

4 VYŠETŘOVACÍ TECHNIKY U SYSTÉMOVÉ AL AMYLOIDÓZY

4.1 Přehled vyšetřovacích metod

Vzhledem k neuspokojivým výsledkům léčby pokročilé fáze systémové AL amyloidózy je naléhavým požadavkem rozpoznat onemocnění již v jeho počáteční fázi. Klíčovým předpokladem správné diagnózy je požadavek, aby lékaři v klinické praxi na toto onemocnění mysleli. K podezření na diagnózu AL amyloidóza by měla vést zejména přítomnost nefrotického syndromu s případnou renální insuficiencí, nedilatační kardiomyopatie s restriktivním plněním, nejasné periferní a/nebo autonomní neuropatie a ostatních klinických, resp. mnohotvárných subjektivních příznaků a ob-

jektivních příznaků (tab. 3.1, kap. 3. Klinický obraz systémové AL amyloidózy). Za těchto okolností je povinností lékaře pátrat po přítomnosti Mlg standardní a imunofixační elektroforézou séra, resp. zvýšených hladinách VLŘ včetně patologie poměru κ/λ (Freelite) a v případě jejich přítomnosti odeslat nemocného k dovyšetření na nejbližší hematologické oddělení (Bird, 2004; Ščudla, 2009; Gertz, 2009 a 2010). Včasné rozpoznání systémové AL amyloidózy vyžaduje vedle dobré znalosti nemoci i notnou dávku diagnostické invence. Přehled základních i výběrově indikovaných vyšetření při podezření na systémovou AL amyloidózu je uveden v tab. 4.1 (Dispenzieri, 2012), vlastní diagnostický algoritmus je shrnut v tab. 5.1 (kap. 5. Diagnostická kritéria a postupy u systémové AL amyloidózy).

Tab. 4.1 Přehled vyšetření nezbytných pro diagnózu a určení stadia AL amyloidózy (volně dle Dispenzieri, 2012)

<p>Všichni nemocní</p> <p>Tkáňová biopsie Necílená, případně cílená biopsie orgánů Barvení konžskou červení s průkazem metachromazie v polarizovaném světle Určení typu prekuzového proteinu některou z dostupných metod (imunohistochemie či imunofluorescence imuno-elektronová mikroskopie, hmotnostní spektrometrie)</p> <p>Vyšetření krve a kostní dřeně Vyšetření krevního obrazu Vyšetření kostní dřeně (aspirační a biopsické) včetně M-FC a imunohistochemie</p> <p>Biochemické vyšetření séra Alkalická fosfatáza (jaterní frakce) a GMT (časný signál infiltrace jater), bilirubin, kreatinin a glomerulární filtrace, albumin, kyselina močová, troponin, NT-proBNP (event. BNP), TrT, VLŘ séra (včetně indexu κ/λ), standardní gelová a imunofixační elektroforéza séra, hladina f. X</p> <p>Vyšetření moče/24 hod. Proteinurie/24 hod., případně PCR („protein/creatinin ratio“), dále i imunofixační vyšetření moče</p> <p>Vyšetření srdce RTG hrudníku EKG Echokardiografie včetně tkáňové dopplerometrie Holterovské monitorování srdeční činnosti</p> <p>Výběrová indikace dle klinického obrazu Ultrazvukové (případně CT) vyšetření jater a sleziny MRI srdce HR-CT vyšetření plic Spirometrické vyšetření plic EMG Vyšetření vegetativních funkcí (Ewingův test) Endoskopie GIT Vyšetření stolice na tuky Hladina karotenu v séru Prealbumin HLC, včetně indexu HLC κ/λ (Hevylite)</p>
--

M-FC – multiparametrická průtoková cytometrie, NT-proBNP – propeptid mozkového natriuretického peptidu, VLŘ – volně lehké řetězce imunoglobulinu, EKG – elektrokardiografie, CT – počítačová tomografie, RTG- standardní radiografie, MRI – magnetická rezonance, RTG – radiografie, HR – CT – „high resolution“ počítačová tomografie, EMG – elektromyografie, GIT – gastrointestinální trakt, HLC- vyšetření párů těžkých/lehkých řetězců Mlg („heavy/light chain“)

