

RENAL AMİLOİD BİRİKİMLERİNİN TAYİNİNDE KONGO KIRMIZISI FLÖRESANSI

Dr. Sait ŞEN, Dr. Yeşim ERTAN, Dr. Gülçin BAŞDEMİR

ÖZET: Amiloid birikimleri çeşitli nedenlerle Kongo kırmızısı (KK) boyama yöntemiyle saptanamayabilir. Kongo kırmızısı flöresansının (KKF) amiloid birikimlerini belirleme- de daha duyarlı bir yöntem olduğu ileri sürülmektedir. Bu çalışmada böbrek iğne biopsilerinin KK uygulanmış frozen ve parafin kesitleri flöresan mikroskopta da KKF ile değerlendirildi. KKF ile 82 frozen, 34 parafin ve 20 parafin+frozen kesit çalışıldı. Olguların 15'inde amiloid birikimi (13 AA, 2 AL) saptandı. Frozen ile parafin kesit ve KK ile KKF arasında, yalnızca pozitiflik ve negatiflik saptanmadı. Ancak daha önce böbrek iğne biopsisi yapılmış iki olgunun ilk biopsilerinde saptanamayan amilo- id birikimi KKF ile saptanabildi. Daha önce birikimi KK ile saptanamayan iki olgu nedeniyle KKF'nin KK'dan daha duyarlı olduğu düşünüldü. KKF, hem parafin hem de frozen kesitlerde uygulanabilir. Rutin olarak immunofloresan inceleme paneline KK boyanmış bir kesit eklenebilir. Işık mikroskobunda KK ile birikim saptanmayan olgu- lar KKF ile değerlendirilmeden rapor edilmemelidir.

ANAHTAR KELİMELE: Amiloid, amiloidozis, böbrek patolojisi, böbrek transplantasyonu, immunhistokimya

SUMMARY: CONGO RED FLUORESCENCE IN DIAGNOSIS OF RENAL AMYLOID DEPOSITS. For different reasons amyloid deposits may not be observed with Congo red (CR) staining method. Congo red fluorescence (CRF) is suggested to be more sensitive. In this study, renal biopsy frozen and paraffin sections stained with CR were studied under fluorescence microscope for CRF. 82 frozen, 34 paraffin and 20 paraffin plus frozen sections were studied with CRF. In 15 of the patients (13 AA, 2 AL) amyloid deposits were observed. Between frozen and paraffin sections, CR and CRF false positive and negative results have not been observed. But two of the cases which were negative for amyloid deposits on the previous biopsy, were diagnosed as amyloidosis with CRF. Because of this two cases which were amyloid ne- gative with CR, we think that CRF is more sensitive than CR. CRF can be used both with frozen and paraffin sections. As a routine, CR stained section could be ad- ded to immunofluorescence study panel. Cases which are observed under light microscope as amyloid negative, should be studied with CRF before final diagnosis.

KEY WORDS: Amyloid, amyloidosis, renal pathology, kidney transplantation, immunohistochemistry

GİRİŞ

Birçok farklı edinsel veya ailesel etyolojik faktör, çeşitli or- ganlarda amiloid birikimine neden olmaktadır (1-10). Nefrotik sendrom kliniği ile yapılan böbrek iğne biyopsilerinde (BİB) amiloid birikimi sık görülmekte ve diğer fibriler glomerülopa- tilerden ayırıcı tanısı önem taşımaktadır (11-15). Ülkemizde BİB'lerinde en sık sekonder amiloidoz görülmekte, primer amiloidoza ise oldukça az rastlanmaktadır (16-17).

Farklı etyolojilerle oluşan tüm amiloid fibrillerinde ultras- türüktürel olarak aynı, fakat kimyasal olarak farklı fibriler pro- teinler vardır. Bunlar Kongo kırmızısı (KK) ile pozitif boyanır, polarize ışıktaki dikromat özelliği nedeniyle elma yeşili rölfe ve- rir. Ancak erken dönemde birikimler küçük ve az, rutin böb- rek kesitleri ince olduğundan KK ile boyanma görülmeyebilir. Bu durum aynı zamanda polarize mikroskop tablası döner değilse rölfe alınmamasına da neden olabilir. Amiloid tanı- sında immunperoksidaz yöntemlerin daha duyarlı olduğu be- lirtilmiştir (6). Ancak yeni bir çalışmada Linke, Kongo kırmızı- sı flöresansının (KKF) amiloidoz tanısında daha duyarlı oldu- ğunu belirtmiştir (18). KKF, flöresan mikroskopta KK boyalı kesitlerin incelenmesi ile yapılmaktadır. Bu yöntem eskiden beri bilinmesine rağmen klasik renal patoloji kitaplarında ve çalışmalarda pek yer almamıştır (8,9).

