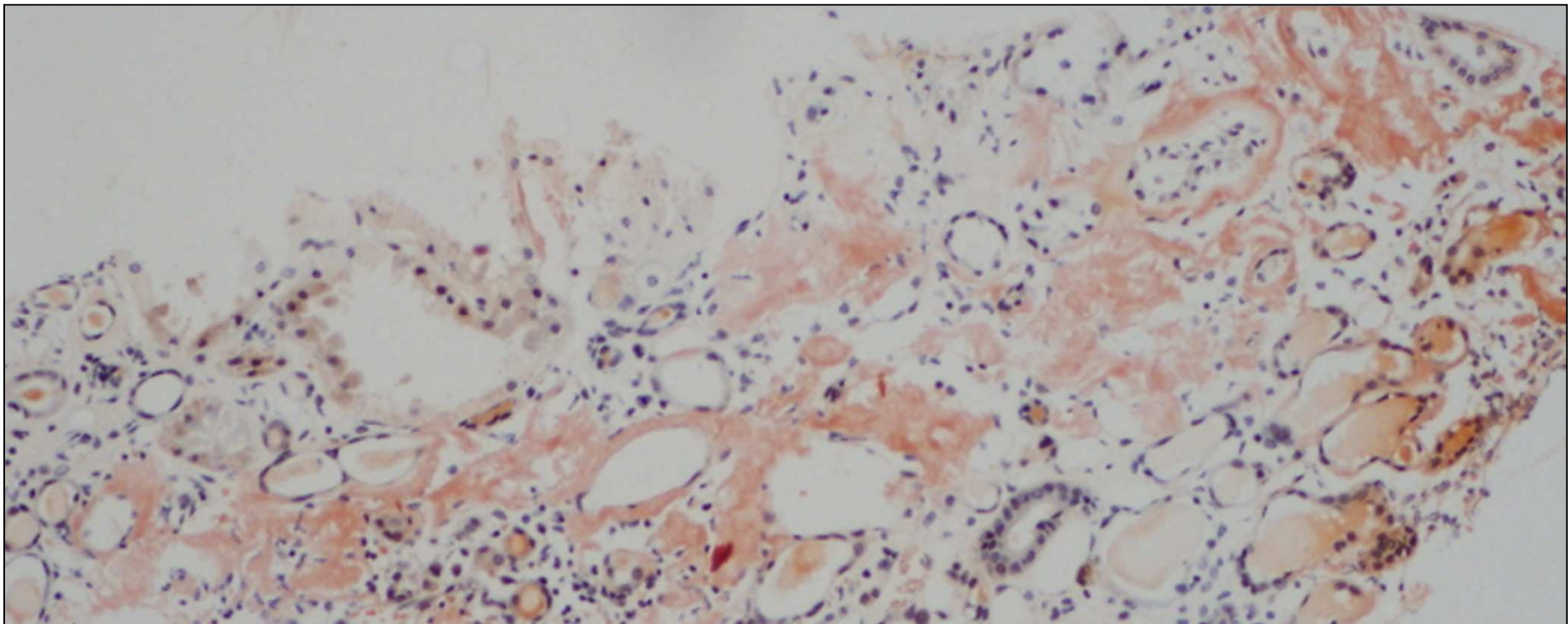
Výskyt amyloidu ve tkáních

- stěny cév
- ***intersticiium***
- oblast bazálních membrán