4.2 Standardní techniky v diagnostice systémové AL amyloidózy

4.2.1 Histologie, imunohistochemie, imuno-elektronová mikroskopie

Histologické vyšetření v základním a speciálním barvení. Depozita amyloidu lze ve většině případů rozpoznat již v základním barvení histologických preparátů (hematoxylin-eosin), kde se znázorní jako amorfni eozinofilní, tj. světle červený materiál. Jeho výskyt ve tkáních je variabilní – ukládá se ve stěnách cév, v intersticiu i v oblasti bazálních membrán. Pro specifické znázornění amyloidu existují speciální barvicí metody a v současnosti je nejčastěji používáno barvení konžskou červení. Ve výsledku nejpožívanějšího barvení konžskou červení poskytují depozita amyloidu oranžové až červené zbarvení, a to bez závislosti na typu amyloidu (Vacek, 1988). Při vyšetření polarizačním mikroskopem pozorujeme charakteristické jevy, které dává konžská červeně ve vazbě na amyloid. Jedná se o dvojlom („birefringence“) a dichroismus, které se nejčastěji uvádí „apple-green“ barevného charakteru (Gertz, 2010; Howie, 2008). Speciální barvicí metody dávají dobrý výsledek při klasickém zpracování histologického materiálu – fixace formalinem a zalití do parafinu. Kvalitnějšího výsledku však dosáhneme barvením zmrazených řezů nefixované tkáně. Histologické vyšetření trepanobiopického vzorku kostní dřeni s nálezem plazmocelulární dyskrázie může podpořit diagnózu AL amyloidózy. Zde je však nutná obezřetnost, neboť koincidence hereditární amyloidózy a MG je popsána u 3-10 % pacientů (Schönland, 2012; Lachmann, 2002). U nemocných se systémovou AL amyloidózou lze ve vysokém procentu případů prokázat morfologicky a imunohistochemicky přítomnost alespoň asymptomatické formy MM dle kritérií IMWG (Dinner, 2013).

Imunohistochemické vyšetření. V současné diagnostice AL amyloidózy je standardem typizace amyloidu pomocí metody nepřímé imunohistochemie (IHC). Do rutinní praxe patří zejména vyšetření protilátkami proti κ a λ LŘ imunoglobulinů, transthyretinu a amyloidu A, přičemž spektrum komerčně dostupných protilátek zejména proti hereditárním formám amyloidózy se stále rozšiřuje. Senzitivita IHC vyšetření amyloidu AL typu je ztížena několika okolnostmi: odběr materiálu, způsob a délka fixace, maskování antigenu, přirozená heterogenita lehkých řetězců plynoucí z jejich variabilních domén. Z těchto důvodů někteří patologové preferují provádění imunofluorescenčního vyšetření vzorků ze zmrazené tkáně. Rozpoznávání epitopů jednotlivými protilátkami může být odlišné. To je také důvodem skutečnosti, že se závěry studií,

kteří zkoumají spolehlivost IHC vyšetření v určování subtypů amyloidózy, často značně liší. V současné době je možné využít více polyklonálních i monoklonálních protilátek proti epitopům κ i λ LŘ. Aplikace 4 různých protilátek proti λ LŘ Mlg zvyšuje validitu vyšetření AL amyloidu a v kombinaci se souvisejícími klinickými a laboratorními vyšetřeními je IHC v určení typu amyloidu dostatečně spolehlivou metodou, senzitivita v tomto případě dosahuje 94 % a specifická 100 % (Schönland, 2012).

Fluorescenční vyšetření. Vyšetření amyloidu pomocí fluorescenčního mikroskopu lze provést metodou přímé a nepřímé fluorescence. Přímá fluorescence je umožněna přímou vazbou fluorochromu na amyloid, což nastává v případě barvení parafinového řezu konžskou červení, která sama o sobě je fluorochromem. Ve srovnání s vyšetřením pouze polarizačním mikroskopem vykazuje fluorescenční vyšetření vyšší senzitivitu zejména v případech málo objemných depozit amyloidu (Marcus, 2012). Zcela stěžejní, dnes již standardní metodou je tzv. nepřímá imunofluorescence s využitím komerčně dostupných protilátek proti LŘ imunoglobulinů, které jsou značeny fluorochromem (Said, 2013). Pro imunofluorescenci je nutné použít řezy, které jsou připraveny ze zmrazené nefixované tkáně.