BİB'lerinde immunflöresan inceleme rutin olarak yapıl- maktadır. Bu inceleme sırasında KKF ile amiloid birikimi araştırılarak daha duyarlı tanı konabilir. Bu çalışmada BİB'le- rinde parafin ve frozen kesitlerde KKF'nin amiloid tanısında- ki yeri ve duyarlılığını araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Anabilim Dalımızda son bir yıl içinde incelenmiş tüm BİB'leri çalışmaya alındı. Klinik ön tanımlar içinde amiloidoz veya histopatolojik incelemede fibriler glomerulopati mevcut-

sa ayırıcı tanımlar için KK uygulandı. KK boyanmış parafin ke- sitler retrospektif olarak KKF ile yeniden gözden geçirildi. Bu dönemin son 5 ayında immunflöresan inceleme için yeterli büyüklükte olan tüm BİB'lerinin KK boyanmış frozen kesitle- ri de rutin olarak flöresan mikroskopta değerlendirildi.

BİB'leri fosfat tampon solusyonu içinde bölümümüze ulaştırıldı ve biyopsi disseksiyon mikroskobu altında incelen- di. Immunflöresan inceleme için glomerül içeren 1-3 mm'lik kortikal doku parçası ayrılıp, geri kalan doku örneği %4'lük formalin ve/veya B5'te tesbit edildi. Tüm dokular rutin takip ardından parafine gömüldü.

Işık mikroskopik inceleme: Tüm olgularda rutin olarak hematoksilen eozin boyalı üç kesit yanısıra, periodik asit Schiff, Masson trikrom ve Jones methenamine silver uygu- lanmış birer kesit incelendi. Gerekli olgularda parafin kesitle- re KK'da uygulandı. KK uygulanan olgular retrospektif olarak flöresan mikroskopta KKF ile de değerlendirildi.

Polarize ışık mikroskopik inceleme: Reichert mikros- kop kullanıldı. KK boyanmış parafin ve frozen kesitlerde biri- kimlerin dikromat özelliği (birefranjans) değerlendirildi.

Işık mikroskobunda KK ile kiremit kırmızısı renkte boya- nan, polarize ışık mikroskobunda ışığı çift kırarak elma yeşi- li refle veren birikimler amiloid olarak kabul edildi. Birikim olan olgularda AA tip ayırımı için parafin kesitlere immunpe- roksidaz yöntemle AAC, AL amiloid alt grupları için de kappa ve lambda (Dako, Denmark) uygulandı.

İmmunflöresan inceleme: Frozen kesitler direkt yön- temle IgG, IgA, IgM, C1q, C3, fibrinojen, kappa, lambdaya karşı flöresein izotiyosiyanatla işaretlenmiş monoklonal anti- korlarla (Dako, Denmark) boyandı. Flöresein pozitifliği Zeiss mikroskopta klinik ve histolojik tanıyı bilmeden araştırmacılar tarafından değerlendirildi. Prospektif olarak 5 aylık dönemde immunflöresan inceleme paneline KK boyalı frozen preparat eklendi.

Kongo kırmızısı flöresansı: Flöresan mikroskopta para- fin ve frozen kesitlerde, flöresein izotiyosiyanatı incelemek için kullanılan mavi, tetrametil rodamine izotiyosiyanatı ince-

TABLO 1: BÖBREK BİYOPSİLERİNDE HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Biyopsi	Tanı	Sayı	Yüzde
Nativ biyopsiler	Amiloidoz	14	6
	Diffüz proliferatif glomerülonefrit*	20	8
	Fokal proliferatif glomerülonefrit*	15	6
	Kronik glomerülonefrit	10	4
	Fokal segmental glomerüloskleroz*	20	8
	Membranoproliferatif glomerülonefrit	15	6
	Membranöz glomerülonefrit	12	5
	Hipertansif nefropati	5	2
	Tübülointerstisyel nefrit	15	6
	Diğer tanılar	31	12
	Yorumlar **	84	33
	Yetersiz	10	4
Toplam		250	100
Transplante böbrek biyopsileri	Sıfır saat biyopsi	37	21
	Akut rejeksiyon	21	12
	Nonspesifik-sınır değişiklikler	21	12
	Kronik allograft nefropatisi	50	29
	Amiloidoz	1	1
	Diğer tanılar	45	21
Toplam		175	100

*primer ve sekonder olgular (Sistemik lupus eritematozus, Ig A nefropatisi ve enfeksiyöz formlar)

**spesifik tanı konamayan histopatolojik tanımlama ile çıkarılan ve/veya klinik ön tanı ile korele edilen olgular (minimal değişiklik hastalığı ve fokal segmental glomerüloskleroz kuşkulu olgular da dahil).

