

ΑΠΟ ΤΟ ΕΘΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΟΥ
ΕΘΝΙΚΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ ΥΓΙΕΙΑΣ ΤΩΝ ΗΝΩΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΤΕΙΩΝ ΤΗΣ
ΑΜΕΡΙΚΗΣ

Διευθυντής : John Sever MD, PhD

ΚΑΙ

ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΤΟΜΕΑ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Διευθυντής: Καθηγητής Χ.Μ. Μουτσόπουλος

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ ΣΕ 39
ΑΡΡΩΣΤΟΥΣ ΜΕ ΑΜΥΛΟΕΙΔΙΚΗ ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑ

Μαρίνου Δαλάνα
Ιατρού - Νευρολόγου

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1984



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000345848



ΑΠΟ ΤΟ ΕΘΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΟΥ
ΕΘΝΙΚΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ ΥΓΙΕΙΑΣ ΤΩΝ ΗΝΩΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΤΕΙΩΝ ΤΗΣ
ΑΜΕΡΙΚΗΣ

Διευθυντής : John Sever MD, PhD

ΚΑΙ

ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΤΟΜΕΑ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Διευθυντής: Καθηγητής Χ.Μ. Μουτσόπουλος

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ ΣΕ 39
ΑΡΡΩΣΤΟΥΣ ΜΕ ΑΜΥΛΟΕΙΔΙΚΗ ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑ

Μαρίνου Δαλάνα
Ιατρού - Νευρολόγου

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΓΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΑ
που υποβλήθηκε στην Ιατρική
Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1984



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ ΔΙΔΑΚΤΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΩΝ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Αθήνα

Αριθμός Πρωτοκόλλου: 147/2002

Αθήνα, 12/12/2002

Προς: Το Παιδαγωγικό Ινστιτούτο

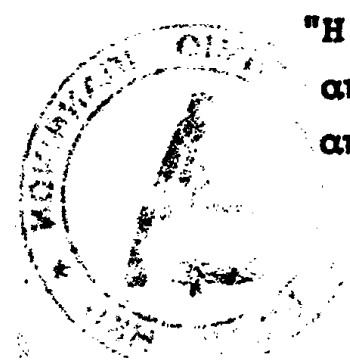
Από: Το Παιδαγωγικό Ινστιτούτο

Κοινοποίηση: Το Παιδαγωγικό Ινστιτούτο

Από: Το Παιδαγωγικό Ινστιτούτο

Από: Το Παιδαγωγικό Ινστιτούτο

**"Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής
από την Ιατρική Σχολή δεν υποδηλώνει
αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα".
(Νόμος 5343/32, άρθρο 202, παρ. 2).**



Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

	σελίδα
I. ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
II. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	3
- Αμυλοείδωση - Γενικά	3
- Αμυλοειδές	5
- Μικροσκοπική εμφάνιση	5
- Χημική σύσταση	5
- Ταξινόμηση	9
- Αμυλοειδικές πολυνευροπάθειες	
- Γενικά - Συχνότητα	10
- Κλινική εικόνα	12
- Ανίχνευση του αμυλοειδούς	13
- Παθογένεια	15
III. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	17
- Εισαγωγή	17
- Υλικό και μέθοδοι	17
- Επιλογή των ασθενών	18
- Ανοσοϊστοχημική μελέτη	19
- Αποτελέσματα	23
- Κλινική κατάταξη	23
- Ανοσοϊστοχημικός χαρακτηρισμός του Αμυλοειδούς	25
Συζήτηση	31
Συμπεράσματα	37
Περίληψη	39
Summary	41
Βιβλιογραφία	43



I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η αμυλοειδική νευροπάθεια είναι μια από τις επίπονες νευρολογικές παθήσεις που παραμένει ουσιαστικά αθεράπευτη οδηγώντας σε θάνατο μέσα σε διάστημα 2-5 χρόνων από την εμφάνιση των πρώτων νευρολογικών σημείων. Ο μηχανισμός και η αιτιοπαθογένεσή της είναι άγνωστα. Μόνο η πλήρης κατανόηση της χημικής σύστασης των αμυλοειδικών εναποθέσεων και της βασικής προδρόμου αμυλοειδογόνου ουσίας που κυκλοφορεί στον όρο και είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό και την εναπόθεση του αμυλοειδούς στο νευρομυϊκό σύστημα, μπορεί να οδηγήσει σε μια αποτελεσματική θεραπευτική αγωγή. Επί πλέον η κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο το αμυλοειδές ή οι πρόδρομες αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες καταστρέφουν τις νευρικές ίνες των περιφερεικών νεύρων (π.χ. πίεση, απόφραξη των ενδο-νευρικών αγγείων, προσβολή των κυττάρων των νευρικών γαγγλίων ή ανοσοβιολογικοί και νευροτοξικοί μηχανισμοί) θα βοηθήσει στην πιο αποτελεσματική συμπτωματική αντιμετώπιση της νόσου.

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι α) να ταξινομήσει ένα πολύ μεγάλο αριθμό αρρώστων με αμυλοειδικές νευροπάθειες που μελετήθηκαν στο ΕΘΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΩΝ ΗΠΑ, μέ βάση τα κλινικά και εργαστηριακά τους ευρήματα και β) να δείξει ποιά είναι η χημική φύση του αμυλοειδούς και της πρόδρομης αμυλοειδογόνου πρωτεΐνης χρησιμο-



ποιόντας ανοσοϊστοχημικές τεχνικές και ειδικά αντισώματα εναντίον όλων των γνωστών αμυλοειδικών πρωτεϊνών που παρασκευάστηκαν ειδικά γι' αυτό το σκοπό.

Η ανοσοϊστοχημικές τεχνικές του ανοσοφθορισμού και της ανοσοπεροξειδάσης έχουν χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα στο παρελθόν από το συγγραφέα και έχουν τροποποιηθεί στο εργαστήριό μας στο ΕΘΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΥΓΙΕΙΑΣ τα τελευταία 7 χρόνια, στο τμήμα του διευθυντή ιατρού νευρολόγου KING ENGEL. Η παραγωγή αντισωμάτων κατά των αμυλοειδικών πρωτεϊνών, η απομόνωση του αμυλοειδούς και ο χαρακτηρισμός των αντισωμάτων έγινε σε συνεργασία με τον ιατρό George Glenner, διευθυντή του τμήματος της μοριακής βιοχημείας του ΕΘΝΙΚΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ ΤΩΝ ΡΕΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΝΕΦΡΙΚΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ.

Τον καθηγητή της Παθολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Χαράλαμπο Μουτσόπουλο ευχαριστώ θερμά για την ενθάρρυνσή του και τις υποδείξεις του γι' αυτή την εργασία.

Επίσης ευχαριστώ τους συναδέλφους Δημήτρη Μπούμπα και Ηλία Ελευθεριάδη για την βοήθειά τους στην γλωσσική και γραμματική επιμέλεια του κειμένου. Η δακτυλογράφηση του κειμένου έγινε από την κα. Μαρία Σαούτη και την ευχαριστώ θερμά.



I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A) Η ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ

Ο όρος αμυλοειδές χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Schlieden το 1838 για να περιγράψει ένα φυσιολογικό αμυλοειδές συστατικό των φυτών. Ο Virchow το 1854 χρησιμοποίησε τον όρο αμυλοειδές επειδή η ουσία έμοιαζε με την κυτταρίνη στη δοκιμασία ιωδίου-θειικού οξέος (1). Ο όρος "λιπώδης νόσος" (lardaceous disease) χρησιμοποιούνταν για περισσότερα από 40 χρόνια από τον Antoine Portal πριν τον κάνει ευρύτερα γνωστό ο Rokitansky το 1842. Ο όρος "κηρώδης" εξαλλαγή χρησιμοποιούνταν ταυτόχρονα με τον όρο "λιπώδης" εξαλλαγή μέχρι που ο Budd το 1853 ανακάλυψε ότι ήταν πρωτεϊνική ουσία και όχι λιπίδιο (2).

Μόλις στα τελευταία χρόνια βρέθηκε ότι περισσότερο από το 90% των εναποθέσεων του αμυλοειδούς έχει ινιδιακή σύσταση (3). Οι προσπάθειες όμως για την ανάκτηση ομογενών συμπυκνωμάτων από αυτά τα πρωτεϊνικά ινίδια δεν καρποφορούσαν μέχρι που εφαρμόστηκαν μέθοδοι για την διαλυτοποίηση των ινιδίων του αμυλοειδούς με μετουσιωτικούς διαλύτες, γεγονός που επέτρεψε την κλασματοποίησή τους στα επιμέρους συστατικά τους (4,5,6).

Μια από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις στην έρευνα του αμυλοειδούς ήταν το ότι τα ινίδια του αμυλοειδούς έχουν



β πτυχωτή δομή (7) στην οποία οφείλονται η χαρακτηριστική χρώση και οι οπτικές ιδιότητες του αμυλοειδούς. Τα ινίδια του αμυλοειδούς είναι αδιάλυτα, είναι συνήθως ανθεκτικά στα πρωτεολυτικά ένζυμα και σχηματίζουν τις εναποθέσεις του αμυλοειδούς που παρεκτοπίζουν και καταστρέφουν τους φυσιολογικούς ιστούς.

Σήμερα είναι πια φανερό ότι η συσσώρευση αμυλοειδούς δεν οφείλεται σε μία μόνο νόσο και ότι η αμυλοείδωση δεν είναι μια ενιαία κλινική οντότητα αλλά περιλαμβάνει ένα φάσμα διαφορετικών νόσων (είναι δηλαδή σύμπλεγμα νόσων) που έχουν σαν τελικό αποτέλεσμα την εναπόθεση ινιδίων αμυλοειδούς (που αποτελούνται από διαφορετικές πρωτεΐνες) με διαφορετικούς παθογενετικούς μηχανισμούς (8). Η συσσώρευση αυτών των σχε- τικά αδρανών ινιδίων στους ιστούς προκαλεί ατροφία από πίεση και θάνατο των οργάνων και των ιστών σαν αποτέλεσμα της παρέμβασης τους στη λειτουργία τους. Το περιφερικό νευρικό σύστημα αποτελεί συχνά στόχο εναπόθεσης αμυλοειδούς είτε με την μορφή της τοπικής συμπύκνωσης του νεύρου (λ.χ. το σύνδρομο του καρπιαίου σωλήνα) ή πιο συχνά με την μορφή της γενικευμένης νευροπάθειας. Επειδή η αμυλοείδωση και ειδικότερα η περιφερική νευροπάθεια από αμυλοειδές παραμένουν ουσιαστικά ανίατες, η κατανόηση της φύσης και των χημικών χαρακτηρι- στικών των εναποτιθέμενων ινιδίων μπορεί να συμβάλει στο σχεδιασμό αποτελεσματικών θεραπειών.



ΑΜΥΛΟΕΙΔΕΣ

1. Μικροσκοπική εμφάνιση του αμυλοειδούς

Το αμυλοειδές στο κοινό μικροσκόπιο φαίνεται σαν μια ομοιογενής άμορφη μάζα που χρωματίζεται ρόδινη με αιματοξυλίνη και ηωσίνη, ενώ στη χρώση με ιώδες του μεθυλίου ή κρυσταλλικό ιώδες παρουσιάζει μεταχρωμασία. Στο πολωμένο φως μετά από χρώση με Ερυθρό του Κογκό εμφανίζει πράσινη σαν του μήλου, διπλοδιαθλαστικότητα. Η άμορφη υάλινη εμφάνιση του αμυλοειδούς είναι παραπλανητική γιατί στην πραγματικότητα είναι ινώδης πρωτεΐνη. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, που είναι η πιο αξιόπιστη διαγνωστική μέθοδος, το αμυλοειδές αποτελείται από άκαμπτα γραμμικά συσσωρεύματα ινιδίων χωρίς διακλαδώσεις, με πλάτος 7,5 - 10nm, με άπειρο μήκος και σωληνωτή διαμόρφωση (10). Σε τομές ιστών με κρυστάτη, οι εναποθέσεις αμυλοειδούς φαίνονται εύκολα και καθαρά με την χρώση του κρυσταλλικού ιώδους (11) και δείχνουν μεταχρωμασία ζηρού ερυθρού ως ρόδινου χρώματος.

