

Eiríkur Benedíksz 1), Hannes Blöndal 1), Gunnar Guðmundsson 2)

ARFGENG HEILABLÆÐING II**Útfellingar sýstatín-C mýlildisefnis í húð**

Í þessari grein verður lýst greiningu mýlildisútfellinga í húð 14 einstaklinga með arfgengan heilablæðingarsjúkdóm. Notagildi húðsýna til greiningar sjúkdómsins snemma í sjúkdómnum verður rætt.

INNGANGUR

Mýlildisefni er gert af mismunandi prótínum allt eftir því um hvaða sjúkdóm er að ræða. Allt mýlildisefni hefur þó þann eiginleika að litast með Congorauðu (congoophilia) og þannig litað veldur það sægrænu ljósbroti á póluðu ljósi. Allt mýlildisefni hverju nafni sem það nefnist hefur líka einkennandi þráðlingagerð, sem greina má í rafeindasmásjá (1).

Mýlildisútfellingar í húð koma fyrir í sambandi við fjölkerfa frummýlildi (primary systemic amyloidosis) (2), bólgumýlildi (secondary systemic amyloidosis) (3), mýlildi við mergæxli (systemic amyloidosis with myeloma) (2), ýmis form af staðbundnu frummýlildi í húð (primary localized cutaneous amyloidosis) (4) og ættgengt mýlildi í húð (familial cutaneous amyloidosis). Við nokkra sjaldgæfa ættgenga mýlildissjúkdóma, svo sem ættgengt fjöltaugamýlildi (familial amyloidotic polyneuropathy) hefur mýlildisútfellingum í húð einnig verið lýst (5). Sýnistaka úr húð hefur í síðast nefnda sjúkdómnum jafnvel verið talin nothæf aðferð til greiningar á sjúkdómnum á byrjunarstigi.

Frá fyrri hluta þessarar aldar (6) hefur verið þekktur hér á landi arfgengur heilablæðingarsjúkdómur, samanber Læknablaðið 1989; 75: 197-200. Orsök heilablæðinganna hefur verið lýst sem skemmdum í heilæðum vegna

mýlildisútfellinga (7). Mýlildisefnið hefur verið einangrað og raðgreint og reyndist það hafa næstum sömu aminosýruröð og prótínasahemillinn sýstatín C (8). Lengst af hafa mýlildisútfellingar í þessum sjúklingum verið taldar takmarkaðar við heilæðar. Það er nú orðið ljóst að svo er ekki því þær má finna, þó í minni mæli sé, í ýmsum öðrum líffærum, þar á meðal í húð (9).

EFNIVIÐUR OG AÐFERÐIR

Eðlilega útlítandi húð var athuguð hjá 35 einstaklingum, þar af 25 sjúklingum og fólki af heilablæðingarættum og 10 öðrum óskyldum einstaklingum, þar af fjórum heilbrigðum.

Húðsýni voru tekin með sýnitökunál (3 mm) frá 22 sjúklingum og fólki af heilablæðingarættum en auk þess frá sex óskyldum einstaklingum. Húðsýni voru einnig fengin frá þremur sjúklingum og fjórum heilbrigðum einstaklingum við krufningu.

Sýnin voru í flestum tilfellum tekin úr húð á upphandlegg, en tvö af læri, eitt af kvið, eitt af hnakka og eitt úr hársverði hjá einstaklingum af heilablæðingarættum. Í einstaka tilfelli var húð tekin á fleiri en einum stað hjá sama sjúklingi. Sýni frá óskyldum voru tekin af brjósti fjögurra einstaklinga, af læri hjá tveimur, af bringu tveggja og af upphandlegg hjá tveimur.

Sýnin voru hert í formalíni og/eða vökva Bouins og steipt inn í paraffín fyrir ljóssmásjárskoðun. Sneiðar voru litaðar með hematoxylín-eósíni og Congorauðu og þær síðarnefndu skoðaðar í póluðu ljósi. Paraffínsneiðar voru litaðar ónæmisvefjafræðilega með avídín-bíotín-komplex-aðferð. Fyrir litun voru sumar sneiðarnar meðhöndlaðar með maurasýru, en sú meðferð gerir litunina sterkari (10).