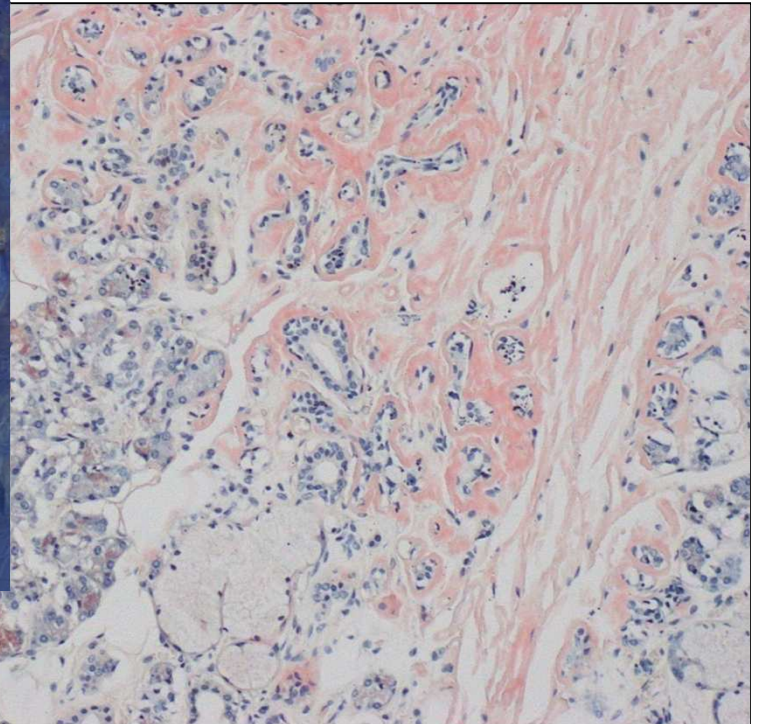
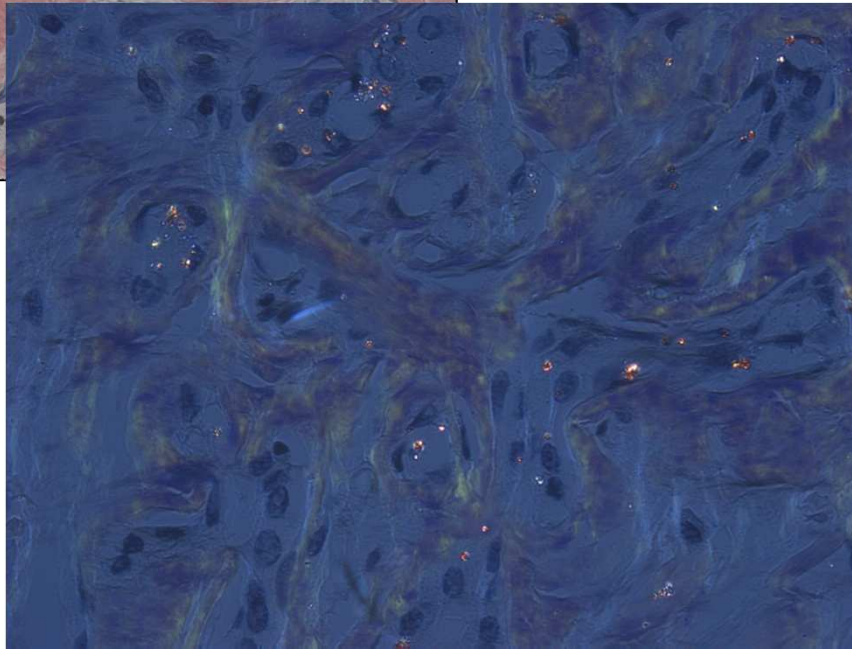
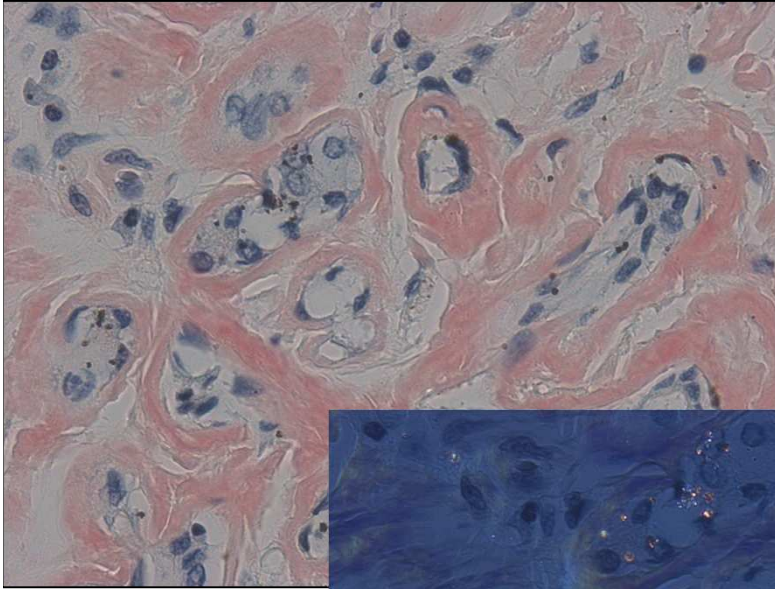