2. Χημική σύσταση των ινιδίων του αμυλοειδούς

Πρόσφατα δεδομένα από την βιοχημική και ανοσολογική ανάλυση των ινιδίων του αμυλοειδούς έδειξαν ότι υπάρχουν τουλάχιστον 3 διαφορετικοί τύποι ινιδίων αμυλοειδικής πρωτεΐνης και των προδρόμων μορφών τους (8) και συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

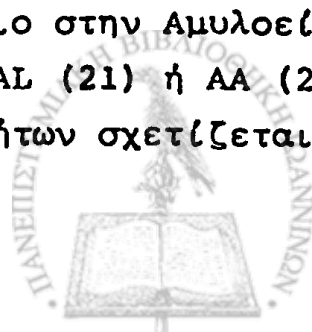


Π ί ν α κ α ς 1

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗΣ (1)

<u>Κλινική οντότητα</u>	<u>Τύπος αμυλοειδούς</u>	<u>Πρόδρομη Πρωτεΐ</u>
A. Ανοσοκυτταρικές δυσκρασίες ("Πρωτοπαθής" αμυλοείδωση) Πολλαπλό Μυέλωμα, μονοκλωνικές γαμμασφαιριναμίες, πλασματοκυτταρι- κές δυσκρασίες, ανοσοκυτταρικά νεο- πλάσματα(2) μακροσφαιριναιμία του Waldenström.	AL	Ελαφρή αλυσίδα ανοσοσφαιρινών
B. Αντιδραστική συστηματική αμυλοείδωση ("Δευτεροπαθής" αμυλοείδωση) Υποτροπιάζουσες και χρόνιες λοιμώξεις, φυματίωση, ρευματοειδής αρθρίτιδα, νόσος του Hodgkin, οικο- γενής Μεσογειακός πυρετός.	AA	Πρωτεΐνη A
Γ. Κληρονομική αμυλοειδική πολυνευρο- παθεια(3) Τύποι: Πορτογαλλικός, Ελληνικός, Εβραϊκός, Ιαπωνικός, της Iowa, της Indiana, του Maryland.	AFp	Προλευκωματίνη
Δ. Εντοπισμένη αμυλοείδωση Μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς. Δέρμα, αναπνευστικό και ουροποιητικό σύστημα. Γεροντική της καρδιάς. Διάφορες (εγκέφαλος, εγκεφαλικές πλάκες, υπερήλικες)	AEt Συχνά AL ASc άγνωστος	Καλσιτονίνη Ελαφρή αλυσίδα ανοσοσφαιρινών Προλευκωματίνη άγνωστη.

- (1) Τροποποιημένος σύμφωνα με το 3ο Διεθνές Συμπόσιο στην Αμυλοείδωση
 (2) Το αμυλοειδές στο υπερνέφρωμα μπορεί να είναι AL (21) ή AA (22).
 (3) Το ότι το συγγενές αμυλοειδές όλων των εθνικοτήτων σχετίζεται με τη
 προλευκωματίνη δείχνεται σ'αυτή την εργασία.



Η χημική ανάλυση της αμυλοειδικής πρωτεΐνης έδειξε ότι τα αμυλοειδικά ινίδια του πολλαπλού μυελώματος και των πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών είναι ταυτόσημα με το μεταβλητό τμήμα μιας μονοκλωνικής ελαφρής αλυσίδας των ανοσοσφαιρίνων (πρωτεΐνη Bence-Jones). Το αμυλοειδές αυτό που προέρχεται από το μεταβλητό τμήμα της ελαφρής αλυσίδας των ανοσοσφαιρίνων (αμυλοειδές AL, Πίνακας 1) συνοδεύει πιο συχνά γαμμασφαιρίναιμιες με ελαφρές αλυσίδες λ παρά κ (8,12).

Η χημική ανάλυση και ο καθορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων του αμυλοειδούς από ασθενείς με χρόνιες νόσους όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα ή οι χρόνιες λοιμώξεις, έδειξαν ότι η κύρια πρωτεΐνη του αμυλοειδικού ινιδίου είναι η πρωτεΐνη A. Η πρωτεΐνη A έχει μοριακό βάρος 8.500, αποτελείται από 76 αμινοξέα και δεν συγγενεύει με καμία από τις γνωστές ανοσοσφαιρίνες (13). Χρησιμοποιώντας αντισώματα κατά του AA (αμυλοειδές A, πρωτεΐνη A), βρέθηκε στον ορό φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με αμυλοείδωση ένα συστατικό αντιγονικά συγγενές με αυτό που είναι γνωστό σαν SAA (Serum AA-related protein). Τα επίπεδα της SAA είναι αυξημένα σε αρρώστους με AA αμυλοείδωση και είναι φυσιολογικά σε ασθενείς με συγγενές αμυλοειδές (14). (Πίνακας 1).

Στη κληρονομική αμυλοείδωση, η χημική σύσταση του αμυλοειδούς καθορίστηκε πρόσφατα. Συγκεκριμένα στον οικογενή Μεσογειακό πυρετό το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό των ινιδίων



του αμυλοειδούς έχει 76 αμινοξέα (13,15) και είναι του τύπου AA. Σε μια άλλη κληρονομική νόσο, την κληρονομική αμυλοειδική νευροπάθεια, το συστατικό του προδρόμου αμυλοειδούς βρέθηκε από τους Costa et al (16) και Δαλάκα et al (17) ότι είναι η φυσιολογική προλευκωματίνη του ορού. Το εύρημα αυτό είναι συμβατό με το γεγονός ότι περισσότερο από το 50% της φυσικής προλευκωματίνης του ορού έχει β-πτυχωτή δομή (16) (Πίνακας 1).

Το ινίδιο του αμυλοειδούς σε μερικές εντοπισμένες μορφές της αμυλοείδωσης και ειδικότερα αυτό του μυελοειδούς καρκίνου του θυρεοειδούς βρέθηκε ότι συγγενεύει με την καλσιτονίνη (18) (Πίνακας 1). Η χημική σύσταση των προδρόμων πρωτεϊνών σε άλλες εντοπισμένες εναποθέσεις αμυλοειδούς π.χ. οξώδης πνευμονική σαρκοείδωση, γεροντική αμυλοείδωση του καρδιαγγειακού και της νόσου του Alzheimer δεν είναι ακόμα γνωστή (8).

Ένα κοινό μη ινιδικό συστατικό του αμυλοειδούς είναι αυτό που ονομάζεται συστατικό P (P component) και έχει βρεθεί στο 10% όλων των εναποθέσεων αμυλοειδούς. Το συστατικό P του αμυλοειδούς είναι γλυκοπρωτεΐνη και η ηλεκτροφορητική του κινητικότητα μοιάζει με της α1-σφαιρίνης. Συγγενεύει δε πολύ με την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, ανευρίσκεται σε ορούς ατόμων με ή χωρίς αμυλοείδωση και στη φυσιολογική βασική μεμβράνη του ανθρώπινου νεφρικού σπειράματος (20).



3. Ταξινόμηση της αμυλοείδωσης

Στο 3ο Διεθνές Συμπόσιο για την Αμυλοείδωση στη Πορτογαλία το 1979, η παλιά ονοματολογία συμπληρώθηκε. Η νέα ταξινόμηση βασίστηκε στη χημική σύσταση του αμυλοειδούς και η χρήση των παλιών όρων "πρωτοπαθής" και "δευτεροπαθής" αποθαρρύνθηκε. Με βάση τα παραπάνω, τα ινίδια του αμυλοειδούς που αποτελούνται από ελαφρές αλυσίδες ανοσοσφαιρινών ονομάστηκαν AL ενώ αυτά που αποτελούνται από πρωτεΐνη A ονομάστηκαν AA (Πίνακας 1). Στον τύπο AL, το αμυλοειδές συνήθως προσβάλλει την καρδιά, τη γλώσσα, τον γαστρεντερικό σωλήνα, τα νεύρα και το δέρμα, ενώ στον τύπο AA συνήθως προσβάλλει το ήπαρ, τους νεφρούς και τον σπλήνα. Περιφερική νευροπάθεια έχει παρατηρηθεί μόνο στον τύπο AL και στην κληρονομική μορφή που οφείλεται στην προλευκωματίνη (16,17). Η κλινική ταξινόμηση του αμυλοειδούς δείχνεται στον Πίνακα 1.

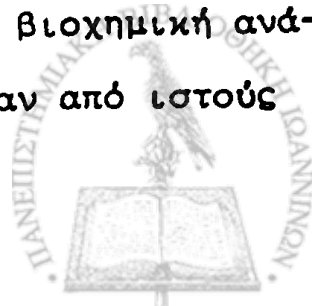


B. ΟΙ ΑΜΥΛΟΕΙΔΙΚΕΣ ΠΟΛΥΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΕΣ

1. Γενικές αρχές και συχνότητα

Η περιφερική νευροπάθεια παρατηρείται στην ανοσοκυτταρική αμυλοείδωση ("πρωτοπαθής" (AL) Πίνακας 1) και στις κληρονομικές μορφές. Αμυλοειδική περιφερική νευροπάθεια δεν έχει περιγραφεί στην αντιδραστική, AA τύπου (δευτεροπαθή) αμυλοείδωση (23,24 και Δαλάκας και Engel, 1977-1980 αδημοσίευτες παρατηρήσεις). Στις αμυλοειδικές πολυνευροπάθειες, οι νευρολογικές εκδηλώσεις συνδέονται με εναποθέσεις αμυλοειδούς στα νεύρα, στα γάγγλια των οπίσθιων ριζών και στα γάγγλια του συμπαθητικού.

Όσον αφορά τον κληρονομικό τύπο των αμυλοειδικών νευροπαθειών, υπάρχει μια τάση να ταξινομούνται με βάση την εθνική προέλευση των ασθενών. Αν και δεν υπάρχει αμφιβολία για τό ότι η κληρονομική αμυλοειδική νευροπάθεια είναι συχνότερη σε ορισμένες εθνικότητες ή σε ορισμένες χώρες (λ.χ. Ιαπωνία, Πορτογαλλία, Σουηδία, Ελλάδα) δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι η παθογένειά της είναι διαφορετική. Στην πραγματικότητα, οι έρευνές μας έχουν δείξει (17) ότι η προλευκωματίνη είναι η πρόδρομη πρωτεΐνη όχι μόνο στον Πορτογαλικό τύπο (16) αλλά και στις οικογενείς αμυλοειδικές νευροπάθειες τουλάχιστον 3 έως 4 διαφορετικών εθνικών ομάδων (17). Αυτό επιβεβαιώθηκε αργότερα από μια εμπεριστατωμένη βιοχημική ανάλυση των αμυλοειδικών πρωτεϊνών που εκχυλίστηκαν από ιστούς



αρρώστων με πολυνευροπάθειες, Αμερικανο-Σουηδικής (25), Εβραϊκής (26) και Ιαπωνικής (27) προέλευσης. Στη πλειοψηφία των ασθενών με κληρονομική αμυλοειδική νευροπάθεια, τα συμπτώματα της νευροπάθειας είναι γενικευμένα. Αντίθετα σε άλλους, ιδιαίτερα στους τύπους της Indiana και του Maryland (9) μπορεί να αρχίσουν με εστιακή προσβολή όπως το σύνδρομο του καρπιαίου σωλήνα ή με συμπτώματα από τα άνω άκρα και επακολουθεί γενικευμένη νευροπάθεια.