1) Rannsóknarstofur í líffærafræði og Háskólans við Barónsstíg og 2) taugalækningadeild Landspítalans. Barst 05/04/1989. Sampykkt 19/04/1989.

Tafla I. Rannsóknir gerðar á 25 einstaklingum af arf-gengri heilablæðingarætt.

Til-felli	Kyn	Aldur	Sjúkdóms- stig við sýnistöku	Krufning	Mýlildi í húð	Sýsta- tín-C í mænu- vökva
B 1	kvk	30	B	A	+	1.4
B 2	kvk	29	B	A	+	1.8
B 3	kvk	19	C		+	2.8
B 4	kvk	21	D		+	2.0
B 5	kvk	21	E		-	8.4
B 6	kvk	22	E		-	7.6
B 7	kvk	41	B		+	2.6
B 9	kk	14	E		-	12.8
B 11	kvk	28	C		+	2.1
B 12	kvk	23	E		-	e.a.
B 13	kvk	29	E		-	4.2
B 14	kvk	24	C	A	+	4.6
B 15	kvk	39	E		-	e.a.
B 16	kvk	48	E		-	5.3
B 18	kk	35	E		-	7.2
B 21	kk	17	C		+	e.a.
B 23	kk	14	D		+	2.0
B 24	kk	45	E		-	5.6
B 25	kvk	24	D		+	2.6
B 26	kk	23	E		-	7.6
B 27	kvk	38	E		-	e.a.
9002	kvk	29	C	A	+	e.a.
S 124	kk	31	A	A	+	1.9
S 258	kk	30	A	A	+	1.8
S 35	kvk	53	A	A	+	2.3

A: látinn af völdum sjúkdóms. B: nokkur heilaáföll og mikil fótun. C: heilaáfall eitt eða fleiri en einkenni gengin til baka. D: af heilablæðingarætt með lækkað sýstatín-C í mænuvökva og/eða talið hafa sjúkdóminn en án einkenna og sögu. E: af heilablæðingarætt með eðlilegt sýstatín-C í mænuvökva og/eða án sögu eða einkenna e.a.: ekki athugað.

Tafla II. Rannsóknir á 10 viðmiðunareinstaklingum.

Til-felli	Kyn	Aldur	Sjúkdómur eða dánarorsök	Mýlildi í húð
B 10	kk	19	Heilablæðing	-
B 22	kk	18	Heilablæðing	-
H 2	kvk	65	Krabbamein	-
H 3	kvk	19	Krabbamein	-
H 4	kvk	34	Krabbamein	-
H 5	kvk	54	Krabbamein	-
H 6	kvk	19	Slys	-
H 7	kk	25	Slys	-
H 8	kk	27	Slys	-
H 9	kvk	27	Slys	-

Notuð voru fjölstofna kanínómótefni og einstofna músamótefni gegn sýstatín-C, sem voru gjöf frá Dr. Anders Grubb, Málmey í Svíþjóð. Einnig var notað fjölstofna kanínómótefni gegn sýstatín-C sem voru gjöf frá Behringwerke í Þýskalandi. And-keratín, and-SAP mótefni og eðlilegt kanínusermi voru fengin frá Dakopatts a/s í Danmörku. Öll annars stigs mótefni voru fengin frá Dakopatts

a/s. Flest húðsýnin voru einnig hert í 2,5% glútaraldehyði og/eða MacDowells vökva og eftirhert með osmiumtetraoxíði (OsO₄) fyrir rafeindasmásjárathugun. Sýnin voru steipt inn í Spurr resin og skoðuð í Philips EM 300 rafeindasmásjá.

Magn sýstatín-C í mænuvökva var mælt hjá 22 sjúklingum og einstaklingum af heilablæðingarættum með ónæmisdreifiprófi eins og áður hefur verið lýst (11).