TABLO 2: AMİLOİD BİRİKİMİ SAPTANAN OLGULARIN GENEL ÖZELLİKLERİ

Materyal	Cins	Yaş	Klinik tablo	Klinik öntanı	Birikim
Biyopsi	E	12	Nefrotik sendrom	-	AA
Biyopsi	E	30	Nefrotik sendrom	-	AA
Biyopsi	E	39	Nefrotik sendrom	-	AA
Nefrektomi	E	53	Nonfonksiyone böbrek	Nefrolitiazis	AA
Biyopsi	E	37	Nefrotik sendrom	AAA-amiloidoz	AL
Biyopsi	K	45	Nefrotik sendrom	MLH, MGN	AA
Biyopsi	K	48	Macload send	Amiloidoz	AA
Biyopsi	K	47	Nefrotik sendrom	MGN, AİN	AA
Biyopsi	K	68	Nefrotik sendrom	Amiloidoz	AA
Biyopsi	K	21	ABY	Atipik AAA, HİGN	AA
Biyopsi	K	15	Nefrotik sendrom	Amiloidoz	AA
Biyopsi	K	41	Nefrotik sendrom	MLH, MGN	AL
Tx-biyopsi	E	28	Graft disfonksiyonu	Rejeksiyon	AA
Biyopsi	K	63	ABY	MGN, AİN	AA
Biyopsi	E	34	Nefrotik sendrom	Amiloidoz, fgs	AA

Tx: transplant, ABY: akut böbrek yetmezliği, AAA: Ailevi Akdeniz ateşi, MLH: minimal lezyon hastalığı, MGN: membranöz glomerülonefrit, HİGN: hızlı ilerleyen glomerülonefrit, AİN: akut interstisyel nefrit

ler ek için kullanılan yeşil filtre setlerinin ikisi de kullanılarak KK⁺ araştırıldı (18). Parafin kesitler tek araştırıcı (SŞ), frozen kesitler iki araştırıcı (SŞ veya GB) tarafından değerlendirildi. Birikimler, mavi filtre seti ile renal parankimin yeşil renkte izlenebildiği siyah zeminde kiremit kırmızısı renkte, yeşil filtre seti ile parankiminin güç seçilebildiği bir zeminde daha dikkat çekici ve koyu ve parlak kırmızı renkte ise, amiloid olarak değerlendirildi. Artefakt KK boyanması, eritrosit ve lamina elastika boyanmaları amiloid birikimlerinden ayırt edildi ve amiloid olarak kabul edilmedi. Frozen kesitlerine KK uygulanan olgular ilk olarak rutin immunflöresan inceleme paneli sırasında KKF ile değerlendirildi, ışık mikroskopik değerlendirme sorradan yapıldı. KKF ile boyanma olan olgularda birikimlerin polarize ışık mikroskopunda ışığı çift kırıp kırmadığı kont-

rol edildi. İmmunperoksidaz yöntemle AA birikimi doğrulandı.

KK için Putchtler'in modifiye Bennhold yöntemi kullanıldı (19-20). Permanganatlı KK boyama Rijswijk ve ark.'na göre yapıldı (21).

BULGULAR

Bir yıllık dönemde Anabilim Dalımızda 250'si nativ, 175'i transplant olmak üzere toplam 425 BİB incelenmiştir. Bu olguların histopatolojik tanıları Tablo 1'de verilmiştir. Olguların 34'ünün parafin, 82'sinin frozen, 20'sinin hem parafin hem de frozen kesitlerinde KK uygulanmıştır.

Frozen kesitlerine KK uygulanan 102 olgudan 6'sında KKF ile birikim saptandı (Resim 1). Daha sonra parafin kesitlerine KK, AAC ve diğer immün markerlar uygulandı. Bu olguların parafin kesitleri de çalışıldığından, parafin kesit grubunda da yer almıştır.

Parafin kesitlerine KK uygulanan 54 olgudan 15'inde birikimler amiloid olarak değerlendirildi. Bu olguların 6'sında frozen kesitlere de KK yapılmıştı. Tümünde KKF ile birikim görüldü. Amiloid birikimlerinin 13'ü AA, ikisi de AL olarak değerlendirildi. Olguların 7'si erkek, 8'i kadın, yaş ortalaması 39 idi (Tablo 2). Olguların sadece 6'sında klinik amiloidoz ön tanısı verilmişti.