Εκτός από την συμπτωματολογία από το περιφερικό και το αυτόνομο νευρικό σύστημα και την παρουσία εναποθέσεων αμυλοειδούς στα νεύρα των ασθενών με αμυλοειδική νευροπάθεια, αρκετοί άλλοι ιστοί προσβάλλονται και συχνά ανευρίσκεται αμυλοειδές σ'αυτούς. Οι μύες είναι ένας ιστός που είναι πάντοτε θετικός την δοκιμασία για αμυλοειδές (17,21, 28,29). Το ίδιο ισχύει για το δέρμα (30) και τον υποδόριο ιστό (Δαλάκας και Glenner 1979, αδημοσίευτες παρατηρήσεις). Η καρδιά και οι νεφροί προσβάλλονται συχνά (8,9,17,21,28) και αποτελούν τις δυνητικά σοβαρότερες εκδηλώσεις της νόσου. Τα συμπτώματα από γαστρεντερικό είναι πολύ συχνά και οφείλονται στην άμεση προσβολή του γαστρεντερικού σωλήνα σε οποιοδήποτε επίπεδο ή στην προσβολή του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Το ήπαρ και ο σπλήνας προσβάλλονται επίσης, ιδίως στις κληρονομικές μορφές (9 και Δαλάκας, και Glenner, 1980, αδημοσίευτες παρατηρήσεις).



2. Κλινική εικόνα

Αν και υφίστανται ορισμένες διαφορές από περιστατικό σε περιστατικό καθώς και μεταξύ των οικογενειών διαφορετικών εθνικοτήτων, η ακόλουθη συμπτωματολογία είναι ο κανόνας για ένα μεγάλο αριθμό ασθενών που εξετάστηκαν από μας και άλλους (9,17,20,28,29).

α) Οι άρρωστοι προσέρχονται με μία επώδυνη, αισθητικοκινητική πολυνευροπάθεια με ύπουλη έναρξη και αργή έως μέτρια εξέλιξη. Τα ευρήματα από την εξέταση του αισθητικού είναι τα μέν υποκειμενικά επώδυνες άπω παραισθησίες τα δε αντικειμενικά ακρομελική απώλεια "σαν κάλτσα" ή "σαν γάντι" των αισθήσεων της ελαφρής αφής, του νυγμού και της θερμοκρασίας. Προοδευτικά, προσβάλλεται επίσης η ιδιοδεκτική αισθητικότητα.

β) Τα πρώτα συμπτώματα είναι συχνά η κινητική αδυναμία στα άνω ή τα κάτω άκρα και η δυσκολία στο βάδισμα. Τα αντανακλαστικά απουσιάζουν και η ατροφία των μυών δεν είναι ασυνήθιστη.

γ) Η δυσλειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος είναι χαρακτηριστική για την νόσο και εκδηλώνεται με ορθοστατική υπόταση, ίλιγγο θέσης και λιποθυμία, ανικανότητα και δυσλειτουργία του εντέρου (διάρροια, εμμετό ή διάταση).

δ) Τελικά, εγκαθίστανται δυσανορρόφηση και απώλεια βάρους.



ε) Υπάρχει συχνά προσβολή της καρδιάς και μπορεί να διαγνωστεί πρώιμα με υπερηχοκαρδιογράφημα. (Δαλάκας, 1977-84 αδημοσίευτες παρατηρήσεις).

στ) Σε μερικούς ασθενείς το σύνδρομο του καρπιαίου σωλήνα μπορεί να είναι η πρώτη εκδήλωση αλλά συχνά επεκτείνεται προοδευτικά σε μια γενικευμένη περιφερική νευροπάθεια.

3. Ανίχνευση του Αμυλοειδούς στις Αμυλοειδικές Πολυνευροπάθειες.

Οι ανοσοσφαιρίνες του ορού και η ανοσοηλεκτροφόρηση είναι σημαντικές για την ανεύρεση μονοκλωνικής ζώνης στον ορό και σπάνια στα ούρα. Θα πρέπει να ακολουθήσει εξέταση του μυελού των οστών, με ιδιαίτερη προσοχή στα αθροίσματα των λεμφοκυττάρων και στον αριθμό των πλασματοκυττάρων (28, 31), και χρώσεις του μυελού για αμυλοειδές. Αν τα ευρήματα είναι συμβατά με ανοσοκυτταρική δυσκρασία θα πρέπει να ακολουθήσει έλεγχος για πολλαπλό μύελωμα, ανοσοκυτταρικά νεοπλάσματα ή μακροσφαιριναιμία του Waldenstrom. Η εξέταση του οικογενειακού ιστορικού και του τρόπου καταγωγής είναι πολύ σημαντικά. Η εξέταση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού ίσως δείξει σε μερικές περιπτώσεις ελαφρά αυξημένες ολικές πρωτεΐνες (9, 17, 25). Οι εξετάσεις αγωγιμότητας των νεύρων και η ηλεκτρομυογραφία συνηγορούν για συμμετρική αξονική νευροπάθεια (9, 17, 28, 32). Η βιοψία είναι απαραίτητη και σ' αντίθεση με παλιές εργασίες όπου χρησιμοποιήθηκαν βιοψίες του ορθού, των ούλων, του σπλήνα ή του ήπατος, διαπιστώσαμε ότι η βιο-



ψία του νεύρου, του μυός ή του δέρματος έχουν τη μεγαλύτερη διαγνωστική αξία και επιπλέον είναι ασφαλέστερες και ευκολότερες. Η εμπειρία μας σχετικά με τις βιοψίες στην διάγνωση είναι η εξής:

α) Βιοψία νεύρου. Σε κάθε άρρωστο με υποψία αμυλοειδικής νευροπάθειας εκτελούμε βιοψία γαστροκνήμιου νεύρου. Το παρασκεύασμα προωθείται για τομές με κρυοστάτη, εγκλειση σε παραφίνη και σε Ερση για ιστολογική εξέταση, λεπτομερή μορφολογία και ηλεκτρονική μικροσκοπηση. Η βιοψία του νεύρου δείχνει απώλεια των αμυέλων ινών και αλλοίωση των εμμυέλων με αξονική βλάβη. Εναποθέσεις αμυλοειδούς στα αγγεία ή στο ενδονευρικό παρέγχυμα μπορεί να υπάρχουν αλλά παραδόξως να μην ανιχνευθούν στην βιοψία του νεύρου, όπως έχουμε επανειλημμένα παρατηρήσει (17,21,28,29, Δαλάκας και Engel 1977-1980, αδημοσίευτες παρατηρήσεις).

β) Βιοψία μυός. Οι τομές του μυός με κρυοστάτη χρωματισμένες με κρυσταλλικό ιώδες είναι πάντοτε (100%) θετικές σε κάθε άρρωστο με αμυλοειδική νευροπάθεια και είναι η βιοψία εκλογής όπως έχουμε δείξει στο παρελθόν (17,21,28,29). Στη βιοψία μυός, έχουν εντοπιστεί εναποθέσεις αμυλοειδούς στα τοιχώματα των αγγείων του αίματος, ή γύρω από αυτά, και στον συνδετικό ιστό (17,21,28,29). Η παρουσία του αμυλοειδούς σ' αυτές τις θέσεις έχει επιβεβαιωθεί επίσης και με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (17,21,28).



γ) Βιοψία δέρματος. Αυτή είναι επίσης 100% θετική για εναποθέσεις αμυλοειδούς (3)0. Η εύκολη προσπέλαση και η αξιοπιστία των βιοψιών του δέρματος και του μυός κάνουν αυτούς τους ιστούς τις πιο σημαντικές θέσεις για ανίχνευση του αμυλοειδούς στις αμυλοειδικές πολυνευροπάθειες. Δεν είναι αναγκαίο πια να γίνονται οι βιοψίες του όρθου, των ούλων ή του σπλήνα. Το γιατί οι μύες και το δέρμα είναι πάντοτε θετικά για αμυλοειδές αν και δεν προσβάλλονται πρωτοπαθώς κλινικά, είναι ένα μυστήριο που έχει προκαλέσει πολλά ερωτηματικά για τον παθογενετικό μηχανισμό της εναπόθεσης του αμυλοειδούς (8).

4. Η παθογένεια των Αμυλοειδικών Νευροπαθειών.

Ο μηχανισμός της διάχυτης βλάβης των νεύρων στην αμυλοείδωση δεν είναι γνωστός. Αρκετές υποθέσεις υπάρχουν:

α) Ισχαιμική διεργασία οφειλόμενη στη διήθηση των μικρών αγγείων των νεύρων από αμυλοειδές (33,34).

β) Νευροπάθεια από συμπίεση οφειλόμενη στις εναποθέσεις αμυλοειδούς στο εσωτερικό των νεύρων (35).

γ) Τοξική-μεταβολική διεργασία (28,29,36). Η εντυπωσιακή συμμετρία της αισθητικής νευροπάθειας στη πλειοψηφία των ασθενών, η πρώιμη προσβολή των αισθήσεων του πόνου και της θερμοκρασίας (που άγονται από ελλιπώς μυελοποιημένες ίνες, που δεν είναι αυτές που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην



ισχαιμία ή την πίεση) και η λιγώτερο από ότι αναμένεται ομαδοποίηση των μυϊκών ινών που υποδηλώνει ελαττωματική παράπλευρη εκβλάστηση των "υγίων" κινητικών αξόνων, έχουν ωθήσει πολλούς ερευνητές στο να ευνοούν μια τοξική-μεταβολική διεργασία (28,29). Ο συγγραφέας επίσης ευνοεί την τελευταία υπόθεση. Οι πρώϊμες εναποθέσεις αμυλοειδούς ή των προδρομών του στα νωτιαία γάγγλια είναι μια ελκυστική υπόθεση που θα μπορούσε να εξηγήσει την πρώϊμη αισθητική προσβολή και την σοβαρή δυσλειτουργία του αυτονόμου νευρικού συστήματος (28, 29,32). Πρόσφατα προτάθηκε ότι η απουσία του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού στις οπίσθιες ρίζες και στα αισθητικά γάγγλια επιτρέπει την είσοδο αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών που μετατρέπονται στη συνέχεια σε αμυλοειδές. Εκεί ίσως βρίσκεται η αρχική εντόπιση του αμυλοειδούς που προκαλεί την παράπερα βλάβη των περιφερικών νεύρων (37). Γι'αυτό η ανίχνευση των προδρομών αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών που κυκλοφορούν στον ορό είναι πολύ σημαντική γιατί ίσως είναι οι πρώτες που εισβάλλουν στα αισθητικά γάγγλια ή τα νεύρα προκαλώντας έτσι τις αρχικές εκδηλώσεις της αισθητικής νευροπάθειας. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες αυτές διασπώνται για να σχηματίσουν μη διαλυτές εναποθέσεις αμυλοειδούς, προκαλώντας πρόσθετη νευρολογική βλάβη και προοδευτική επιδείνωση.



II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή:-

Όπως αναφέραμε και στο γενικό μέρος (βλ. παράρ. 3) η πρόσκτηση γνώσεων στον τομέα της βιοχημείας και ανοσολογικής ενασχόλησης του αμφοειδούς, προβάλλουν δύο διακριτά κομμάτια τύπου ειδικών προγραμμάτων που τις καλύπτουν μετ'εξέχουσας του συνόλου, τα με την ουσία διακρίνονται ως εξής:

Απαιτείται η κατανόηση και η ερμηνεία του ανοσοποιητικού συστήματος του πτηνίου, η οποία είναι ουσιαστικά η βάση για την ερμηνεία στους λόγους **II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ** της από την ελπίδα ελαττώσεως των ανοσοσφαιρίνων (25, 29), ενώ είναι η βάση της αμφοειδικής πολιτικής, η οποία αποσκοπεί ειδικά να σχετίζεται με την προληπτική του δράση (16, 17, 25, 27).

Κατά την διάρκεια των 7 τελευταίων χρόνων στο ΕΘΝΙΚΟ Ινστιτούτο Υγείας του ΚΕΑ, μελετήσαμε 39 περιπτώσεις αμφοειδικής πνευμονοπάθειας. Από προσεκτική ανάλυση του ιστορικού και της κλινικής τους εξέλιξης έγινε σαφές ότι οι περισσότεροι από αυτούς τους ασθενείς είχαν τον εμβρυϊκό τους χρόνο έλκευαν κατευθυνολογολογισματοπικά διαταραγμένη ανοσοποιητική λειτουργία (ΑΙ τύπος) με κληρονομική μεταβλητή έκφραση στον αρσ. Όπως ένας μεγάλος αριθμός ασθενών με ελαττωμένη ανοσοποιητική λειτουργία με τον όρο "αδύναμο", είχε ποσοτικό εμβρυϊκή ιστορική και κληρονομική προδιαποστικότητα διαταραχής.