NIÐURSTÖÐUR

Af þeim 25 einstaklingum af heilablæðingarættum, sem athugaðir voru með tilliti til mýlildisútfellinga í húð, reyndust 14 hafa þær. Af þessum 14 einstaklingum var sjúkdómurinn staðfestur með krufningu í 7 tilfellum. Allir 14 höfðu óeðlilega lágt sýstatín-C magn í mænuvökva að einum undanskildum (sjá töflu I). Sá einstaklingur hafði 4,6 mg/l af sýstatín-C í mænuvökva en eðlilegt meðalgildi er 7,1 mg/l, spönnun 4,0-13,6 (12). Með krufningu var sjúkdómurinn síðar staðfestur hjá þessum einstaklingi.

Húðsýni frá 15 einstaklingum af heilablæðingarættum voru athuguð í rafeindasmásjá og af þeim reyndust sjö hafa þráðlingasamsöfnun einkennandi fyrir mýlildisefni. Þessi sýni voru öll jákvæð fyrir mýlildisefni með öðrum aðferðum. Átta tilfelli, sem voru neikvæð fyrir mýlildisefni með öðrum aðferðum, reyndust einnig neikvæð í rafeindasmásjá.

Í húðsýnum frá þeim 10 einstaklingum, sem ekki voru af heilablæðingarætt, og athugaðir voru til samanburðar fundust ekki mýlildisútfellingar, hvorki í ljóssmásjá né í rafeindasmásjárskoðun (sjá töflu II).

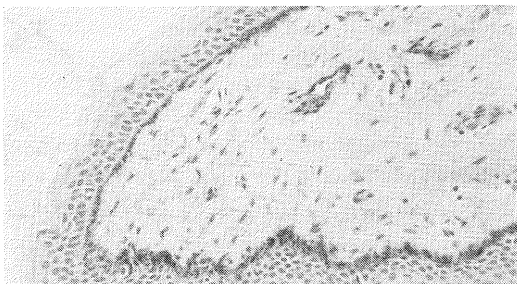
Ekkert markvert sást í hematoxylín-eósin lituðum sneiðum. Útbreiðsla mýlildisútfellinganna í húðinni í Congolituðum sneiðum var sú sama og sást í sneiðum lituðum með and-sýstatín-C ónæmisperoxíðasalitun. Sægræna ljósbrotið, sem er einkennandi fyrir mýlildisefni, var þó oftast minna áberandi en litunin í ónæmisperoxíðasasneiðunum og auk þess gerði ljósbrot kollagens í leðurhúð túlkun stundum erfiða. Lýsing á útbreiðslu útfellinganna á því við um niðurstöður úr báðum litunaraðferðunum.

Yfirhúð litaðist aldrei jákvætt fyrir mýlildisefni. Á mótum yfirhúðar og leðurhúðar voru sýstatín-C mýlildisútfellingarnar ríkulegastar í öllum tilfellum. Í þeim tilfellum þar sem mest var af því myndaði ljósbrúnn litur ónæmisperoxíðasans því sem næst samfelldan brúnan borða í efsta lagi leðurhúðar (mynd 1).

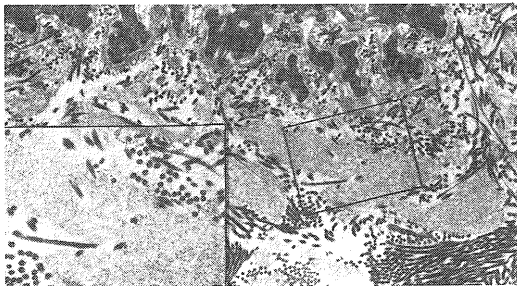
Athuganir í rafeindasmásjá sýndu mýlildisþráðlinga í efsta lagi leðurhúðar en grunnhimnan (membrana basalis) án mýlildisþráða skildi milli yfirhúðar og leðurhúðar (sjá mynd 2).