Elektronová mikroskopie. Charakteristickou fibrilární strukturu amyloidu lze prokázat vyšetřením elektronovým mikroskopem, který znázorní nevětvené splétající se mikrofibrily šíře 7,5 – 10 nm, tvořící nepravidelnou síť. Stavba jednotlivých fibril se liší v závislosti na amyloidogenním proteinu. Vysoce specializovaná pracoviště mají k dispozici imuno-elektronovou mikroskopii, která spojuje výhody vysokého rozlišení elektronového mikroskopu se specifitou reakce antigen-protilátka a umožňuje ověřit koincenci imunohistochemické reakce v místě amyloidové fibrily (Steusloff, 2000; Arbustini, 2002).

Podrobnější informace, věnované histologické diagnostice AL amyloidózy a ostatních typů amyloidóz bude možné nalézt v připravovaných „guidelines“ Společnosti českých patologů ČLS JEP (*Doporučený postup pro histopatologickou diagnostiku amyloidu/amyloidózy, v přípravě*).

4.2.2 Průkaz Mlg a VLŘ v séru a/nebo moči

Průkaz přítomnosti Mlg a patologické hladiny volných lehkých řetězců (VLŘ) včetně abnormálního poměru κ/λ je základním stavebním kamenem v diagnostice systémové AL amyloidózy. Standardní elektroforéza bílkovin séra je stále základní, ovšem málo citlivou metodou, odhalující přítomnost Mlg pouze u ~ 50 % AL amyloidóz, přičemž hodnota M-proteinu nebývá vysoká

(u ~ 70 % jedinců je < 20 g/l) (Gertz, 2009; Bradwell, 2010). Proto základním vyšetřením je imunofixační elektroforéza (IFE), odhalující přítomnost Mlg nebo LŘ v 71, resp. 84 %, nikoliv tedy u všech nemocných. Předností IFE je schopnost detekce kteréhokoliv imunochemického typu Mlg, a to i v případě, že se vyskytuje v séru a/nebo v moči v malém množství. Nevýhodou IFE je nemožnost monitorování průběhu léčby, neboť neposkytuje kvantitativní výsledky (Gertz, 2009; Bradwell, 2010; Maisnar, 2012). Většina nemocných se systémovou AL amyloidózou se vyznačuje nízkou hladinou nebo chyběním intaktního Mlg, charakteristické je zvýšení hladiny VLŘ λ nebo κ (Rajkumar, 2013). Nutno připomenout, že průkaz Mlg nesvědčí s jistotou pro AL amyloidózu, neboť se vyskytuje i u jisté části nemocných s hereditární ATTR amyloidózou (Bird, 2004). V současnosti je proto již naprosto standardním a neopominutelným postupem kvantitativní stanovení sérové hladiny VLŘ, včetně indexu κ/λ s pomocí nefelometrické nebo turbidimetrické techniky (Freelite TM), dosahující při kombinaci s IFE 99% senzitivity (Gertz, 2009; Bradwell, 2010; Katzmann, 2005; Vávrová, 2012). Zvýšená hladina VLŘ v séru spolu s patologií indexu κ/λ se vyskytuje u AL amyloidózy v 86-98 % a vydává vlastně zprávu o výši prekurzorového proteinu a koreluje s náloží amyloidu (Lachmann, 2003; Comenzo, 2012). Spolu s imunohistochemickým vyšetřením kostní dřene (index κ/λ CD138 pozitivních plazmocytů) umožňuje analýza hladin VLŘ odhalení monoklonality plazmocelulárního procesu. Její nevýhodou je chybějící specifita pro AL amyloidózu, neboť abnormální hodnoty VLŘ se vyskytují u poloviny nemocných s MGUS a prakticky u všech nemocných s MM (Bird, 2004). Sledování pohybu sérových hladin VLŘ u AL amyloidózy je metodou volby při monitorování a hodnocení hloubky léčebné odezvy (kap. 8. Léčba systémové AL amyloidózy), současně hodnota při diagnóze je velmi důležitým prognostickým faktorem s úzkým vztahem k celkovému přežití (Palladini, 2010). Koncentrace VLŘ v séru je jedním z 3 základních kritérií recentního revidovaného stratifikačního systému AL amyloidózy (kap. 12. Prognóza pacientů s AL amyloidózou).