II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή:-

Όπως αναφέραμε και στο γενικό μέρος (Πίνακας 1) η πρόσφατη πρόοδος στον τομέα της βιοχημικής και ανοσολογικής ανάλυσης του αμυλοειδούς, αποκάλυψε δύο διαφορετικούς τύπους ινιδίων αμυλοειδούς και τις πρόδρομες μορφές τους που συνδέονται με την αμυλοειδική πολυνευροπάθεια.

Στην αμυλοειδική πολυνευροπάθεια που συνοδεύεται από δυσκρασίες των πλασματοκυττάρων, το αμυλοειδές που εναποτίθεται στους μύες και τα νεύρα προέρχεται από την ελαφρή αλυσίδα των ανοσοσφαιρικών (AL τύπος) (28,29), ενώ στην οικογενή αμυλοειδική πολυνευροπάθεια το αμυλοειδές φαίνεται να σχετίζεται με την προλευκωματίνη του ορού (16,17,25,27).

Κατά την διάρκεια των 7 τελευταίων χρόνων στο Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας των ΗΠΑ, μελετήσαμε 39 περιπτώσεις αμυλοειδικής πολυνευροπάθειας. Από προσεκτική ανασκόπηση του ιστορικού και της κλινικής τους εικόνας έγινε φανερό ότι μερικοί απ'αυτούς τους ασθενείς είχαν τον οικογενή τύπο ενώ άλλοι είχαν κλινικοπαθολογοανατομικά διαγνωσμένη πλασματοκυτταρική δυσκρασία (AL τύπος) με κυκλοφορία πρωτεΐνης Bence-Jones στον ορό. Όμως ένας μεγάλος αριθμός ασθενών με κλινική εικόνα ταυτόσημη με των άλλων δύο ομάδων, είχε αρνητικό οικογενειακό ιστορικό και κανένα σημείο πλασματοκυτταρικής δυσκρασίας.



Σ'αυτές τις περιπτώσεις που ονομάσαμε "σποραδική" αμυλοειδική πολυνευροπάθεια, η σύσταση των αμυλοειδικών ινιδίων που εναποτίθεται στους μύες και τα νεύρα και της πρόδρομης πρωτεΐνης από την οποία παράγεται το αμυλοειδές

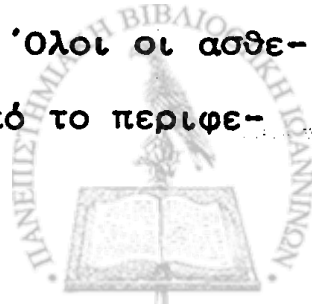
βοηθάει στην κατανόηση του μηχανισμού της, όπως συζητήθηκε στο πρώτο μέρος, και συμβάλλει στην επιλογή μιας ειδικότερης θεραπείας.

Στην παρούσα ανάλυση των 39 ασθενών, εξετάστηκε η συχνότητα της "σποραδικής" μορφής και έγινε προσπάθεια να καθοριστεί ο τύπος του αμυλοειδούς που είχε εναποτεθεί στους μύες και τα νεύρα αυτών των ασθενών χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημικές μεθόδους. Η βάση αυτών των μεθόδων στηρίζεται στην χρησιμοποίηση ειδικών αντισωμάτων εναντίων αμυλοειδικών κ και λ ελαφρών αλυσέων που αναγνωρίζουν το αμυλοειδές ανοσοσφαιρινικής προέλευσης και αντισώματα εναντίον της προλευκωματίνης που αναγνωρίζει το αμυλοειδές εκείνων των ασθενών με κληρονομική αμυλοειδική πολυνευροπάθεια.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:

Επιλογή των ασθενών.

Οι 39 ασθενείς με αμυλοειδική πολυνευροπάθεια εξετάστηκαν μετά από (έγγραφο συγκατάθεση) στο κλινικό κέντρο του Εθνικού Ινστιτούτου Νευρολογικών Παθήσεων. Όλοι οι ασθενείς είχαν σημεία γενικευμένης νευροπάθειας από το περιφε-



ρικό και αυτόνομο νευρικό σύστημα.

Ασθενείς με σύνδρομο καρπιαίου σωλήνα αλλά χωρίς πολυνευροπάθεια αποκλείστηκαν από την μελέτη αλλά 2 από τους 39 ασθενείς με πολυνευροπάθεια είχαν και σύνδρομο καρπιαίου σωλήνα. Σ' όλους τους ασθενείς η διάγνωση της πολυνευροπάθειας έγινε κλινικά και ηλεκτροφυσιολογικά, και επιβεβαιώθηκε με βιοψία μυός και νεύρου. Αποκλείσθηκαν επίσης ασθενείς που η ιστολογική εξέταση για αμυλοειδές, με χρώση ερυθρού του Κογκό ή κρυσταλλικό ιώδες. (17,21) ήταν αρνητική. Το οικογενειακό ιστορικό ανασκοπήθηκε λεπτομερώς σ' όλους τους ασθενείς και όπου ήταν εφικτό εξετάσθηκαν και άλλα μέλη των οικογενειών. Ορός, ούρα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση οξικής κυτταρίνης, και πηκτής αγαρόζης, όπως περιγράφηκε (38) και η συγκέντρωση των ανοσοσφαιρίνων ανιχνεύθηκε στον ορό και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό με νεφελομετρική, ανοσοενζυματική μέθοδο. Σ' όλους τους ασθενείς έγινε εξέταση μυελού των οστών και οστικός έλεγχος με ακτίνες-X και σπινθηρογράφημα. Ασθενείς με πολυνευροπάθειες διαφορετικής αιτιολογίας όπως, διαβητική, διαιτητική, τοξική, πορφυρινική ή από αγγειΐτιδα αποκλείσθηκαν μετά από κατάλληλες δοκιμασίες.

Ανοσοϊστοχημική μελέτη

α) Ιστοί: Βιοψίες νεύρου και μυός έγιναν και στους 39 ασθενείς με αμυλοειδική πολυνευροπάθεια και η παρουσία του αμυλοειδούς αποδείχθηκε σ' όλους μετά από χρώση με κρυστα-



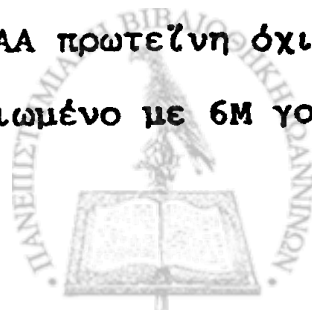
λικό ιώδες και ερυθρό του Κογκό. Οι ιστοί κόπηκαν με κρυοστάτη όπως περιγράφηκε (31, 39) ή μετά από εγκλειση, σε παραφίνη όπως συνήθως γίνεται στην ιστολογία. Οι ιστοί μερικών ασθενών εξετάστηκαν επίσης με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο για παραπέρα απόδειξη της εναπόθεσης αμυλοειδούς, όπως περιγράφηκε (21).

Οι ανοσοϊστοχημικές μελέτες έγιναν σε τομές με κρυοστάτη ή παραφίνης, πάχους 6 μμ.

Χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές τομές μετά από εναλλασσόμενες χρώσεις με κρυσταλινό ιώδες και αντιορούς για να δοχθεί αν η σύνδεση των αντιορών με το αμυλοειδές ήταν ειδική για το αμυλοειδές του ιστού.

β) Χαρακτηρισμός των αντιορών: Οι αντιοροί που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ειδικότητα για τις αμυλοειδικές πρωτεΐνες ΑΑ, Αλ, Ακ και την προλευκωματίνη. Οι αντι-ΑΑ, αντι-Αλ και αντι-Ακ αντιοροί πάρθηκαν μετά από ανοσοποίηση κονύκλων με αμυλοειδικά πρωτεϊνικά ινίδια μετουσιωμένα με 6M γουανιδίνη. Τα αντισώματα που ελήφθησαν χαρακτηρίστηκαν με ανοσοδιάχυση όπως περιγράφηκε προηγουμένως (40). Η ανοσοδιάχυση επαναλήφθηκε πριν από τα πειράματα για να εκτιμηθεί η ειδικότητα των αντισωμάτων και έδειξε σε γενικές γραμμές τα εξής:

Ο αντι-ΑΑ ορός έδειξε μια χαρακτηριστική γραμμή καθίζησης μόνο με την καθαρή ΑΑ πρωτεΐνη όχι όμως με φυσιολογικό ανθρώπινο ορό, με μετουσιωμένο με 6M γου-



νιδίνη φυσιολογικό ανθρώπινο σπλήνα, με τις Αλ και Ακ πρωτεΐνες με το Ρ συστατικό του αμυλοειδούς ή την προλευκωματίνη

Ο αντι-Αλ αντιορός αντέδρασε θετικά με τουλάχιστον 4 Αλ πρωτεΐνες από ορό άλλων ασθενών με πρωτεΐνη Bence-Jones λάμδα τύπου, αλλά δεν αντέδρασε με Ακ, ΑΑ, Ρ συστατικό και προλευκωματίνη.

Ο αντι-Ακ παρουσίασε μερική αντιγονική ομοιότητα με ομόλογες Ακ πρωτεΐνες και κάππα τύπου πρωτεΐνη Bence-Jones, αλλά δεν αντέδρασε με οποιαδήποτε από τις Αλ, ΑΑ συστατικό Ρ και την προλευκωματίνη.

Η ειδικότητα των αντιορών εξετάστηκε πιο εκτεταμένα σε προηγούμενες ανοσοϊστοχημικές, ανοσολογικές ή βιοχημικές μελέτες (40,41,42) • χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον χαρακτηρισμό του αμυλοειδούς που εκχυλίστηκε βιοχημικά από έναν ασθενή με υπερνέφρωμα και αμυλοειδική νευροπάθεια (21).

Ο αντιορός εναντίον της ανθρώπινης προλευκωματίνης αγοράστηκε από την Calbiochem Behring και η ειδικότητά του αποδείχθηκε με ανοσοδιάχυση χρησιμοποιώντας υψηλού βαθμού καθαρότητας προλευκωματίνη μοριακού βάρους 54.980. Ο αντι-προλευκωματινικός ορός έδωσε γραμμές καθίζησης σε συγκεντρώσεις προλευκωματίνης από 0,25 μέχρι 0,05mg/ml αλλά όχι με τις πρωτεΐνες ΑΑ, Ακ, Αλ το συστατικό Ρ ή ανθρώπινες ανοσοσφαιρίνες G και M, το τρίτο συστατικό του συμπληρώματος (C3)



και την μυοσφαιρίνη.

Ο αντι-AA αντιορός καθαρίστηκε περισσότερο μετά από δίοδό του από ανοσοπροσροφητική στήλη AA-αγαρόζης όπως έχει περιγραφεί (41).

Αίγιος αντικονίκλιος IgG, φυσιολογικός ορός κονίκλου, φυσιολογικός ορός αιγός, και σύμπλεγμα περοξειδάσης-αντιπεροξειδάσης (PAP) προμηθεύτηκαν από την Sternberger's Immunochemicals N.Y).

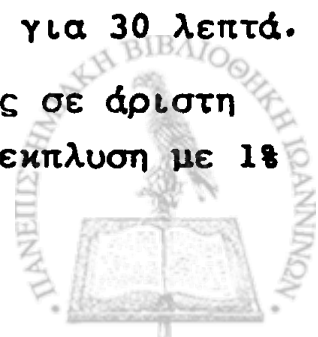
Οι αντιοροί αραιώθηκαν με 1% ορό αιγός σε 0.05M, TBS, -PH 7,6 (tris hydroxymethyl-aminonethane-buffered saline) για την PAP μέθοδο.