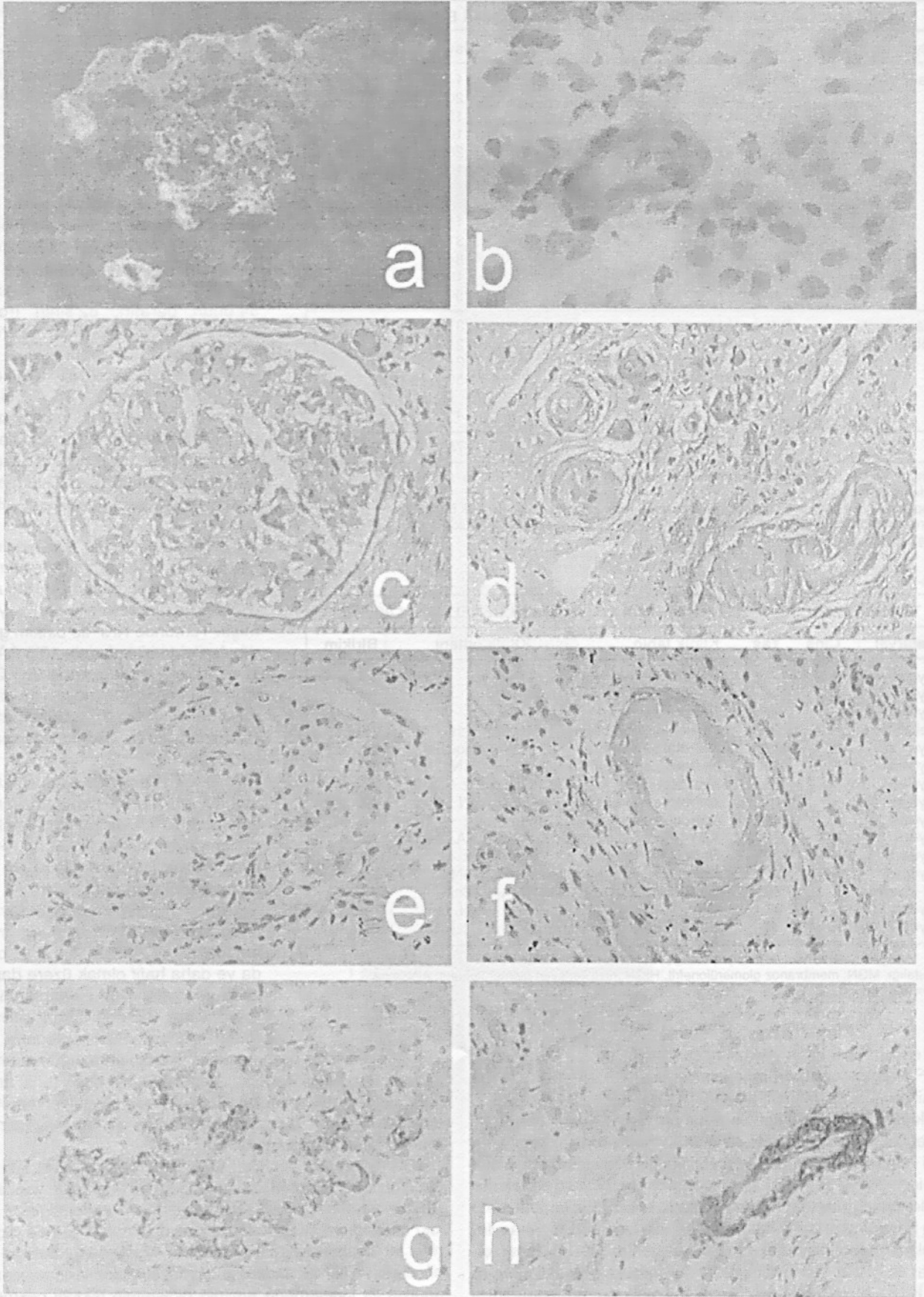
Frozen kesitlerine KK uygulanan ve KKF ile birikim saptanmayan 14 biyopside klinik ve patolojik kuşkular nedeniyle parafin kesitlere de KK yapıldı. Parafin kesitlerde de KK ve KKF ile birikim saptanmadı.

Amiloid birikimleri değişik derecelerde olmak üzere temelde glomerülün mezangiyumunda, daha az oranda ve daha hafif olmak üzere damarlarda ve interstisyumda saptanmıştır. Transplante BİB'nde damar duvarlarında hafif birikimler saptanmış, glo-

merüler birikimler izlenmemiştir. Transplante olgunun primer hastalığının Ailevi Akdeniz Ateşi'ne (AAA) bağlı renal amiloidoz olduğu belirlenmiştir. Nativ böbrek biyopsilerinin %5,6'sında, transplant böbrek biyopsilerinin de %1'inden azında amiloid birikimi saptanmıştır.

Bu çalışmada yer alan olgulardan ikisine ikinci kez BİB yapılmıştır. Bunların birinde 5, diğerinde 3 yıl önce yapılan ilk BİB'nin parafin kesitleri KKF ile yeniden incelendiğinde amiloid birikimi olduğu görüldü. İlk biyopsilerden birinde glomerüler birikimlerin belirgin olmaması, diğerinde de belirgin kronik değişiklikler ve sadece interstisyel birikimlerin olması nedeniyle ilk incelemede amiloid birikiminin dikkati çekmediği düşünülmüştür.

Olgulardan birinde parafine ayrılan örnekte glomerül ve



Resim 1: (a-h): Glomerülde (a,c,e,g) ve damar duvarında (a,b,d,f,g) amiloid birikiminin frozen (a,b) ve parafin kesitlerde (c-h), Kongo kırmızısı flöresansı (KKF) (a), Kongo kırmızısı (KK) (b,e,f), hematoksilen eozin (c,d) ve immunperoksidaz anti-AA (g,h) metodlarla gösterilmesi. Amiloid birikimlerinin KKF ile siyah zeminde kırmızı rengi, KK'na göre daha dikkat çekicidir. (Büyütmeler a;200, b-h; 400)

amiloid birikimi saptanmamıştır. Ancak immunflöresan inceleme örneğinde görülen iki glomerülde, amiloid birikimi görül-müş ve amiloidozis rapor edilmiştir. Kalan biyopsi örneği yetersiz olduğundan daha ileri tip tayini yapılamamıştır. Olgunun daha sonra alınan rektum ve karaciğer biyopsilerinde de amiloid saptanmıştır. Bu biyopsilerle olgu AA dışı amiloid (AL) olarak rapor edilmiştir.