4.2.3 Zobrazovací techniky u systémové AL amyloidózy

Využití zobrazovacích metod u AL amyloidózy sleduje 2 hlavní aspekty, tj. morfologické a funkční posouzení orgánového postižení amyloidem (zejména myokardu). K detekci amyloidových depozit v organismu lze využít i scintigrafické vyšetření.

Radiografické vyšetření (RTG). Radiografické vyšetření v diagnostickém algoritmu samotné amyloidózy nemá větší diagnostický přínos a dominantně je využíváno k vyloučení osteolytického postižení a tím

i asociace systémové AL amyloidózy s MM (kap. 7. Systémová AL amyloidóza a mnohočetný myelom). Radiografické vyšetření skeletu by tedy mělo být provedeno u všech nemocných s nově rozpoznanou AL amyloidózou. Pomocí RTG hrudníku lze prokázat rozšíření srdečního stínu s městnáním v malém oběhu, pleurální výpotek a vzácně postižení plic v rámci AL amyloidózy. V případě dialyzační ($A\beta 2M$) amyloidózy může planární RTG vyšetření zobrazit periartikulární cystické kostní léze, známky spondylartropatie či destruktivní artropatie (Georgiades, 2004).

Počítačová tomografie (CT). CT vyšetření má u systémové amyloidózy limitovaný význam zejména z důvodu nízké specifity a hlavní využití představují ložiskové formy onemocnění zejména v oblasti orbity, nasofaryngu či laryngu. Dominantně je však CT vyšetření využíváno k detekci amyloidózy v oblasti tracheobronchiálního stromu (fokální nebo difúzní submukózní depozita zobrazující se jako noduly, plaky či cirkulární ztluštění stěny) a k posouzení postižení plicního parenchymu (nodulární parenchymatózní amyloidóza nebo difúzní alveolární septální amyloidóza). CT vyšetření břicha je přínosné v diagnostice a diferenciální diagnostice jaterního postižení, přičemž diagnostická kritéria vyžadují hepatomegalii > 15 cm.

Ultrazvukové vyšetření (UZ). Doménou ultrazvukové diagnostiky u AL amyloidózy je echokardiografické (ECHO) posouzení srdečního postižení. ECHO je v současnosti stěžejní metodou pro diagnostiku a sledování srdečního postižení při amyloidóze. Kritériem postižení je koncentrická hypertrofie myokardu levé komory s diastolickou šíří interventrikulárního septa > 12 mm při absenci hypertenze nebo jiné příčiny hypertrofie myokardu (Gertz, 2005). Dalšími ECHO nálezy jsou diastolická dysfunkce s restriktivním plněním levé komory a ztrátou longitudinální kontraktility (zejména septa), snížená ejekční frakce, dilatace levé síně a přítomnost chlopenních vad. Typickým nálezem je sonografický obraz jemně granulovaného myokardu („granular sparkling“) (Fikrle, 2012; Esplin, 2013). ECHO je spolu se stanovením kardiálních biomarkerů stěžejní metodou v hodnocení orgánové léčebné odpovědi, resp. progresu onemocnění. Vybraná pracoviště dnes využívají nových echokardiografických modalit k detailnímu posouzení srdečního postižení, tj. tkáňový doppler („strain, speckle cracking“) (Piper, 2010; Koyama, 2010).

Magnetická rezonance (MRI). Stejně jako v případě UZ vyšetření je magnetické rezonance využíváno zejména v hodnocení srdečního postižení. Vyšetření srdce magnetickou rezonancí umožňuje morfologické a funkční zobrazení, navíc při užití kontrastního vyšetření gadoliniem dovoluje posouzení rozsahu imbibice

myokardu amyloidovými masami. Fenomén pozdního syčení („delayed enhancement“) ve své difuzní subendokardiální či méně časté transmuralní formě zobrazení je nález charakteristický pro postižení myokardu amyloidem (Maceira, 2005; Hosch, 2008; Ruberg, 2009). Vyšetření je vysoce senzitivní a specifické, nicméně pro využití ke sledování nemocných a posuzování léčebné odpovědi nejsou zatím k dispozici dostatečná data. MRI je užitečná i v posuzování ložiskové amyloidózy v oblasti laryngu, nasofaryngu, míchy či urogenitálního traktu (Georgiades, 2004).