Οι κατάλληλες αραιώσεις του ορού καθορίστηκαν με δεσμευτική τιτλοποίηση.

γ) Περοξειδάση-Αντιπεροξειδάση (PAP). Ανοσοϊστοχημική Μέθοδος.

Χρησιμοποιώντας την μέθοδο που περιγράφηκε από τον Sternberger (43) με μερικές παραλλαγές, εφαρμόστηκαν τα παρακάτω βήματα στα παρασκευάσματα μυών και νεύρων που ήταν θετικά για αμυλοειδές:

1. Επώαση με απόλυτη μεθανόλη, που περιέχει 1% H_2O_2 , για 30 λεπτά να δεσμευτεί η ενδογενής περοξειδάση.
2. Επώαση με 3% φυσιολογικό ορό αιγός σε TBS για 30 λεπτά.
3. Επώαση με έναν από τους ληφθέντες αντιορούς σε άριστη αραίωση (1:500 με 1:3.000) για 1 ώρα και εκπλυση με 1% ορό αιγός σε TBS.



4. Επώαση με Αιγείο αντικονίκλειο IgG σε αραιώση 1:20 για 30 λεπτά και έκπλυση με TBS.
5. Επώαση με PAP σε 1:80 αραιώση για 30 λεπτά και έκπλυση.
6. Ενεργοποίηση της Περοξειδάσης με 0,05% τετραϋδροχλωρική διαμίνobenτζιδίνη 3,3% (Sigma Chemical Co) και μείγμα 0,3% H₂O₂ σε 0,05 TBS (pH 7.6) για 5 λεπτά, που ετοιμάζεται λίγο πριν χρησιμοποιηθεί.
7. Επαναχρωματισμός με αιματοξυλίνη του Mayer (σε μερικές περιπτώσεις), αφυδάτωση και εμβαπτισμός σε Permount.

Μάρτυρες: Ο αντιορός αντικαταστάθηκε με την ίδια αραιώση φυσιολογικού αρκού κονίκλου ή αδρανοποιήθηκε με το αντίστοιχο αντιγόνο (10mg αντιγόνου για 1ml αντιορού). Σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές ιστού με αμυλοειδές γνωστών βιοχημικών χαρακτηριστικών από ΑΑ, Αλ, Ακ, και προλευκωματίνη· οι αντιοροί μας αναγνώριζαν ειδικά τον αντίστοιχο τύπο αμυλοειδούς όπως έχει περιγραφεί (21, 42).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α. Κλινική κατάταξη: Από την μελέτη των 39 ασθενών βρέθηκε ότι ο πιο συχνός τύπος αμυλοειδικής πολυνευροπάθειας στο υλικό μας ήταν ο "σποραδικός" (Πίνακας 2). Από τους 39 ασθενείς οι 12 είχαν τον κληρονομικό τύπο χρησιμοποιώντας σαν διαγνωστικό κριτήριο το γεγονός ότι ένα ή δύο μέλη διαδοχικών γενεών ή τουλάχιστον 2 μέλη της ίδιας γενεάς είχαν ιστολογικά αποδειγμένη αμυλοειδική πολυνευροπάθεια. Δώδεκα



Πίνακας 2

Κλινική Ταξινόμηση 39 Ασθενών με Αμυλοειδική Νευροπάθεια, .

<u>Ασθενείς</u>	<u>Αριθμός</u>
1. Με οικογενειακό τύπο και προέλευση:	12
Ελληνική	(2)
Σκανδιναβική	(1)
Maryland	(4)
Πορτογαλική-Βραζιλιανή	(4)
Εβραϊκή	(1)
2. Με κλινικοπαθολογοανατομικά διαγνωσμένη πλασματοκυτταρική δυσκρασία (Τύπος AL)	12
Λάμδα τύπος (AL)	(7)
Κάππα τύπος (AK)	(5)
3. Με "σποραδικό" τύπο	15
(Αρνητικό οικογενειακό ιστορικό και χωρίς κλινικοπαθολογοανατομικά σημεία πλασματοκυτταρικής δυσκρασίας).	



ασθενείς είχαν κλινικοπαθολογοανατομικά αποδειγμένη πλασμα-
τοκυτταρική δυσικκρασία (3 είχαν πολλαπλό μυέλωμα) με μονοκλω-
νική ανοσοσφαινίνη στον ορό και αυξημένο αριθμό πλασματοκυτ-
τάρων στον μυελό των οστών. Πέντε απ' αυτούς τους ασθενείς
είχαν IgGκ γαμμασφαίριναίμία, 4 IgGλ και 3 IgMλ.

Οι υπόλοιποι 15 ασθενείς είχαν τον σποραδικό τύπο
της αμυλοειδικής πολυνευροπάθειας με αρνητικό οικογενειακό
ιστορικό και έλλειψη κλινικοπαθολογοανατομικών σημείων πλασμα-
τοκυτταρικής δυσικκρασίας. Σε κανένα από τους αρρώστους μας
η αμυλοειδική νευροπάθεια δεν ήταν επιπλοκή δευτεροπαθούς
αμυλοείδωσης.

B. Ανοσοϊστοχημικός χαρακτηρισμός των Πρωτεϊνών του Αμυλοειδούς:

Όπως έχουμε ανακοινώσει παλαιότερα (17,21,29) σε όλους τους
τύπους της αμυλοειδικής πολυνευροπάθειας το αμυλοειδές ανι-
χνεύεται καλύτερα με χρώση κρυσταλλικού ιώδους σε τομές με
κρυστάτη, ή με ερυθρό του Κογκό σε τομές παραφίνης. Στους
μύες η ποσότητά του είναι πολύ μεγαλύτερη από τους άλλους
ιστούς (17,28 29, 31) γι' αυτό προτιμήσαμε τις τομές από βιο-
ψία μυός για τις ανοσοϊστοχημικές δοκιμασίες. (Εικόνα 1)

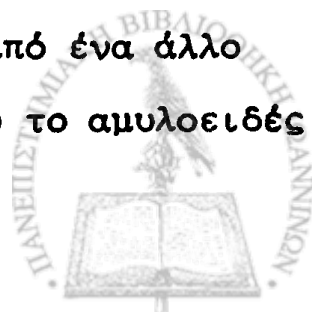


Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3, το αμυλοειδές σ' όλα τα περιστατικά του οικογενούς τύπου αντέδρασε με αντισώματα κατά της προλευκωματίνης, όχι όμως με αντισώματα κατά των πρωτεϊνών ΑΑ, Αλ ή Ακ. Αυτό επιβεβαιώνει και επεκτείνει προηγούμενες παρατηρήσεις μας με ανοσοφθορισμό σε ιστούς 6 ασθενών με κληρονομική αμυλοειδική πολυνευροπάθεια (17). Το αμυλοειδές σε 12 ασθενείς με πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες αντέδρασε με αντισώματα κατά της ελαφρής αλυσίδας του αμυλοειδούς που αντιστοιχούσε με τον ίδιο τύπο της ελαφρής αλυσίδας του ορού (Πίνακας 2), όχι όμως με αντισώματα κατά της προλευκωματίνης ή της πρωτεΐνης ΑΑ.

Το αμυλοειδές του "σποραδικού" τύπου αντέδρασε με τον αντιορό της Αλ σε 10 ασθενείς (Πίνακας 3), με της προλευκωματίνης σε 3 και με της αντι-Ακ σε ένα. Κανένας από αυτούς τους αρρώστους δεν είχε αμυλοειδές τύπου ΑΑ. Σ' έναν ασθενή το αμυλοειδές δεν αντέδρασε με κανένα από τους αντιορούς.

Στην Εικόνα 2 δείχνονται δύο διαδοχικές τομές Βιοψίας μυών από ένα περιστατικό "σποραδικής" αμυλοειδικής νευροπάθειας που είναι θετικές για αμυλοειδές με τη χρώση του κρυσταλλικού ιώδους (2Α). Οι αμέσως επόμενες τομές έδωσαν θετική αντίδραση με τον αντιορό Αλ (2Β), όχι όμως με τους άλλους αντιορούς.

Στην Εικόνα 3 δείχνονται τα ευρήματα από ένα άλλο άρρωστο με "σποραδική" αμυλοείδωση, του οποίου το αμυλοειδές



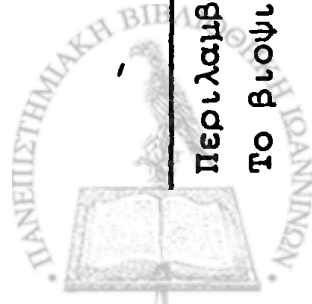
αντέδρασε με τον αντιπρολευκωματινικό ορό. Τα παρασκευάσματα της εικόνας 4 προέρχονται από έναν άρρωστο με "σποραδικό" αμυλοειδές στον οποίο βρέθηκε επίσης θετικό για αμυλοειδές υπερνέφρωμα. Το αμυλοειδές σ' αυτή την περίπτωση αντέδρασε μόνο με τον αντίορό Αλ (Εικόνα 4). Όταν αφαιρέθηκε ο όγκος και εκχυλίστηκε το αμυλοειδές, επιβεβαιώθηκε με βιοχημικές αναλύσεις ότι πράγματι το αμυλοειδές ήταν του τύπου Αλ (21) γεγονός που αύξάνει την αξιοπιστία της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου.



Πίνακας 3

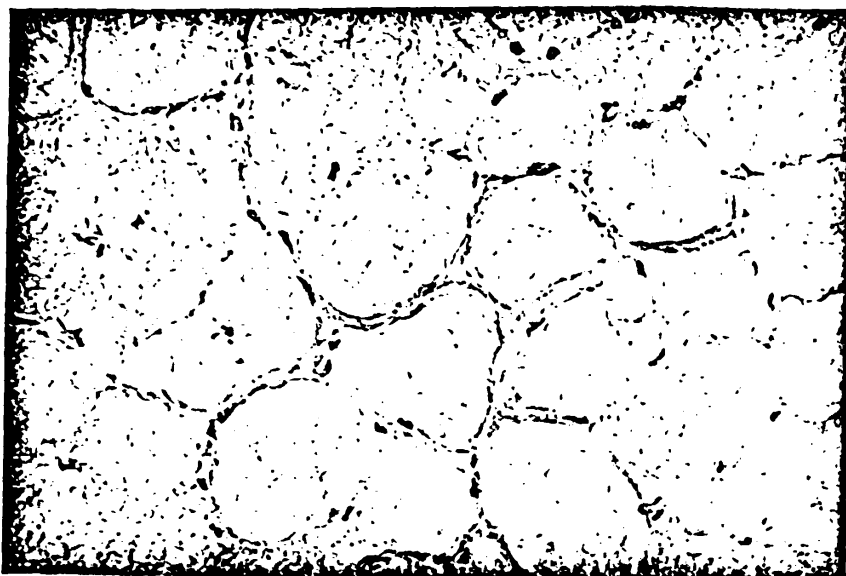
Ανοσοϊστοχημικός χαρακτηρισμός του Αμυλοειδούς σε 39 Ασθενείς με Αμυλοειδική Πολυνευροπάθεια
Θενείς με Αμυλοειδική Πολυνευροπάθεια Ανοσολογικός χαρακτηρισμός του Αμυλοειδούς

	Αντι- Προλευκωματίνη	Αντί- Αλ	Αντί- Ακ	Αντί- ΑΑ	Άλλοι αντιοροί*
Οικογενής τύπος (12)	+(12)	--	--	--	--
Ελληνικός (2)	+(2)	--	--	--	--
Σκανδιναβικός (1)	+(1)	--	--	--	--
Maryland (4)	+(4)	--	--	--	--
Πορτογαλικός-Βραζιλιανός (4)	+(4)	--	--	--	--
Εβραϊκός (1)	+(1)	--	--	--	--
Πλασματοκυτταρικός δυσκρασικός τύπος (12)					
Λάμδα τύπος Αλ	--	+(7)	--	--	--
Κάππα τύπος Ακ	--	--	+(5)	--	--
"Σποραδικός" τύπος (15)**	+(3)	+(10)	+(1)	--	--