Diğer AL olgusunun frozen kesitlerinde lambda (+) kappa (-) bulunmuştur. Parafin kesitlerde ise hem lambda, hem de kappa (-) bulunmuştur, immunperoksidaz inceleme tekrarlarında negatif sonuç değişmemiştir. Bu çelişki nedeniyle alt tip tayini yapılmamıştır. Daha sonra yapılan kemik iliği biyopsisinde de amiloid birikimi saptanmış, permanganatla muamele edilmiş KK (+), AAC (-), kappa (-), lambda (+) olduğundan birikim lambda hafif zincir orjinli amiloid birikimi (AL, lambda amiloid) olarak değerlendirilmiştir. Kemik iliği biyopsisinde myelom ve gammopati ile uyumlu bulgu saptanmamıştır.

Frozen ve parafin kesitlerinin KKF karşılaştırıldığında parafin kesitlerin daha az artefakt içerdiği ancak aralarında boyanma şiddeti açısından çok fazla fark olmadığına karar verilmiştir. Olguların altısında hem frozen hem de parafin kesitlerde birikim bulunmuş, 14 olguda ise her ikisinde de birikim saptanmamıştır. KKF ile yalancı negatif ve pozitiflik yoktur.

KK ile KKF karşılaştırıldığında, flöresan ışıktaki siyah veya siyaha yakın zeminde amiloid birikimlerine karşılık gelen ki-remit kırmızısı rengin ışık mikroskopundaki KK'dan daha çarpıcı ve etkileyici görüldüğü dikkati çekmiştir (Resim 1). Kongofilik boyanan elastik lifler, eritrositler ve bazen teknik nedenle oluşan kirlilikler (pamuk, yabancı madde vb) amiloid birikimlerinden kolaylıkla ayırt edilmiştir. Retrospektif olarak değerlendirilen iki olgunun 3 ve 5 yıl önceki biyopsilerinde amiloid birikimi sadece KKF ile saptanmıştır.

Mavi ve yeşil flöresan filtre setleri karşılaştırıldığında aralarında çok belirgin fark yoktur. Mavi filtre setinde parankimin yeşil otoflöresansının seçilmesi biyopsiyi genel olarak değerlendirmede yardımcıdır. Ancak yeşil filtre setinde de birikimlerin flöresansı ile birikiminin lokalizasyonunu belirlenmektedir.

TARTIŞMA

Birçok hastalık veya sendrom böbrekte amiloid birikimine yol açabilir. Amiloid birikimine neden olan hastalıklar ve özellikleri kaynaklarda oldukça iyi tanımlanmıştır (1-10). Sistemik amiloidozların böbrek tutulumunda klinik olarak primer veya sekonder amiloidoz formları ve amiloidin farklı biokimyasal tiplerini ayırt eden spesifik histopatolojik görünüm yoktur (7-8,11-15). Kesin ayırıcı tanı immunperoksidaz yöntemler, klinik ve laboratuvar bulguları ile olasıdır (1,5-15). Böbrekte amiloid birikimleri en sık mezangiyumdadır. Buna daha az oranda vasküler ve interstisyel birikimler eşlik eder.

Rutin histolojik incelemede birikimler erken dönemde az olduğundan görülmeyebilir veya benzer mikroskopik görünümüne yol açan diğer hastalıklardan ayırımı gerekebilir. BİB'nde hyalen arteriolosklerozis ve fibriller glomerülopatiler karışabilecek histopatolojik bulguların başında sayılabilir (8,9,11-15). Bu nedenle klinik veya histolojik kuşku olduğunda KK boyası mutlaka uygulanmalıdır. Amiloid birikimleri KK ile kırmızı boyanır ve polarize ışık mikroskopunda dikromat özellik ile ışığı çift kırar, elma yeşili refle verir. Ayrıca kristal viyole, tioflavin, immunperoksidaz boyama, radyonüklid ve elektron mikroskopik incelemeden de tanıda yararlanılabilir (1,6,8,9). AAA veya makroglobulinemi gibi bazı durumlarda erken tanı ile tedavi kısmen olasıdır. AAA'nde kolşisinin renal ami-

lidozu engellediği ve/veya birikimleri azalttığı ileri sürülmektedir (8-10). Diğer birikimlerde de primer nedene yönelik tedavilerden yarar olasıdır. Bu nedenle birikimlerin oluşturduğu doku hasarı ilerlemeden, amiloidozun erken ve doğru tanısı önem taşımaktadır.