Litun fyrir mýlildi var ríkuleg í bandvefnum, sem næstur er fitukirtlum og þar mátti oft sjá samfellda litun eins og hjúp utan um þetta líffæri (mynd 3). Í bandvefnum umhverfis hárreisivöðva og háarsekki var oft litun fyrir sýstatín-C mýlildisefni. Utan um boli og ganga svitakirtla var litun einnig vel skýr í flestum tilfellum (mynd 4). Oftast sást litun umhverfis vessaæðar í leðurhúð og algengt var að bandvefurinn umhverfis blóðæðar og taugar litaðist fyrir sýstatín-C mýlildisefni (mynd 5). Aðeins á stöku stað sást litun í hinum eiginlega æðavegg eða inn í tauginni.

Staðsetning mýlildisþráðlinga í húð reyndist



Mynd 1. Mýlildisútfellingar í efsta lagi leðurhúðar. And-sýstatín-C ónæmisperoxíðasalitun. x80.



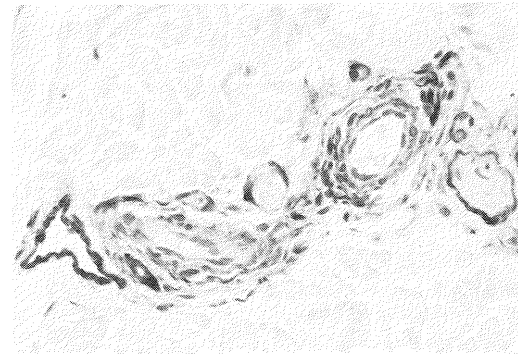
Mynd 2. Rafeindasmásjármynd af mótum yfirhúðar og leðurhúðar. Mýlildisþráðlingar í leðurhúð.



Mynd 3. Mýlildisútfellingar umhverfis fitukirtil. And-sýstatín-C ónæmisperoxíðasalitun. x50.



Mynd 4. Mýlildisútfellingar umhverfis svitakirtla. And-sýstatín-C ónæmisperoxíðasalitun. x75.



Mynd 5. Taug, blóðæðar og vessaæð með mýlildisútfellingum. And-sýstatín-C ónæmisperoxíðasalitun. x130.

í rafeindasmásjá vera í samræmi við það sem að ofan er getið.

Í fituvef húðbeðs sást oft litun á sýstatín-C mýlildisefni umhverfis einstakar fitufrumur en slíkum »amyloid rings« hefur verið lýst áður (13) við mýlildi annarar gerðar í húð.

Paraffínsneiðar af sýnum frá nokkrum sjúklingum voru litaðar fyrir keratíni og kom í ljós að mýlildisefnið litaðist ekki. Einnig voru sneiðar frá sex sjúklingum litaðar með and-SAP og kom þá fram litun nokkuð jafndreifð í öllum þáttum húðarinnar og er það í samræmi við niðurstöður annarra (14). Í 5 tilfellanna kom þó fram áberandi sterk litun í efsta lagi leðurhúðar, þar sem sýstatín-C svörunin var sterkust.

Þegar eðlilegt kanínusermi var notað í stað fyrsta stigs mótefnis fékkst engin litun.

Plasmafrumur, átfrumur eða risafrumur fundust ekki í tengslum við mýlildisútfellingarnar í neinu tilfelli.

UMRÆÐA

Sýstatín-C jákvæð mýlildisútfelling utan miðtaugakerfis í þessum arfgenga heilablæðingarsjúkdómi fannst fyrst í æðum eitils undan kjálkabarði hjá einum sjúklingi (12). Í kjölfar þess var gerð leit að sýstatín-C mýlildisefni í öðrum eitlum og í ýmsum líffærum og fannst það þá víðar en áður var þekkt, þar á meðal í húð (9).

Sjúkdómur þessi hefur verið flokkaður sem »*hereditary localized amyloidosis*« (15). Þá flokkun þarf nú að endurskoða í ljósi nýrra upplýsinga og ætti hann þá, samkvæmt ofangreindri flokkun, að teljast í hópi »*hereditary systemic amyloidosis*« og skipa þann hóp ásamt fágætum, arfgengum mýlildum sem ýmist leggjast aðallega á úttaugar (*neuropathic forms*), nýru (*nephropathic forms*) eða hjarta (*cardiomyopathic forms*).