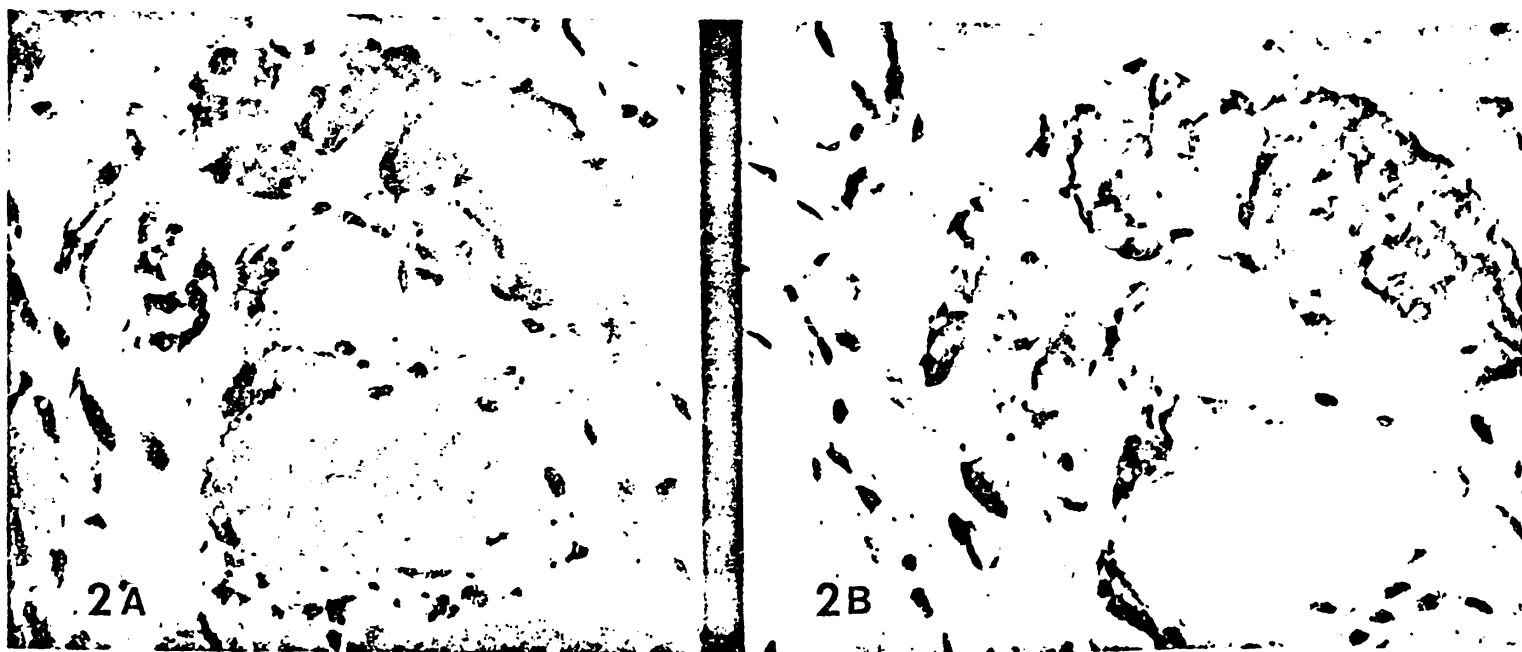


Περιλαμβάνουν αντι-IgG, IgM, IgA, αντι-λευκωματίνη και αντιϊνωδογόνο.

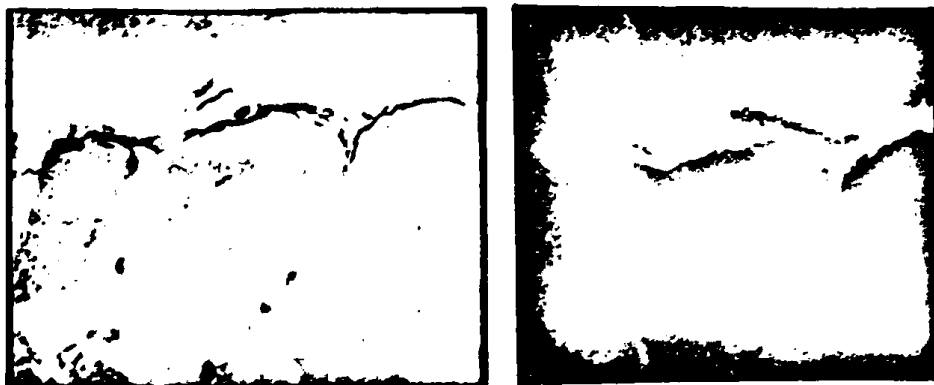
Το βιοψικό υλικό ενός ασθενή δεν αντέδρασε με κανένα από τους αντιορούς που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 1: Εγκάρσια τομή μυός με κρυστάττη από ασθενή με αμυλοειδική πολυνευροπάθεια χρωσμένη με κρυσταλλικό ιώδες. Το αμυλοειδές φαίνεται εντοπισμένο μεταξύ των μυϊκών ινών.



Εικόνα 2: Εγκάρσιες διαδοχικές τομές μυός από ασθενή με σποραδική αμυλοειδική νευροπάθεια. Το αμυλοειδές, χρωσμένο με κρυσταλλικό ιώδες (2A) αντιδρά ειδικά μόνο με τον αντιορό Αλ (2B). Και στις δύο περιπτώσεις χρωματίζονται οι ίδιες ακριβώς περιοχές.



Εικόνα 3: Εγκάρσιες διαδοχικές τομές μυός αρρώστου με "σποραδική" αμυλοειδική νευροπάθεια. Η αριστερή εικόνα δείχνει την εναπόθεση αμυλοειδούς μετά από χρώση με κρυσταλλικό ιώδες, ενώ η δεξιά δείχνει την ειδική αντίδραση του αντιπρολευκωματινικού ορού με το αμυλρειδές. Σημειώστε ότι και στις δύο περιπτώσεις χρωματίζονται οι ίδιες ακριβώς περιοχές.



Εικόνα 4. Εγκάρσιες παράλληλες διαδοχικές τομές αγγείου ενός νεύρου αρρώστου με σποραδική αμυλοειδική νευροπάθεια και υπερνέφρωμα. Το αμυλοειδές χρωσμένο με κρυσταλλικό ιώδες (αριστερά) αντιδρά ειδικά μόνο με αντι-Αλ (δεξιά).

Σ Υ Ζ Η Τ Η Σ Η

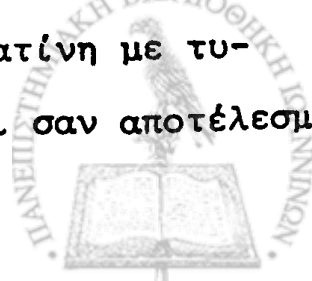
Από τους 39 ασθενείς με κληρονομική και επίκτητη αμυλοειδική πολυνευροπάθεια που μελετήθηκαν διεξοδικά στο ΝΙΗ τα τελευταία 15 χρόνια, βρέθηκε ότι ο πιο συχνός τύπος αμυλοειδικής πολυνευροπάθειας ήταν ο "σποραδικός" που περιλαμβάνει ασθενείς με αρνητικό οικογενειακό ιστορικό και χωρίς κλινικοπαθολογοανατομικά σημεία πλασματοκυτταρικής δυσκρασίας.

Δώδεκα από τους 39 ασθενείς είχαν τον οικογενή τύπο, 12 είχαν τον τύπο που συνοδεύει τις πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες και 15 ήταν "σποραδικές". Χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημικές μεθόδους σε βιοψίες μυός και νεύρου θετικές για αμυλοειδές και ειδικά αντισώματα κατά των πρωτεϊνών του αμυλοειδούς. Βρήκαμε ότι το αμυλοειδές στους ασθενείς με "σποραδική" αμυλοειδική πολυνευροπάθεια αντέδρασε ειδικά με την αντι-προλευκωματίνη σε 3 αρρώστους, με αντι-Αλ σε 10 και με αντι-Ακ σε 1. Αυτό δείχνει ότι το αμυλοειδές στον "σποραδικό" τύπο είναι συνήθως ανοσοκυτταρικής προέλευσης και φαίνεται ότι σχετίζεται με μια λ ελαφρή αλυσίδα, παρόλο που δεν υπήρχαν εμφανή σημεία πλασματοκυτταρικής δυσκρασίας ή μυελώματος. Σε κανένα από τους 39 ασθενείς το αμυλοειδές δεν αντέδρασε με τον αντιορό κατά του ΑΑ. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η αμυλοειδική νευροπάθεια δεν σχετίζεται με την δευτεροπαθή ΑΑ, "αντιδραστική" αμυλοείδωση, και επιβεβαιώνει προηγούμενες κλινικές παρατηρήσεις μας (23).



Στον οικογενή τύπο της αμυλοειδικής πολυνευροπάθειας, τα εκχυλίσματα του αμυλοειδούς αντιδρούν ειδικά με την αντι-προλευκωματίνη (16,25-27) και η ανάλυσή της αλληλουχίας των αμινοξέων των πρωτεϊνών αυτού του αμυλοειδούς τουλάχιστον τριών διαφορετικών αρρώστων (16,25-27) επιβεβαίωσε ότι η προλευκωματίνη ή τα παράγωγά της αποτελούν την βάση αυτών των ινιδιακών πρωτεϊνών. Παρόλο που υπάρχουν ορισμένες μικρές διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων μεταξύ της φυσιολογικής ανθρώπινης προλευκωματίνης και της προλευκωματίνης του αμυλοειδούς (25-27), έχει βρεθεί ότι οι ιστικές εναποθέσεις του αμυλοειδούς στον οικογενή τύπο έχουν κοινά αντιγονικά χαρακτηριστικά με την προλευκωματίνη (25). Επιπλέον μόνον αντιοροί που στρέφονται κατά της προλευκωματίνης και όχι κατά των άλλων πρωτεϊνών του ορού αντιδρούν ειδικά με το αμυλοειδές του οικογενούς τύπου (16,17,25). Αυτό επιβεβαιώθηκε και σ'αυτή την εργασία μελετώντας 12 ιστούς θετικούς για αμυλοειδές από ασθενείς 5 διαφορετικών εθνικοτήτων με οικογενή αμυλοειδική πολυνευροπάθεια.

Σε τρεις ασθενείς με "σποραδικού" τύπου αμυλοειδές αυτό αντέδρασε ειδικά με την αντι-προλευκωματίνη (όχι όμως με τα άλλα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, Πίνακας 3). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι είναι πιθανόν το αμυλοειδές που παρατηρείται σε μερικούς αρρώστους με νευροπάθεια "σποραδικού" τύπου να προήλθε από την φυσιολογική προλευκωματίνη με τυχαία μετάλλαξη. Μια τέτοια μετάλλαξη ίσως έχει σαν αποτέλεσμα



την παραγωγή μιας ασυνήθιστης προλευκωματίνης που στη συνέχεια διασπάται, συνδέεται και καθιζάνει σχηματίζοντας το αμυλοειδές. Δεν είναι γνωστό αν οι απόγονοι αυτών των 3 ασθενών με "σποραδική" αμυλοειδική πολυνευροπάθεια από προλευκωματίνη έχουν κληρονομήσει με τον επικρατούντα χαρακτήρα μια γενετική προδιάθεση για τη σύνθεση "αμυλοειδογόνου" προλευκωματίνης που θα έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση αμυλοειδικής πολυνευροπάθειας σε άλλα μέλη της οικογένειας.