Rutin BİB kesitleri incedir (3-6 mikron). Bu amiloidozun histopatolojik tanısında en sık kullanılan KK boyama yöntemi için dezavantaj yaratır. Az olan birikimler ince kesitlerde KK ile boyansa bile farkedilmeyebilir. Boyanma hafif olduğunda tanı için şart olan polarize ışık mikroskopundaki elma yeşili refle de alınmaz. Bunu gidermek için kalın kesitler (10 mikron) önerilmektedir (19). Ayrıca polarize ışık mikroskobu özellikleri de tanıda yetersizliklere yol açabilir. Polarize mikroskop tablasının döner olması, polarizasyon ya da dikromat özelliğın maskelenmesini ortadan kaldırır (18). Bu dezavantajlara karşılık, Linke KKF'nı immunperoksidaz incelemelerden de daha duyarlı bir yöntem olduğunu ileri sürmektedir (18). Flöresan ışık altında KK ile boyanmış alanlar çok daha kolay tanınabilmekte ve küçük birikimler bile yakalanabilmektedir.

Daha önce saptayamadığımız iki amiloid birikimini KKF ile saptadık. Retrospektif olarak ayrı bir çalışmada KK uygulanmış beş yıllık böbrek ve bir yıllık değişik organ biyopsilerini KKF ile yeniden değerlendirdik. Amiloid birikimi saptadığımız 136 biopsiden 7'sinde birikimler sadece KKF ile tanılabildi (17). Bu olgulardan ikisi, iki çalışmada da ortaktır. Bu çalışmalarda KKF ile amiloid birikimlerinin daha kolay tanınabildiğini gördük. İmmunperoksidaz yöntemle AA birikimini saptadığımız olgularda da birikimleri saptamak KK'dan daha kolaydı. Bu çalışmada negatif kontrolün çok olmasına rağmen pozitif kontrolün az olması dezavantaj olarak yorumlanabilir. Ancak diğer çalışmamızda toplam olgu ve birikim olan olgu sayısı daha fazladır. Yalancı pozitiflik veya negatiflik bulunmamıştır (17). Bu nedenle KKF'nin KK'den daha üstün olduğunu düşünüyoruz.

Bu çalışma, temelde parafin ve frozen kesitlerdeki KKF'nın özelliklerini araştırarak KKF'nin rutinindeki yerini belirlemeyi amaçlamıştır. Frozen ve parafin kesitlerde KKF ile amiloid birikimleri kolayca değerlendirildi. Frozen kesitlerde saptanan birikimler parafin kesitlerde de KK, KKF ve immunperoksidaz yöntemlerle doğrulandı. Frozen kesitlerde KKF ile birikim saptamadığımız halde, klinik veya histopatolojik kuşku nedeniyle bazı olguların parafin bloklarına da KK yapıldı. Bu olgularda da parafin kesitlerde KK ve KKF birikim saptamadık. KKF ile frozen ve parafin kesitlerde yalancı pozitif veya negatif olgumuz yoktur. Parafin bloğunda glomerül veya birikim olmayan olgularda immunflöresan inceleme örneğinde glomerül olabileceği ve tanının buradan konabileceği akılda tutulmalıdır. Biz bir olgumuzda immunflöresan inceleme örneğindeki glomerüllerde tanı koyduk.

Flöresan mikroskopta KKF ile amiloid birikimlerin saptandıktan sonra, polarize ışıktaki dikromat özellik için tekrar değerlendirilmesinin gerekmesi KKF yöntemi için olumsuz bir faktördür. Ancak böbrek histopatolojisine yatkın bir kişinin KKF sonrası polarize ışık mikroskopunda doğrulamaya ihtiyaç duymaksızın tip tayini için gerekli immunperoksidaz incelemelere başvurarak tanıyı kesinleştirebileceğini düşünüyoruz. Ülkemizde renal amiloidoz olgularının yaklaşık %90'ı AA amiloiddir (16,17). İmmunperoksidaz yöntemle AA tip tayininde sorun yoktur (1,6,12). AL amiloid alt tip tayininde frozen ve parafin kesitler arasında kappa ve lambda boyanma farklılıkları nedeniyle tanı sorunu yaşamaktayız. Kappa ve lambda ile iki yöntemde de aynı sonuç olmazsa polarize ışık

mikroskobunda, elma yeşili refle sonrasında olgular AA ve AA dışı amiloid birikimi olarak rapor edilebilir.