Výskyt amyloidu ve tkáních

- stěny cév
- intersticiium
- ***oblast bazálních membrán***



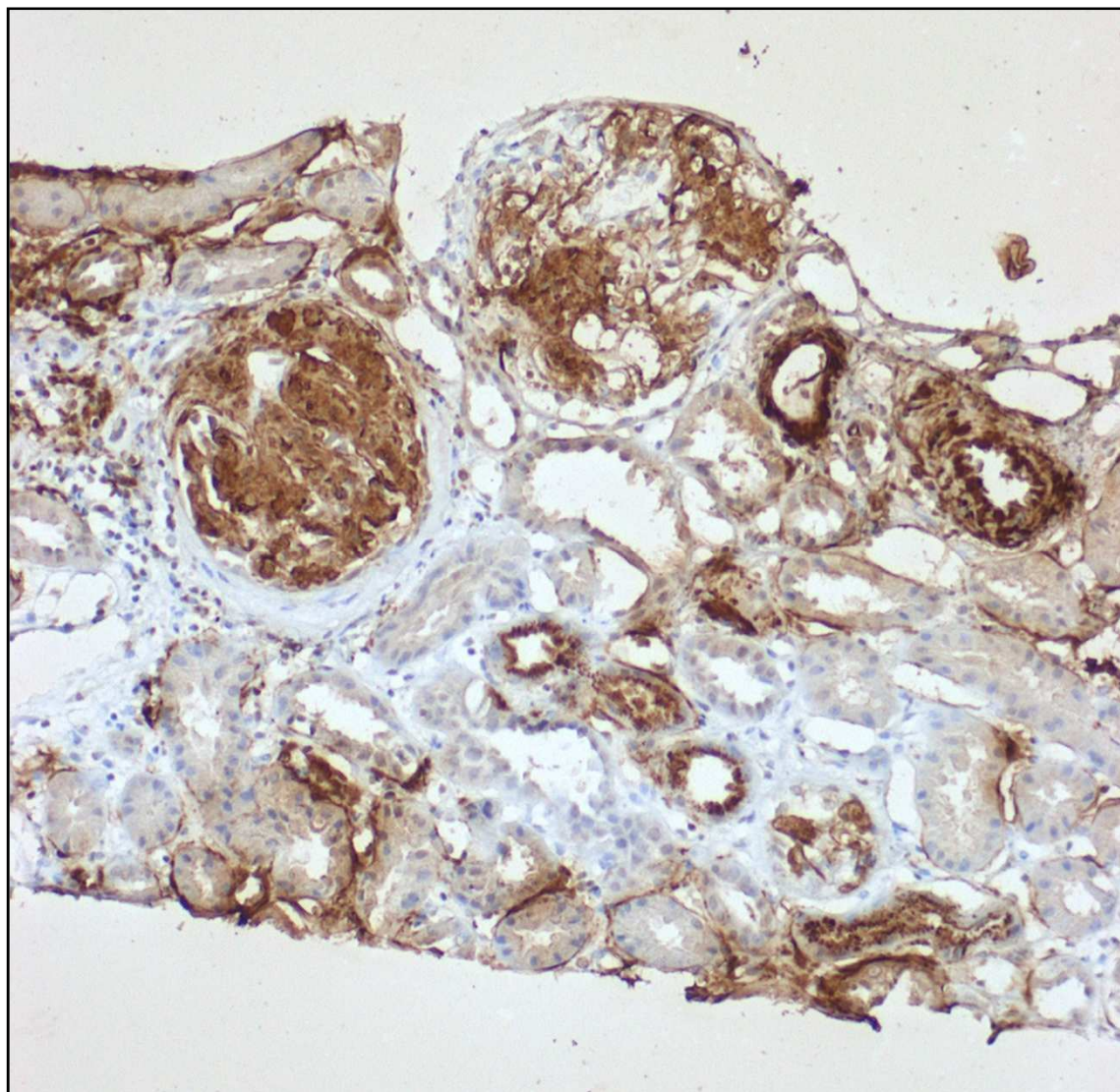
Méně časté lokalizace amyloidu



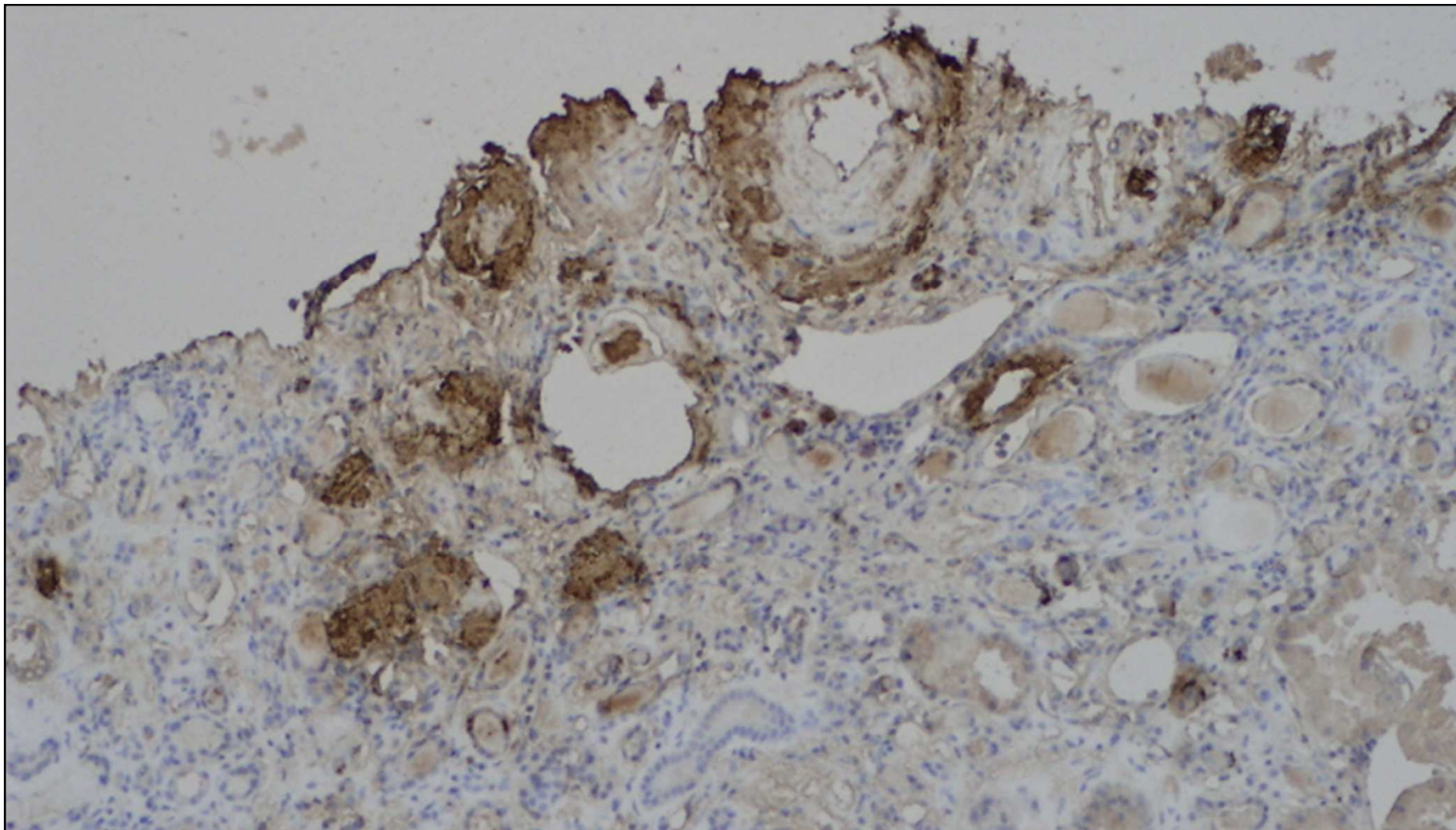
Imunohistochemické vyšetření