Radioscintigrafie s využitím sérového amyloidového proteinu P. Radioscintigrafie s využitím značeného ^{123}I -SAP je neinvazivní, kvantitativní a velmi citlivá metoda (u AL a AA amyloidózy 90% senzitivita) pro celotělovou detekci orgánové distribuce amyloidu s dobrou vizualizací depozit v ledvinách, játrech, kostech, slezině a nadledvinkách a tím i vhodnou technikou k monitorování výsledků léčby. Umožňuje vizualizaci amyloidových depozit i v orgánech bez známek klinického postižení a v případě nemožnosti bioptického vyšetření (Hawkins 2002; Palladini, 2010). Celosvětově nízká dostupnost ^{123}I -SAP je podmíněna potenciálním rizikem přenosu infekce, v ČR proto není tato metoda zavedena.

4. 3 Speciální diagnostické techniky u systémové AL amyloidózy

4. 3. 1 DNA analýza

Analýza DNA je důležitým diagnostickým krokem zvláště pro stanovení hereditárních amyloidóz, což jsou onemocnění s geneticky podmíněnou změnou struktury proteinu. Pro genomické vyšetření pacientů s podezřením na hereditární formu amyloidózy je užívána detekce nukleových kyselin pomocí metody PCR (polymerázová řetězová reakce) s následným zjišťováním pořadí nukleových kyselin v polynukleotidovém řetězci (tzv. sekvenování). Cílem je zjistit možnou záměnu nukleotidu ve sledovaném genu, která následně může způsobit záměnu aminokyseliny v polypeptidovém řetězci, patologickou konformaci proteinu a tím i jeho dysfunkci. Jde o relativně jednoduchou metodiku zavedenou do praxe nejméně na dvou pracovištích v České republice. Pro klinické lékaře je důležité znát praktické aspekty vyšetření. Jde o vyšetření DNA z periferní krve, tedy běžný rutinní odběr nezatěžující nemocného. Pro vyšetření je nutné odebrat 5 ml periferní krve do sterilní a dostatečně označené zkumavky s 0,3 ml 0,5M EDTA. Plná krev v EDTA určená pro vyšetření PCR se nesmí zmrazovat, může se uchovávat při +4 °C a musí být v den odběru transportována k vyšetření. Pro dopravu

je nutno vzorky zabezpečit proti teplotním výkyvům. Pro Českou republiku tuto analýzu provádí pracoviště v Praze a Ostravě.

4. 3. 2 Hmotnostní spektrometrie

Určení druhu amyloidózy musí být založeno na typizaci amyloidu, nelze spoléhat pouze na klinické příznaky či určení získané pouze z analýzy DNA (Picken, 2011). Imunohistochemické i imunofluorescenční stanovení amyloidu má své limitace, jako jsou nízká citlivost a specifita pro některé proteiny, neexistence celého spektra protilátek proti všem amyloidogenním proteinům, vysoké pozadí barvení u FFPE (formalínem fixovaná tkáň v parafinu) vzorků komplikující odečítání. Nejednoznačné výsledky by měly být dále potvrzeny pomocí sofistikovanější metody (Picken, 2010; Loo, 2011).

Hmotnostní spektrometrie (MS) umožňuje vysoce informativní, spolehlivou a dostatečně citlivou detekci proteinů v biologickém materiálu. Může být využívána jako ideální nástroj pro typizaci a studium systémových amyloidóz, který dokáže překonat limitace imunohistochemických metod (Loo, 2011). Tato metoda umožňuje semikvantitativně stanovit množství hledaného proteinu v tkáni a spolehlivě tak identifikovat čtyři nejběžnější typy systémové amyloidózy: AL (κ a λ), ATTR a AA (Brambilla, 2013). Proteomika dále umožňuje rozpoznat ale i méně časté typy systémových amyloidóz nebo identifikovat posttranslační změny proteinů spojených s infiltrací amyloidu (Lavatelli, 2008). Výhodou je možnost využití odběru podkožní tukové tkáně, což je nenáročný a opakovatelný zákrok, který nemocného neohrožuje a jen nepatrně zatěžuje. Pro proteomickou analýzu z podkožního tuku je třeba dbát na kvalitu odběru vzorku. Množství vzorku by se mělo pohybovat v rozmezí 15-30 mg a vzorek by neměl být kontaminován krví. Odebraný aspirát, resp. část tukové tkáně je třeba ihned po odběru zamrazit (nejlépe v -80 °C, minimálně v -20 °C). Vzorky se při transportu do proteomické laboratoře nesmí rozmrazit, proto je nutné je transportovat na suchém ledu.