Στην αμυλοειδική πολυνευροπάθεια που συνδέεται με πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες οι πρωτεΐνες του αμυλοειδούς αποτελούνται από τα μεταβλητά τμήματα των ελαφρών αλυσίδων των ανοσοσφαιρίνων (46). Παρόλο δε που έχουν ιδιοτυπική αντιγονική ειδικότητα, υπάρχουν σημαντικές ομοιότητες ή ακόμα και ταυτότητα μεταξύ των πρωτεϊνών των αμυλοειδικών ινιδίων μιας δεδομένης υποομάδας των μεταβλητών τμημάτων σε διαφορετικά άτομα (47). Επιπλέον, ελαφρές αλυσίδες με ορισμένες υποομάδες μεταβλητών τμημάτων δημιουργούν αμυλοειδές συχνότερα από ότι άλλες ελαφρές αλυσίδες (47). Αυτό υποδηλώνει ότι αντιοροί που παρασκευάζονται εναντίον μιας αμυλοειδικής πρωτεΐνης με μεταβλητό τμήμα που ανήκει σε μια συγκεκριμένη υποομάδα των ελαφρών αλυσίδων, είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τυποποίηση αμυλοειδικών πρωτεϊνών με ίδιες υποομάδες μεταβλητών τμημάτων. Οι αντιοροί του εμπορίου κατά φυσιολογικών ελαφρών αλυσίδων δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανο-



σοῖστοχημική εξέταση των περισσότερων πρωτεϊνών του αμυλοειδούς, επειδή οι περισσότερες αμυλοειδικές πρωτεΐνες περιέχουν μόνο ένα τμήμα (ή κανένα) του σταθερού τμήματος της ελαφρής αλυσίδας που είναι υπεύθυνο για την διασταυρωμένη αντίδραση με φυσιολογικές ελαφρές αλυσίδες. Οι δικοί μας αντιοροί κατά των πρωτεϊνών του αμυλοειδούς Αλ και Ακ που χρησιμοποιήσαμε για να χαρακτηρίσουμε το αμυλοειδές στους αρρώστους μας με πλασματοκυτταρική δυσκρασία και τις "σποραδικές" μορφές, αντέδρασαν επίσης με αρκετά Αλ και Ακ πρωτεϊνικά αμυλοειδικά ινίδια από αρρώστους με βιοχημικά αποδεδειγμένο αμυλοειδές Αλ ή Ακ (40,42,48,49). Με τη βοήθειά τους βρέθηκε επίσης ότι το εστιακό αμυλοειδές του ουροποιητικογεννητικού συστήματος είναι τύπου Αλ (48). Αν και η θετική αντίδραση των αντιορών Αλ ή Ακ είναι ειδική, σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος με αυτούς τους αντιορούς δεν μπορεί να αποκλεισθεί η παρουσία αντιγόνων Αλ ή Ακ στα αντίστοιχα αμυλοειδή (42). Αυτό ίσως εξηγεί το αρνητικό αποτέλεσμα ενός από τα 15 περιστατικά με "σποραδική" αμυλοείδωση της μελέτης μας (Πίνακας 3).

Η ειδικότητα των ανοσοῖστοχημικών μεθόδων που χρησιμοποιήσαμε επιβεβαιώθηκε περαιτέρω σε ένα περιστατικό "σποραδικής" αμυλοειδικής πλυνευροπάθειας όπου χρησιμοποιήθηκαν, εκτός από τις ανοσοῖστοχημικές, βιοχημικές και ανοσοχημικές μέθοδοι (21).

Η θέση όπου παράγονται οι αμυλοειδογόνες ελαφρές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών στους αρρώστους με "σποραδική"



αμυλοειδική πολυνευροπάθεια που δεν είχαν τουλάχιστον εμφανή σημεία πλασματοκυτταρικής δυσκρασίας, δεν είναι γνωστή. Είναι πιθανό, ότι αυτές οι ελαφρές αλυσίδες παράγονται από κύτταρα του μυελού των οστών και των λεμφικών οργάνων ή από λεμφοπλασματοκυτταρικά τμήματα άλλων ιστών σαν αποτέλεσμα μιας μη ειδικής χρόνιας φλεγμονώδους εξεργασίας. Τέτοια εξεργασία βρέθηκε στο αμυλοειδές του τύπου Αλ του ουροποιητικογεννητικού συστήματος, παρόλο που δεν υπήρχε εμφανής πλασματοκυτταρική δυσκρασία (48). Παρόμοια χρόνια φλεγμονώδη εξεργασία βρήκαμε στον όγκο ενός ασθενή μας με "σποραδική" αμυλοειδική πολυνευροπάθεια συνδεόμενη με υπερνέφρωμα, πάλι χωρίς εμφανή σημεία πλασματοκυτταρικής δυσκρασίας (21). Υποθέτουμε ότι μερικά από αυτά τα λεμφοειδή φλεγμονώδη κύτταρα ίσως μετατράπηκαν σε μονοκλωνικά που εκκρίνουν μια παθολογική ελαφρή αλυσίδα. Αυτή μετατρέπεται σε αμυλοειδογόνο και δεν μπορεί να ανιχνευθεί με τις τρέχουσες μεθόδους, επειδή εκκρίνεται σε μικρές ποσότητες (21,48). Αυτές οι ελαφρές αλυσίδες διασπείρονται συμμετρικά αν κρίνει κανένας από την σοβαρή συμμετρική αισθητικοκινητική και αυτόνομη αμυλοειδική νευροπάθεια που παρουσιάζουν όλοι αυτοί οι ασθενείς. Ο τρόπος τους για το περιφερικό νευρικό σύστημα παραμένει ακόμα ανεξήγητος (8).

Η μέθοδος PAP, με μη σεσημασμένο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, είναι αρκετά ευαίσθητη για να εφαρμοσθεί σε ιστούς μονιμοποιημένους με φορμαλδεΰδη



και εγκλεισμένους σε παραφίνη. Όταν δε συνδυαστεί με ειδικούς αντιορούς κατά των αμυλοειδικών πρωτεϊνών, είναι ένα χρήσιμο μέσο για την διάγνωση, ταξινόμηση και σχεδιασμό αποτελεσματικών θεραπευτικών σχημάτων σε ασθενείς με αμυλοειδική πολυνευροπάθεια. Με βάση τα ευρήματα μας, ότι ο πιο συνηθισμένος τύπος αμυλοειδούς στη σποραδική αμυλοειδική πολυνευροπάθεια είναι αυτός που προέρχεται από τα ανοσοκύτταρα παρά την έλλειψη πλασματοκυτταρικής δυσκρασίας, πιστεύουμε ότι είναι αιτιολογημένη μια δοκιμή με ανοσοκατασταλτική θεραπεία για να τεθεί υπό έλεγχο η εξέλιξη της νόσου. Παρόλο που οι θεραπείες που εφαρμόσαμε σε λίγους ασθενείς με πρεδνιζόνη και μελφαλάνη ή χλωραμβουκίλη και πλασμαφαίρεση δεν ήταν αποτελεσματικές (με εξαίρεση έναν ασθενή που βελτιώθηκε ελαφρά), ισχυρότερα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα που θα ανακαλυφθούν στο μέλλον ίσως αποδειχθούν αποτελεσματικότερα.



Σ Υ Μ Π Ε Ρ Α Σ Μ Α Τ Α

Τα συμπεράσματα από αυτή τη μελέτη, είναι τα εξής:

1. Η πιο συχνή μορφή Αμυλοειδικής Πολυνευροπάθειας είναι αυτή που οφείλεται σε "σποραδική" αμυλοείδωση και η οποία εμφανίζεται σε αρρώστους χωρίς οικογενειακό ιστορικό ή πλασματοκυτταρική δυσκρασία.
2. Η προλευκωματίνη του ορού έχει κοινές αντιγονικές ομάδες (determinant) με το αμυλοειδές όλων των κληρονομικών αμυλοειδικών πολυνευροπαθειών ανεξάρτητα από την εθνικότητα των αρρώστων. Κατά συνέπεια είναι κοινή πρόδρομη αμυλοειδογόνος ουσία όλων των οικογενών αμυλοειδικών πολυνευροπαθειών (Αμερικανικού, Πορτογαλικού, Ελληνικού, Σουηδικού, Εβραϊκού ή Ιαπωνικού τύπου).
3. Στη σποραδική μορφή των αμυλοειδικών πολυνευροπαθειών το αμυλοειδές τις πιο πολλές φορές είναι τύπου ανοσοσφαιρίνης και οφείλεται στο μεταβλητό τμήμα της ελαφρής αλυσίδας μιας μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης παρόλο που αυτοί οι άρρωστοι δεν έχουν σημεία πλασματοκυτταρικής δυσκρασίας ή πρωτεΐνη Bence-Jones.
4. Η παρούσα μελέτη προσφέρει για πρώτη φορά ενδείξεις ότι η σποραδική αμυλοειδική πολυνευροπάθεια θα πρέπει να αντιμετωπίζεται με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα όπως δηλαδή εκείνη του πλασματοκυτταρικού τύπου.



5. Η ανοσοϊστοχημεία προσφέρει ένα εύκολο, γρήγορο και αξιόπιστο μέσο ταξινόμησης του αμυλοειδούς των αρρώστων με αμυλοειδική πολυνευροπάθεια και μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τον κλινικό για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς και για τη προγεννητική καθοδήγηση στις οικογένειες με προσβεβλημένα μέλη.



Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Η

Σ' αυτή την εργασία αναλύονται τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα 39 αρρώστων με Αμυλοειδική Πολυνευροπάθεια (ΑΠ) και εξετάζονται τα ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά του αμυλοειδούς στις βιοψίες μυός και νεύρου σε μια προσπάθεια να ταξινομηθεί ο τύπος του αμυλοειδούς και να συγκεντρωθούν πληροφορίες που θα βοηθήσουν στην θεραπευτική, προγνωστική και γενετική καθοδήγηση αυτών των ασθενών. Η ανοσοϊστοχημική εξέταση των βιοψικών παρασκευασμάτων έγινε με την τεχνική της περοξειδάσης-αντιπεροξειδάσης (ΠΑΠ) χρησιμοποιώντας ειδικούς αντιορούς που στρέφονται κατά των εξής διαφορετικών χημικών τύπων της αμυλοειδικής πρωτεΐνης:

- α) της μεταβλητής περιοχής των ελαφρών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών του αμυλοειδούς κ (Ακ) και λ (Αλ), β) του ΑΑ αμυλοειδούς ("δευτεροπαθούς" ή αντιδραστικού τύπου) και
- γ) της φυσιολογικής ανθρώπινης προλευκωματίνης.

Δώδεκα (12) από τις 39 περιπτώσεις της Αμυλοειδικής Πολυνευροπάθειας ήταν οικογενείς, 12 σχετίζονταν με πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες (ΠΚΔ) και 15 ήταν "σποραδικές". Στην "σποραδική" ΑΠ η νευροπάθεια ήταν κλινικά όμοια με τους άλλους τύπους αλλά δεν συνυπήρχε ΠΚΔ ή θετικό οικογενειακό ιστορικό. Η ανοσοϊστοχημική εξέταση έδειξε ότι στην ΠΚΔ το αμυλοειδές αντέδρασε με τους αντιορούς Αντι-Ακ ή Αντι-Αλ, ενώ στην οικογενή ΑΠ 6 διαφορετικών εθνικοτήτων το αμυλοειδές αντέδρασε με την αντι-προλευκωματίνη. Στις "σποραδικές" μορφές το αμυλοειδές είχε αντιγονικά χαρακτηριστικά Αλ σε 10 αρρώστους,



Ακ σε 1 και προλευκωματίνης σε 3. Σε έναν ασθενή με σποραδική ΑΠ το ότι το αμυλοειδές ήταν Αλ τύπος επιβεβαιώθηκε με βιοχημική ανάλυση. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα συμπεραίνονται τα εξής: 1) Ο πιο συχνός τύπος ΑΠ στο υλικό μας ήταν ο "σποραδικός" με αρνητικό οικογενειακό ιστορικό και χωρίς ΠΚΔ. 2) Η ανθρώπινη προλευκωματίνη έχει κοινά αντιγόνα με το αμυλοειδές της κληρονομικής ΑΠ διαφορετικών εθνικοτήτων και φαίνεται ότι είναι ο κοινός πρόδρομος για όλες τις περιπτώσεις κληρονομικής ΑΠ. 3) Στον "σποραδικό" τύπο της ΑΠ το αμυλοειδές προέρχεται συχνότερα από την ελαφρή αλυσίδα των ανοσοσφαιρινών έστω κι αν λείπουν εμφανή σημεία για ΠΚΔ και δεν κυκλοφορούν μονοκλωνικές πρωτεΐνες. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει για πρώτη φορά ότι η σποραδική ΑΠ θα πρέπει να αντιμετωπίζεται με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα όπως η ΑΠ της ΠΚΔ. Ένας ασθενής με σποραδική ΑΠ που βρέθηκε να έχει Ακ αμυλοειδές, έχει βελτιωθεί με ανοσοκαστολή και πλασμαφαίρεση. 4) Η ανοσοϊστοχημική εξέταση είναι μια ταχεία και αξιόπιστη μέθοδος ταξινόμησης του αμυλοειδούς και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην επιλογή θεραπείας και τη γενετική καθοδήγηση.