KKF eskiden beri bilinmesine rağmen, klasik kitaplarda üzerinde pek durulmamıştır (8,9). Böbrek biyopsilerinde immunflöresan inceleme rutin olarak yapılmaktadır. Bu inceleme sırasında zaman zaman frozen örneğinin hematoksilen eozin kesitine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kesit yerine rutin KK boyalı frozen kesit kullanılabilir. Bu şekilde immunflöresan inceleme paneli ile tüm olgular amiloidoz açısından en uygun yöntemle değerlendirilecektir. Akla neden parafin kesitlere de rutin olarak KK uygulanmadığı sorusu gelebilir. Bölümümüzde parafin bloklardan rutin olarak 8 lama çok sayıda kesit alınmakta (30-50 kesit) ve bloklar neredeyse tama yakın kesilmektedir. KK için yeni veya kalın kesit yapmak rutin yükü daha da artıracaktır. Ayrıca parafin kesitlerde KK uygulamak frozen kesitlere göre daha zaman alıcıdır. Frozen sırasında amiloidoz tanısı koyularak, kalan boş parafin kesitler immunperoksidaz incelemede kullanılabilir. AL olgularda alt tip tayini için yeterli sayıda kesit kalabilir.

Bu çalışmada hafif olan amiloid birikimlerini KK ile farketmediğimizi saptadık. Bu olgularda rutin olarak KKF uygulanmış olsaydı, 3-5 sene önce amiloid birikiminin yakalanmış olacağını düşünüyoruz. Frozen parçasında immunflöresan inceleme sırasında birikim saptanmayan olgularda klinik ön tanılarda amiloidoz kuşku ve ışık mikroskobik incelemede fibriler glomerulopatiyi düşündürecek bulgu yoksa, amiloidoz yok denebilir. Diğer durumlarda KK tekrarlanmalı ve gerekiyorsa immunperoksidaz incelemelerle desteklenmelidir. Sadece ışık mikroskobunda değerlendirilen ve KK ile birikim saptanmayan olgularda, klinik ön tanılarda amiloidoz ve/veya histopatolojik fibriler glomerulopati varsa, olgu KKF ile değerlendirilmeden rapor edilmemelidir.

KKF ile değerlendirilen preparatlarda birikimlerdeki kırmızı rengin solması nedeniyle uzun süre flöresan ışıktaki bekletilen veya fotoğraf çekilen olgularda kesitler işaretlenmelidir. Bu yapılmazsa sonradan bu kesitlerde KK ile amiloid birikimini değerlendirenler yanlış yorumlar yapabilir.

BİB'lerinde fibriler glomerulopatiler amiloid ve amiloid dışı olarak iki ana grupta toplanabilir (11-15). Amiloid dışı birikimler immunoglobulin kökenli fibriller (krioglobulinemi, monoklonal gammopati, sistemik lupus eritematozus ve immuntaktoid (fibriler) glomerulopati) ile immun globülin kökenli olmayan fibriller (diabetik glomerulopati) glomerulopatiler olarak sınıflandırılabilir. Bunların ayırıcı tanılarında immunflöresan inceleme değerlidir. Immunflöresan inceleme panelinde KKF ile amiloid birikiminin değerlendirilmiş olması ışık mikroskobik değerlendirmede kolaylık sağlayacaktır. Immunflöresan inceleme panelinde aynı anda değerlendirilecek kappa, lambda ve KKF, AL amiloidozis alt tipleri açısından bilgi verilebilir. Olguda AAC negatif ise, flöresan mikroskoptaki kappa ve lambda birikimi ve lokalizasyonu ile AL alt tip tayini yapılabilir. Biz immunperoksidaz yöntemle alt tip tayini yapmadığımız olguda, immunflöresan yöntemle lambda birikimini saptadık. Ancak kesin tanı kemik iliğinin parafin kesitlerinde immunperoksidaz yöntemle lambda saptandıktan sonra kondu. BİB'lerinin takibinin diğer biyopsilerden farklı olması veya kemik iliği biyopsilerinin asitte dekalsifiye edilmesi gibi teknik nedenler bu sonuçta etkili olmuş olabilir. AL olgularda alt tip tayininde zorluklar belirtilmektedir (1).

Böbrek transplantasyonu son dönem böbrek hastalarının uygulanan bir tedavi biçimidir. Bu olgularda primer hastalığın tekrarı veya yeni glomerulonefrit gelişme şansı yüksektir. Amiloid birikimi de bunlar arasında yer almaktadır (22-

24). Bu çalışmada bir AAA olgusunun transplantasyonu sonrası 3. senesinde greft fonksiyon bozukluğu nedeniyle yapılan biyopsisinde AA amiloid saptanmıştır. Diğer çalışmamızda da iki transplante böbrekte daha amiloid birikimi saptanmıştır (17). Arşivimizdeki tüm transplant BİB'lerinde amiloid birikimi görülme sıklığı %1'den azdır. Bu çalışmada primer böbrek hastalığı amiloidoz olan 5 olgu da incelenmiş, birikim saptanmamıştır. AAA nedeniyle amiloidoz gelişen olgularda, böbrek transplantasyonundan sonra da kolşisin kullanımının amiloid birikimini azalttığı belirtilmektedir (8-10,24). Biz transplante olgularda glomerüler birikimlerin vasküler birikimlerden daha az olduğunu gözlemledik.