- průkaz amyloidu metodou nepřímé imunohistochemie
- formalinem fixovaná tkáň zalitá do parafinu
- s dobrou výpovědní hodnotou vyšetřujeme přítomnost amyloidu na bázi sérového amyloid-asociovaného proteinu A
 - „**Anti-Human Amyloid A, Clone mc1**“ (monoklonální myší protilátka, Dako)
- a na bázi transthyretinu – „**Anti-Human Prealbumin**“ (polyklonální králičí, Dako)

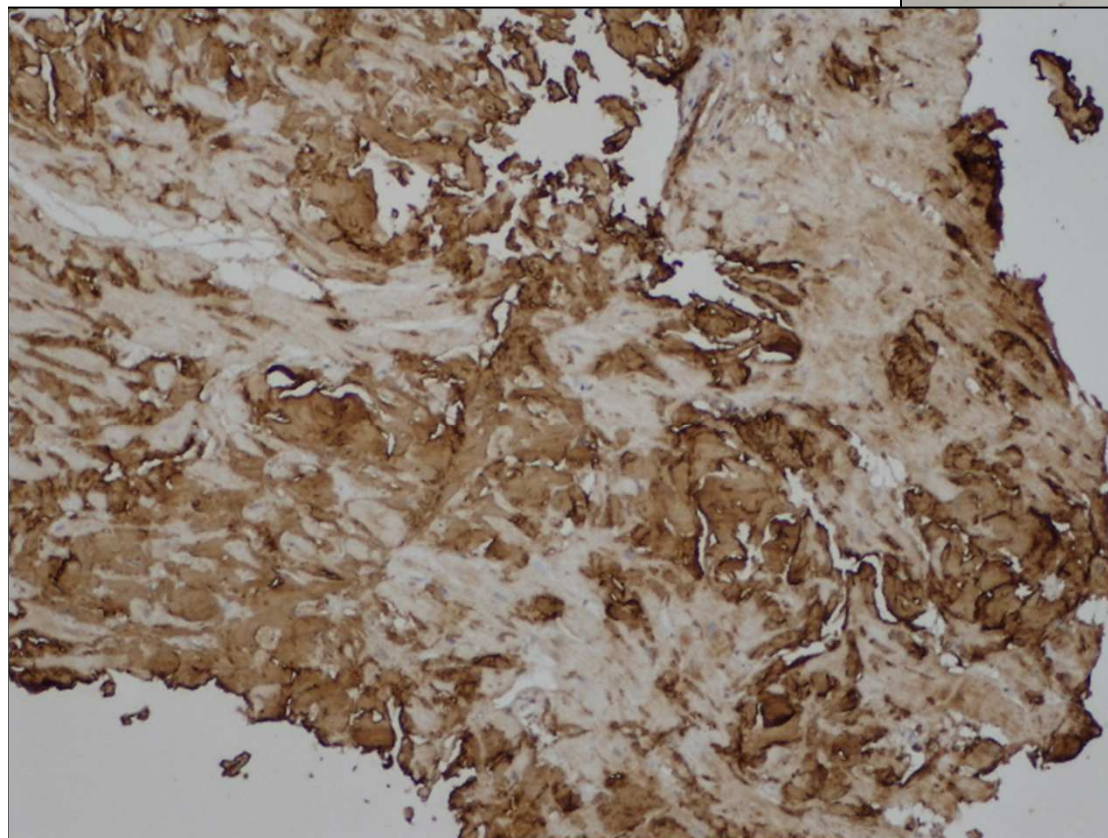
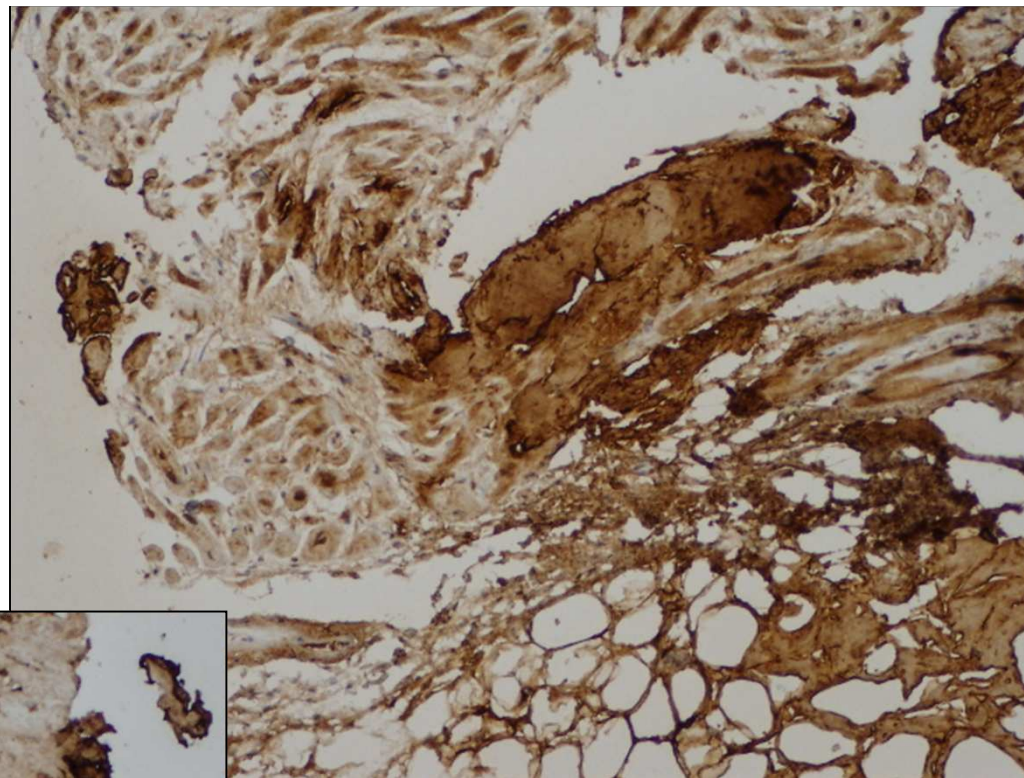
Amyloid A, punkční biopsie ledviny