Vlastní popis metodiky hmotností spektrometrie je nad rámec těchto doporučení. Zjednodušeně v proteomické laboratoři následuje nejprve vstupní příprava pro vlastní analýzu (odmytí vzorku, minimalizace kontaminace periferní krví, homogenizace a delipidizace vzorku a digesce trypsinem). Následuje vlastní LC-MS/MS analýza na hmotnostním spektrometru vedoucí k identifikaci definovaných parametrů proteinů. Následně jsou nalezené proteiny určeny srovnáním jejich parametrů se známými proteiny v on-line databázi. Pro list identifikovaných proteinů jsou stanoveny definované semikvantitativní parametry, na jejichž

základě lze stanovit, o jaký typ amyloidózy se jedná. Výstupem je určení typu amyloidózy. Je však potřeba zdůraznit, že jednoznačný nálezní imunohistochemického nebo imunofluorescenčního vyšetření je dostačující a rozhodně není potřeba u každého nemocného provádět vyšetření pomocí MS. Z praktického hlediska nejužitečnější rolí hmotností spektrometrie v diagnostice amyloidóz se zdá být rychlý screening hereditárních amyloidóz a vyšetření diagnosticky komplikovaných případů, i když recentní poznatky naznačují, že MS je schopna určit přesný typ proteinu u 35-50 % nemocných, zejména v časných stádiích AL amyloidózy s přítomností pouze malých fokálních depozit (Linke, 2012). Pro Českou republiku tuto analýzu provádí prozatím jen pracoviště MU v Brně. V listopadu 2013 zatím není metoda optimalizovaná natolik, aby nahradila výše uvedené metody.

4. 3. 3 Vyšetření klonality plazmocytů pomocí multiparametrické průtokové cytometrie

Vzhledem k tomu, že pro AL je typické nízké zastoupení plazmocytů (PC), teprve jejich detekce a identifikace dostatečného počtu na základě exprese povrchových znaků CD38 a CD138 umožňuje detailní analýzu. Na rozdíl od MM, kde již kostní dřev (KD) bývá infiltrována vesměs klonálními plazmocyty, u AL, podobně

jako u monoklonální gamapatie nejasného významu, se v KD vyskytují v různých poměrech plazmocyty patologické i fyziologické. V takovýchto případech je identifikace a enumerace patologických plazmocytů pouze na základě stanovení „normality“ dle povrchového fenotypu s využitím znaků CD19 a CD56 (normální N-PC:CD19+CD56- vs. abnormální A-PC: CD19-CD56+/-) často nepřesná (Kovářová, 2011). Přesto však bylo zjištěno, že flowcytometrické stanovení infiltrace kostní dřevě plazmocyty a procentuální zastoupení počtu normálních a abnormálních plazmocytů mohou sloužit jako prognostické parametry ovlivňující celkové přežití pacientů s AL (Paiva, 2011). Pro spolehlivé stanovení přítomnosti a počtu klonálních plazmocytů je však nezbytné stanovení intracelulární „klonality“ s využitím kombinace minimálně 6 znaků (CD38, CD138, CD19, CD56, κ a λ), ještě lépe však v 8barevné kombinaci (CD38, CD138, CD19, CD56, CD45, CD27, κ a λ) umožňující přesnější odlišení polyklonálních (n-PC) od klonálních (a-PC) plazmocytů. Analýza klonality plazmocytů u AL je pak nezbytným nástrojem pro zhodnocení léčebné odpovědi, kdy dosažení hematologické kompletní remise je nutným předpokladem dosažení orgánové léčebné odpovědi (Adam, 2012).