Mýlildisútfellingar í húð sjúklinga með arfgenga heilablæðingu voru mest áberandi, og víða samfelldar, á mótum yfirhúðar og leðurhúðar svo og umhverfis háarsekki og fitukirtla. Samskonar útbreiðslu mýlildisefna í húð hefur verið lýst við frummýlildi og bólgumýlildi og mýlildi við mergæxli (13),

án þess að vera talin sérlega áberandi. Mýlildisútfellingum hefur verið lýst í húð sjúklinga með ættgengar mýlildisútfellingar í ýmsum úttaugum. Í þeirri lýsingu er ekki getið söfnunar á mótum yfirhúðar og leðurhúðar, aðeins lítilla dreifðra bletta í leðri. Þar er hins vegar lýst mýlildissöfnun umhverfis svitakirtla, sem algengustu staðsetningunni og sást þar í öllum tilfellum (5). Það sást oft í þessari rannsókn. Í öðrum frummýlildum og í bólgumýlildum er þessi staðsetning þekkt þó ekki sé hún eins algeng (13; 2). Mýlildisútfellingum í veggjum blóðæða í húð hefur verið lýst við öll afbrigði af mýlildi þar sem húðútfellingar finnast og eru þær af sumum talinn sá staður þar sem þær eru ríkulegastar. Í þessari rannsókn voru útfellingar í og umhverfis úthjúp blóðæða ekki óalgengar og í stöku tilfellum voru útfellingar í æðaveggjum.

Nokkuð áberandi var sýstatín-C jákvæð svörun umhverfis vessaæðar. Mýlildi umhverfis vessaæðar hefur ekki verið lýst við aðrar mýlildissafnanir í húð svo höfundum sé kunnugt.

Athyglisvert er, að Rubinow og Cohen (5) geta þess sérstaklega, að ekki hafi fundist mýlildi í taugum leðurhúðar í þeirra tilfellum af ættgengu fjöldaugamýlildi. Í þessari rannsókn var jákvæð svörun fyrir sýstatín-C mýlildi umhverfis taugar í leðurhúð ekki óalgeng. Loks skal þess getið að stundum fundust mýlildisútfellingar umhverfis hárræisvöðva og umhverfis fitufrumur en það er þekkt við mýlildi af öðrum toga.

Segja má að útbreiðslu mýlildisútfellinga í húð við þessa arfgenga heilablæðingu sé í aðaldráttum í samræmi við útfellingar við önnur afbrigði af mýlildi, en áherslur séu að nokkru leyti aðrar. Á það einkum við um yfirhúðar og leðurhúðarmótin. Þetta er þó eini sjúkdómurinn þar sem sýstatín-C mýlildisefni finnst í mýlildisútfellingum í húð.

Glýkóprótínið *amyloid P component*, mýlildis-P-þáttur, sem er eðlilegur byggingarþáttur í flestum vefjum og þar á meðal húð, finnst jafnframt í öllum tegundum mýlildis (16). Mýlildis-P-þátturinn virðist í eðlilegri húð hafa hliðstæða útbreiðslu og sýstatín-C mýlildisútfellingarnar en hann er þó ekki að finna í grunnhimnunni (membrana basalis) milli yfirhúðar og leðurhúðar (14).

Í tilfellunum sem hér er gerð grein fyrir var grunnhimnan án mýlildisútfellingar.

Meðal þeirra sem athugaðir voru í þessari rannsókn voru þrjár einstaklingar (þar af einn 14 ára gamall), sem höfðu lækkað sýstatín-C í mænuvökva og mýlildisútfellingar í húð en ekki sögu eða klínísk einkenni sjúkdómsins. Ekki er vitað hvenær fyrst má vænta þess að finna mýlildisútfellingar í húð þessara einstaklinga. Það er ljóst af rannsókn þessari, þó nákvæmar magnmælingar hafi ekki verið gerðar, að mýlildisútfellingarnar eru mestar í húð þeirra sem lengst hafa haft sjúkdóminn.