Amyloid A, punkční biopsie ledviny



**Transthyretin
endoskopická biopsie myokardu**



Imunohistochemické vyšetření lehkých řetězců imunoglobulinů kappa/lambda

- ztíženo přirozenou variabilitou N-terminálních částí řetězců
- široké spektrum komerčně dostupných protilátek + individuálně připravované protilátky pracovišť zabývajících se amyloidózou

Imunohistochemické vyšetření – rozšíření spektra

- nespecifické součásti všech typů amyloidu
 - SAP – sérový amyloidový protein P
- vzácné proteiny systémových amyloidóz
 - apolipoprotein A1
 - fibrinogen
 - lysozym

Vysoce validní vyšetření – hmotnostní spektrometrie

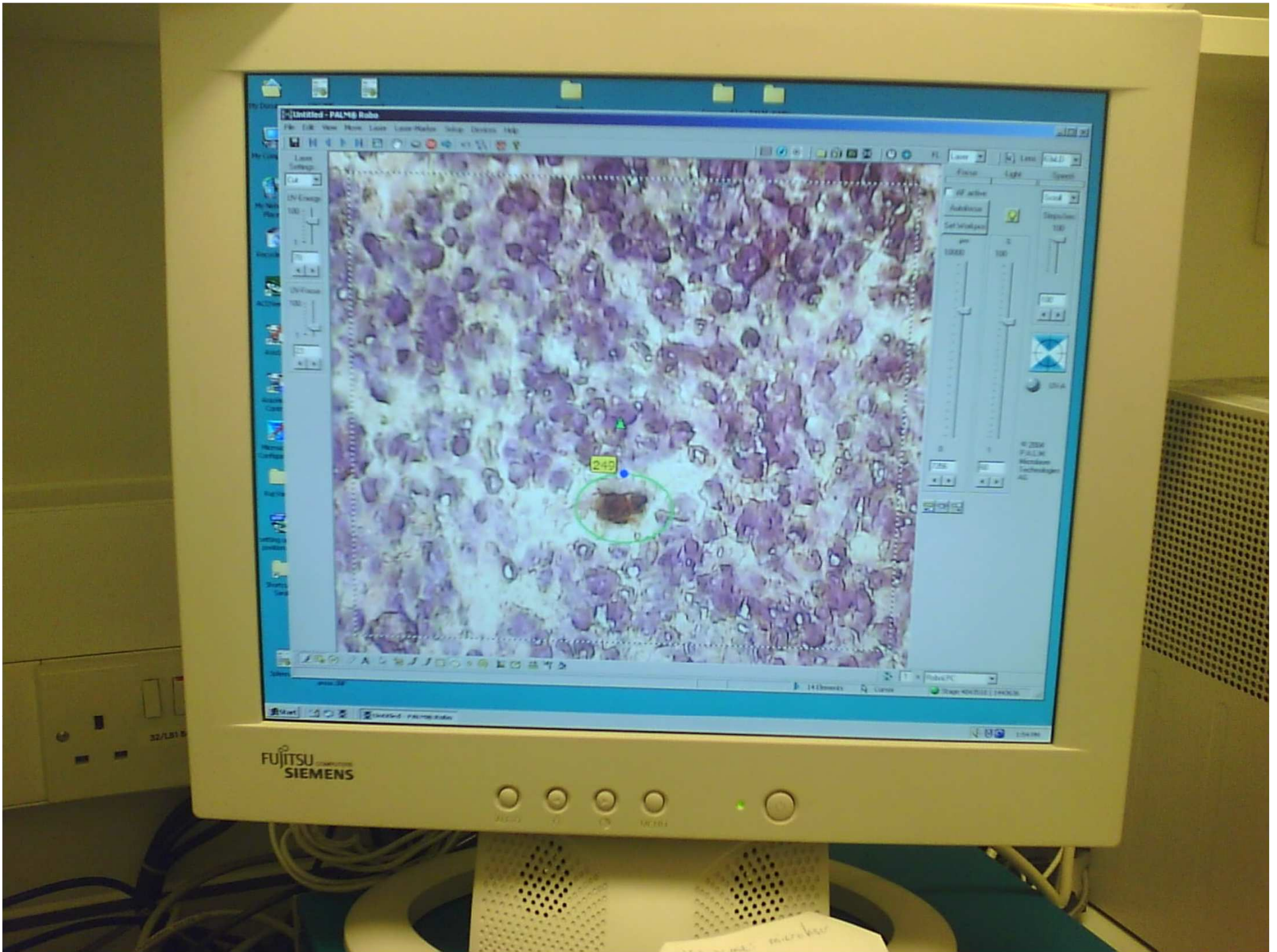
Laserová mikrodisekce

- první krok na cestě k diagnóze pomocí hmotnostní spektrometrie









Untitled - PALM Robo

Edit View Move Laser Laser-Marker Setup Devices Help



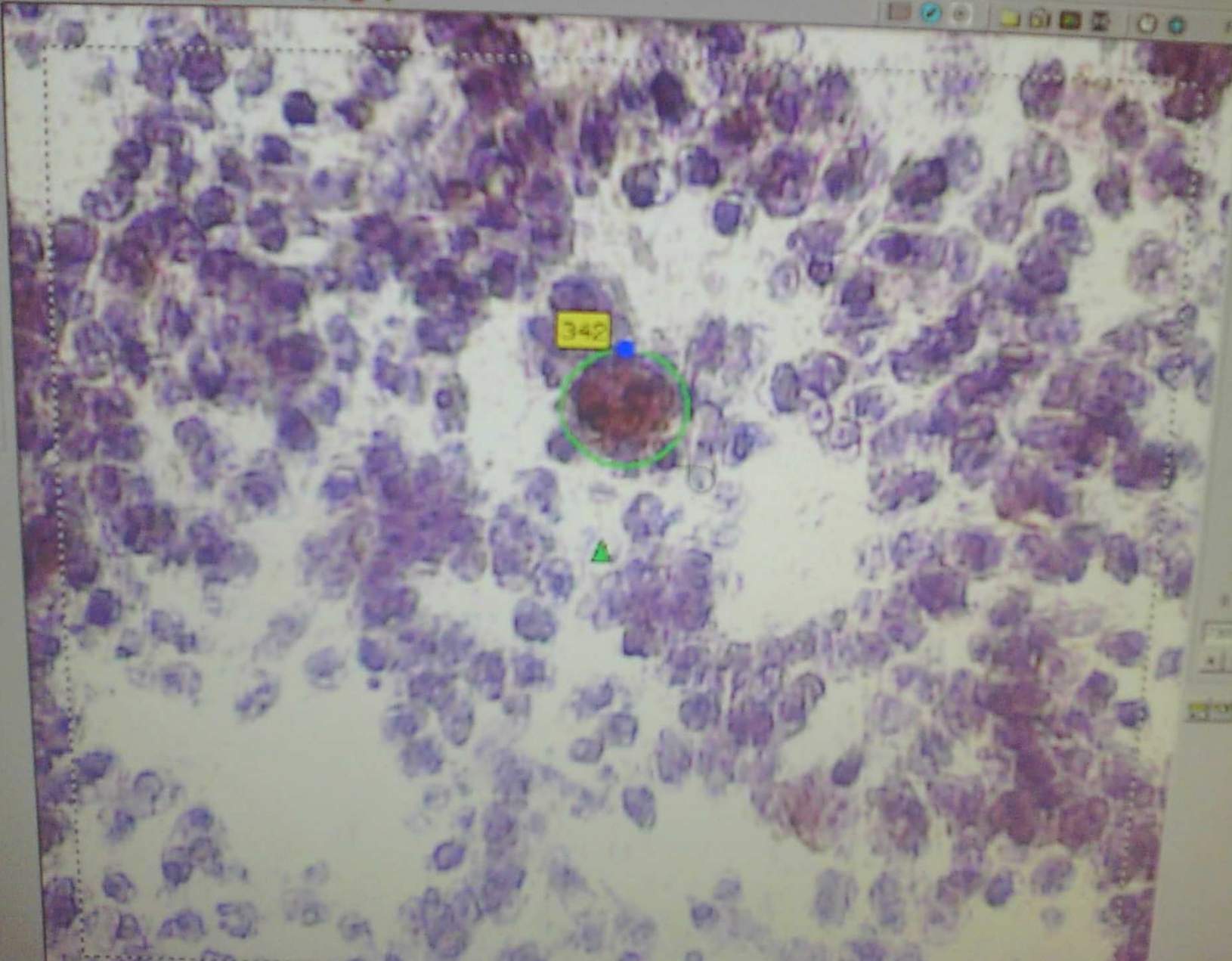
Laser settings:

Wavelength: 71

V-Energy: 100

UV Focus: 100

22



Focus: 100

AF active

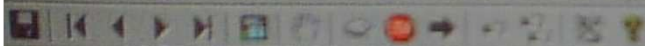
Autofocus

UV Wavelength

10000

100

71



Laser Settings:

Cut

UV-Energy

100

1

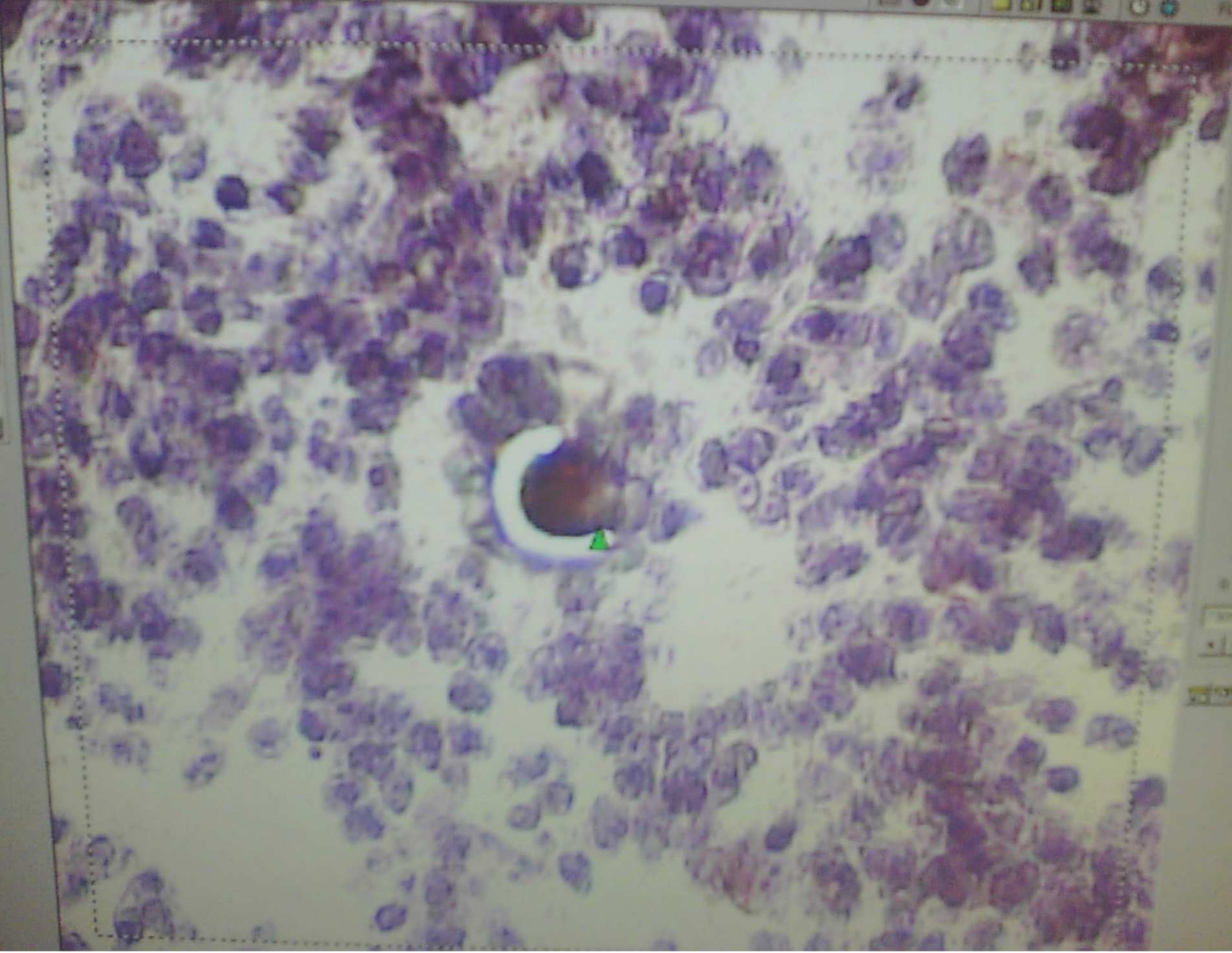
71

UV-Focus

100

1

22



FL: Laser

Focus

All active

Autofocus

Set Workpos

µm

10000

0

1

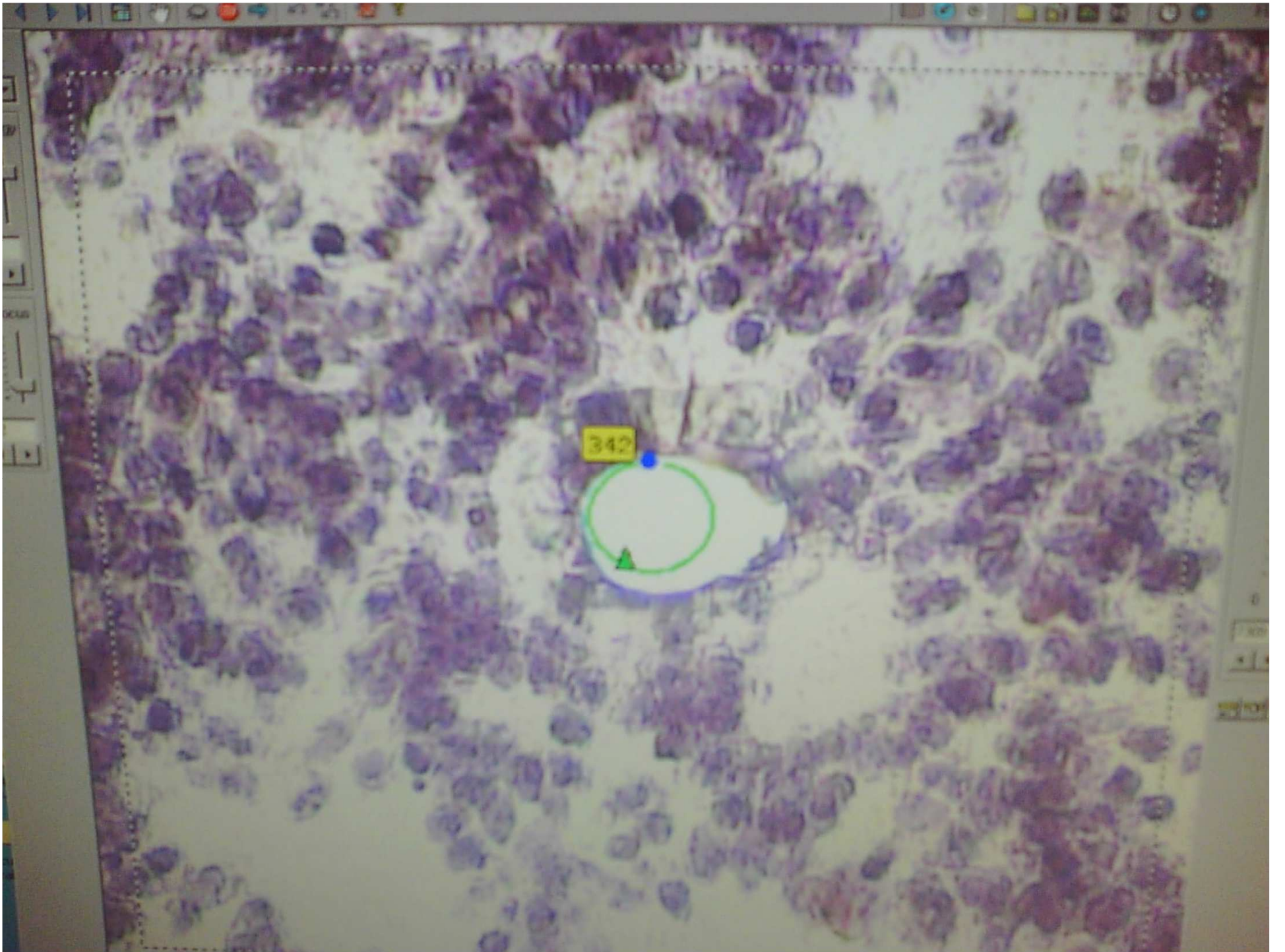
100

71

Setting a
location

21

Shortcu
Sere



Závěrem

- histochemie s imunotypizací amyloidu
- hmotnostní spektrometrie po laserové mikrodisekci
- **mezioborová spolupráce**
 - **komplexní diagnostika s možnou volbou terapie**