SUMMARY

Amyloid polyneuropathy (AP) is either hereditary or associated with plasma cell dyscrasias (PCD) ("primary"). In some patients with hereditary form of AP, the precursor amyloidogenic protein is a variant of prealbumin whereas in patients with PCD, the precursor amyloidogenic protein is the variable region of the immunoglobulin light chain.

In the present study we reviewed the clinical and laboratory picture of 39 patients with AP referred to the NIH and examined the immunocytochemical features of the amyloid deposits in the patient's muscle and nerve biopsies in an attempt to rapidly categorize the type of amyloid and provide a tool for therapeutic, prognostic and genetic guidance. For immunocytochemistry we studied, in a peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique, the amyloid deposits in paraffin-embedded muscle and nerve biopsy specimens using specific antisera raised against the following different chemical types of amyloid fibril proteins: a) variable regions of amyloid immunoglobulin light chains κ ($A\kappa$) and λ ($A\lambda$) b) against amyloid AA ("secondary" or "reactive" type) and c) against normal human prealbumin.

From the clinical review of 39 cases of AP we found that 12 patients had the familial type, 12 were associated with a clinicopathologically identified PCD and 15 were "sporadic." In "sporadic" AP the neuropathy was clinically similar to the other types but it was not associated with an identified PCD or positive family history. Immunocytochemistry revealed that in PCD the amyloid immunoreacted with anti $A\kappa$ or anti $A\lambda$, corresponding to the patient's circulating κ or λ light chain and in the familial AP of 6 different ethnic groups the amyloid immunoreacted with antiprealbumin. In the "sporadic" form we found that the amyloid had $A\lambda$ antigenic determinants in 10 cases, $A\kappa$ in 1 and prealbumin in 3; in one case of sporadic AP the $A\lambda$ nature of amyloid was confirmed biochemically on the



extracted amyloid fibrils.

We conclude that: 1) The most common type of AP in our series was the "sporadic" form with negative family history and absence of PCD, 2) Human prealbumin or its variant shares common antigenic determinants with the amyloid of familial AP of several ethnic groups and appears to be the common precursor for all the cases of familial AP, 3) AP does not occur with the secondary, AA type, of reactive amyloidosis, 4) In the "sporadic" form of AP the amyloid is more often of immunoglobulin light chain origin, even in the absence of overt signs of PCD, providing, for the first time, evidence that "sporadic" AP should be treated with immunosuppressive therapy like the AP of PCD. One patient with "sporadic AP," found to be $A\kappa$, has improved with immunosuppression and plasmapheresis. 6) Immunocytochemistry is a rapid and reliable means of categorizing amyloid of different types and it can be used to determine therapy and provide genetic guidance.



REFERENCES

1. Alterman K: A historical note on the iodine-sulphuric acid reaction of amyloid. *Histochemistry* 49:131-143, 1976.
2. Budd G: On diseases of the Liver. Second Edition, Philadelphia, Blanchard and Lea., 1853.
3. Cohen AS: Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* 1967;277:522-30, 574-83, 628-38.
4. Glenner GG, Harada M, Isersky C: The purification of amyloid fibril proteins. *Prep. Biochem.* 1972;2:39-51.
5. Glenner GG, Harada M, Isersky C, Cuatrecasas P, Page D, Keiser H: Human amyloid protein: diversity and uniformity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970;41:1013-9.
6. Harada M, Isersky C, Cuatrecasas P. et al: Human amyloid protein: chemical variability and homogeneity. *J. Histochem. Cytochem.* 1971;19:1-15.
7. Eanes FD, Glenner GG: X-ray diffraction studies of amyloid filament. *J. Histochem. Cytochem.* 1968;16:673-7.
8. Glenner GG: Amyloid deposits and amyloidosis: the β -fibrilloses. *N. Engl. J. Med.* 302:1283-1292; 1333-1343, 1980.
9. Cohen AS, Benson MD: Amyloid neuropathy. In *Peripheral Neuropathy*, edited by Dyck PJ, thoma PK, Lambert EH, p. 1067-1091, Philadelphia, WB Saunders Co.
10. Cohen AS, Shirahoma T: Electron microscopic analysis of isolated amyloid fibrils from patients with primary, secondary and myeloma-associated disease: a study utilizing shadowing and negative staining techniques. *Is. J. Med. Sci.* 9:849-856, 1973.



11. Lieb E: Permanent stain for amyloid. *Am. J. Clin. Pathol.* 17:413-414, 1947.
12. Kyle RA, Greipp PR: Amyloidosis (AL), clinical and laboratory features in 229 cases. *Mayo Clin. Proc.* 58:665-683, 1983.
13. Levin M, Franklin EC, Frangrone B, Pras M: The amino acid sequence of a major nonimmunoglobulin component of some amyloid fibrils. *J. Clin. Invest.* 51:2773-2776, 1972.
14. Benson MD, Cohen AS: Serum amyloid, A protein in amyloidosis, rheumatic and neoplastic diseases. *Arthritis Rheum.* 22:36-42, 1979.
15. Husby G, Sletten K, Michaelson TE et al: Alternative non-immunoglobulin origin of amyloid fibrils. *Nature (New Biol)* 1972; 238:187.
16. Costa PP, Figueira AS, Bravo ER. Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978;75:4499-503.
17. Dalakas MC, Engel WK: Amyloid in hereditary amyloid polyneuropathy is related to prealbumin. *Arch. Neurol.* 1981;38:420-422.
18. Sletten K, Westermark P, Natvig JB. Characterization of amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid. *J. Exp. Med.* 1976;143:993-8.
19. Cathart ES, Skinner M, Cohen AS. Immunogenicity of amyloid. *Immunology* 1971;20:945-54.
20. Dyck RF, Evans DJ, Lockwood CM, Rees AS, Turner D, Pepys MB: Amyloid P-component in human glomerular basement membrane: abnormal patterns of immunofluorescence staining in glomerular disease. *Lancet* 2:606-609, 1980.



21. Dalakas MC, Fujihara S, Askanas V, Engel WK, Glenner GG: Nature of amyloid deposits in hypernephroma. Immunocytochemical studies in 2 cases associated with amyloid polyneuropathy. Am. J. Pathol. ^(116: 447-454) 1984.
22. Pras M, Franklin EC, Shibolet S, Fromgrune B: Amyloidosis associated with renal cell carcinoma of the AA type. Am. J. Med. 73:426-429, 1982.
23. Benson MD, Cohen AS, Brand KD, Cathcart ES: Neuropathy M components and amyloid. Lancet 1:10-13, 1975.
24. Dahlin DC: Amyloidosis. Proc. Staff Meet. Mayo Clin. 24:637, 1949.
25. Benson MD: Partial amino acid sequence homology between an heredofamilial amyloid protein and human plasma prealbumin. J. Clinl Invest. 67:1035-1041, 1981.
26. Pras M, Franklin EC, Prelli F, Frangrone B: A variant of prealbumin from amyloid fibrils in familial polyneuropathy of Jewish origin. J. Exp. Med. 154:989-993, 1981.
27. Shoi S, Okano A: Amyloid fibril protein in familial amyloid polyneuropathy. Neurology 31:186-190, 1981.
28. Trotter JL, Engel, WK, Ignaczak TF: Amyloidosis with plasma cell dyscrasia. An overlooked cause of adult onset sensorimotor neuropathy. Arch. Neurol. 34:209-214, 1977.
29. Dalakas MC, Engel WK: Role of immunoglobulin light chains in the pathogenesis of amyloid polyneuropathy associated with occult plasma-cell dyscrasia. Tran. Am. Neurol. Assoc. 1979;104:227-229.
30. Rubinow A, Cohen AS: Skin involvement in familial amyloidotic polyneuropathy. Neurology 1981;31:1341-5.



31. Dalakas MC, Engel WK: Polyneuropathy with monoclonal gammopathies: Studies of 11 patients. *Ann. Neurol.* 10:45-52, 1981.
32. Blom S, Steen L, Zetterlund B: Familial amyloidosis with polyneuropathy - Type I. A neurophysiological study. *Acta Neurol. Scand.* 63:99-110, 1981.
33. Kermohan JW, Woltman HW: Amyloid neuritis. *Arch. Neurol. Psychiat.* 27:132-140, 1967.
34. Strich SJ, Wade G: Primary amyloidosis presenting with peripheral neuritis and heart failure. *Lancet* 2:70-71, 1953.
35. De Navarsquez S, Treble HA: A case of generalized amyloid disease with involvement of nerves. *Brain* 61:116-128, 1974.
36. Sullivan JF, Twitchell TE, Gherardi GJ et al: Amyloid polyneuropathy. *Neurology* 5:847-854, 1955.
37. Verghese JP, Bradley WG, Nemni R, McAdam KPW: Amyloid neuropathy in multiple myeloma and other plasma cell dyscrasias. *J. Neurol. Sci.* 1983, 59:237-246.
38. Dalakas MC, Papadopoulos NM: Paraproteins in the spinal fluid of patients with paraproteinemic polyneuropathies. *Ann. Neurol.* 15:590-593, 1984.
39. Dalakas MC, Engel WK: Immunoglobulin deposits in chronic relapsing polyneuropathies. *Arch. Neurol.* 37:637-640, 1980.
40. Isersky C, Ein D, Page DL, Haradu M, Glenner GG: Immunochemical cross-reactions of human amyloid proteins with human immunoglobulin light polypeptide chains. *J. Immunol.* 108:486-93, 1972.
41. Linke RP, Sipe JD, Pollock S, Ignaczak TF, Glenner GG: Isolation of a low molecular weight serum component antigenically related to an amyloid fibril protein of unknown origin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 72:1473-6, 1975.



42. Fujihara S, Balow JE, Costa JC, Glenner GG: Identification and classification of amyloid in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections by the unlabeled immunoperoxidase method. *Lab. Invest.* 43:358-65, 1980.
43. Sternberger LA: Immunocytochemistry. Ed. 2, p. 104, New York, John Wiley and Sons Inc. 1979.
44. Ein D, Kimura S, Terry WD, Magnotto J, Glenner GG: Amino acid sequence of an amyloid fibril protein of unknown origin. *J. Biol. Chem.* 247:5653-5, 1972.
45. Kimura S, Guyer R, Terry WD, Glenner GG: Chemical evidence for λ -type amyloid fibril proteins. *J. Immunol.* 109:891-2, 1972.
46. Glenner GG, Terry WD, Harada M, Isersky C, Page DL: Amyloid fibril proteins: proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analysis. *Science* 172:1150-1, 1971.
47. Natvig JB, Wastermark P, Sletten K, Husby G, Michaelson T: Further structural and antigenic studies of light-chain amyloid proteins. *Scand. J. Immunol.* 14:89-93, 1981.
48. Fujihara S, Glenner GG: Primary localized amyloidosis of the genitourinary tract. Immunohistochemical study on 11 cases. *Lab. Invest.* 44:55-60, 1981.
49. Glenner GG, Terry WD, Isevky C. Amyloidosis: its nature and pathogenesis. *Semin. Hematol.* 10:65-86, 1973.