KKF eskiden beri bilinen ancak rutin uygulamada pek değeri bulmamış bir yöntemdir. BİB'lerinde frozen kesitlerde de KK rutin olarak uygulanabilir ve bu şekilde amiloidoz vakalarının büyük kısmı immunflöresan inceleme basamağında tanınabilir. Işık mikroskobu aşamasını beklemeden immunperoksidaz incelemelere geçilerek tip tayini için zaman da kazanılabilir. Işık mikroskobunda KK negatif olan tüm olgularda olanak varsa KKF ile değerlendirmeden olgular rapor edilmemelidir.

KAYNAKLAR

1. Stregé RJ, Saeger W, Linke RP. Diagnosis and immunohistochemical classification of systemic amyloidosis. Report of 43 cases in an unselected autopsy series. *Virchows Archiv* 1998; 433: 19-27.
2. Westermark P. The pathogenesis of amyloidosis: understanding general principles. *Am J Pathol* 1998; 152: 1125-7.
3. Cohen AS, Connors LH. The pathogenesis and biochemistry of amyloidosis. *J Pathol* 1987; 151: 1-10.
4. Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis. The β -fibrilloses. *N Engl J Med* 1980; 302: 1283-1292 ve 1333-1343.
5. Schroder R, Linke RP. Cerebrovascular involvement in systemic AA and AL amyloidosis: a clear haematogenic pattern. *Virchows Arch* 1999; 434: 551-60.
6. Linke RP, Gartner HV, Michels H. High-sensitivity diagnosis of AA amyloidosis using Congo red and immunohistochemistry detects missed amyloid deposits. *J Histochem Cytochem* 1995; 43: 863-869.
7. Falk RH, Comenzo RL, Skinner M. The systemic amyloidoses. *N Engl J Med* 1997; 337: 898-909.
8. Striker LJMM, Preud'homme JL, D'Amico G, Striker GE. Monoclonal gammopathies, mixed cryoglobulinemias and lymphomas. In: Tisher CC, Brenner BM (eds) *Renal Pathology, with clinical and functional correlations* (2nd ed). JB Lippincott Company Philadelphia 1993, pp 1442-1490.
9. Schwartz MM. The dysproteinemias and amyloidosis. In: Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG (Eds) *Heptinstall's Pathology of the Kidney* (5nd Ed). Little Brown, Philadelphia 1998, ss 1321-1369.
10. Öksel F. Amiloidoz. Romatoloji eğitim kursu, kurs kitabı 30/Ekim/1998 Belek Antalya sayfa 39-48.
11. Casanova S, Donini U, Zucchelli P, Mazzucco G ve ark. Immunohistochemical distinction between amyloidosis and fibrillar glomerulopathy. *Am J Clin Pathol* 1992; 97: 787-795.
12. Lofberg H, Thysell H, Westman K, Larsen S ve ark. Demonstration and classification of amyloidosis in needle biopsies of the kidneys, with special reference to amyloidosis of the AA-type. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]*. 1987; 95: 357-63.
13. Schwartz MM. Glomerular diseases with organized deposits. In: Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG (Eds) *Heptinstall's Pathology of the Kidney* (5nd Ed). Little Brown, Philadelphia 1998, ss 369-388.
14. Kessler E, Halpern M, Chagnac A, Zevin D ve ark. Unusual renal deposit in mixed connective tissue disease. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 261-4.
15. Korbet SM, Schwartz MM, Lewis EJ. The fibrillary glomerulopathies. *Am J Kidney Dis* 1994; 23: 751-65.
16. Tuğlular S, Yalçınkaya F, Paydaş S, Öner A ve ark. Retrospective analysis for etiology, clinical presentation and prognosis of 291 amyloid cases in Turkey. XV. International Congress of Nephrology and XI. Latinamerican Congress of Nephrology 1999, 2-6 May. Abstracts book p. 159.
17. Şen S, Ertan Y, Alkanat MB, Yılmaz F, Başdemir G. Amiloidozisin histopatolojik tanısındaki zorluklar. Yayımlamak üzere Ege Tıp Dergisine gönderildi.

18. Linke RP. Highly sensitive diagnosis of amyloid and various amyloid syndromes using Congo red fluorescence. *Virchows Arch* 2000; 436: 439-448.
19. Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. 2. Baski, Ohio: Batelle Press, 1980; 175-178.
20. Llewellyn BD. Stains file. <http://members.pgonline.com/~bryand/stain/amyloid/congopuchtler.htm>
21. van Rijswijk MH, van Heusden CW. The potassium permanganate met-

hod. A reliable method for differentiating amyloid AA from other forms of amyloid in routine laboratory practice. *Am J Pathol* 1979; 97: 43-58.

22. Pasternack A, Ahonen J, Kuhlback B. Renal transplantation in 45 patients with amyloidosis. *Transplantation* 1986; 42: 598-601.
23. Ramos EL, Tisher CC. Recurrent diseases in the kidney transplant. *Am J Kidney Dis* 1994; 24: 142-54.
24. Bora S, Erkan N, Hacıyanlı M, Soylu A ve ark. Renal transplantation in patients with amyloidosis. *Transplant Proc* 2000; 32: 605-6.