Líklegt hefur verið talið að mýlildis-P-þátturinn hefði þýðingu í sambandi við tilurð mýlildis (14). Hann kemur fram í húð manna á aldrinum tveggja til fjögurra ára og er orðinn þar áþekkur því sem þekkist meðal fullorðinna á fimmta aldursári. Hugsanlegt er að mýlildisútfelling í húð þeirra sem hafa erfðagallann hefjist um þetta leyti. Hugmyndir, sem settar hafa verið fram um hlutverk mýlildis-P-þáttarins í sambandi við útfellingu mýlildis, renna stöðum undir þá tilgátu.

Í fyrsta lagi að mýlildis-P-þátturinn, sem fylgir eðlilegum stælnum (elastic) bandvefsþráðum í húð (14), hafi mikla sækni í mýlildisþræði og stuðli þannig að útfellingu þeirra á þá grind stælinna þráða sem fyrir eru (17).

Í öðru lagi hafa verið leiddar að því líkur að mýlildis-P-þátturinn verji mýlildisþræði fyrir niðurbroti og stuðli þannig að söfnun þeirra í vefi og viðhaldi þeirra þar (17, 18). Þessar hugmyndir eiga sér báðar stoð í in vitro athugunum.

Mýlildisútfelling fannst einungis í húð þeirra einstaklinga sem höfðu sjúkdóminn greindan með öðrum aðferðum, hvort heldur þeir höfðu einkenni hans eða ekki. Má því gera ráð fyrir að sýnistaka úr húð sé ábyggileg og fljótvirk greiningaraðferð á þessum sjúkdómi. Þessi aðferð er jafnframt eina auðveldla greiningaraðferðin sem sýnir mýlildisútfellingu í vefi lifandi sjúklings á beinan hátt. Hugsanlegt er að gagn megi hafa af þessari aðferð til að meta framvindu sjúkdómsins og ef til vill árangur meðferðar þó síðar verði.

Þakkir: Sigurlaugu Aðalsteinsdóttur kennslumeinataekni, Ragnhildi Kolka deildarmeinataekni og Michael Kissane

Ljósmyndara, er þökkuð tæknileg aðstoð. Einnig er þakkaður stuðningur Vísindasjóðs Háskóla Íslands við þetta verk.

SUMMARY

Clinically normal skin from 14 individuals with the diagnosis of Hereditary Cystatin C Amyloidosis (HCCA) was investigated. Their age ranged from 14 – 53 years and three of them had no clinical history or signs of the disease. In seven cases the diagnosis was verified post mortem. Cystatin C amyloid deposits were found in all 14 cases.

Skin from 11 unaffected relatives and 10 unrelated individuals, who served as controls, was negative for amyloid in all cases.

Punch biopsy of the skin is a simple procedure and appears to be a valid method for diagnosis of HCCA, even before the appearance of clinical symptoms.

HEIMILDIR

1. Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis. N Engl J Med 1980; vol. 302, 23: 1283-92.
2. Brownstein MH, Helwig EB. The cutaneous amyloidosis. II. Systemic forms. Arch Dermatol 1970; 102: 20-8.
3. Lever WF, Schaumburg-Lever G. Histopathology of the skin. JB Lippincott Company, 1975.
4. Masu S, Hosokawa M, Seiji M. Amyloid in localized cutaneous amyloidosis: Immunofluorescence studies with anti-keratin antiserum especially concerning the difference between systemic and localized cutaneous amyloidosis. Acta Dermatovener 1981; 61: 381-4.
5. Rubinow A, Cohen A. Skin involvement in familial amyloidotic polyneuropathy. Neurology 1981; 31: 1341-5.
6. Árnason Á. Apoplexie und ihre Vererbung. Acta Psychiatr Neurol Suppl. VIII, 1935.
7. Guðmundsson G, Hallgrímsson J, Jónasson TA, Bjarnason Ó. Hereditary cerebral hemorrhage with Amyloidosis. Brain 1972; 95: 387-404.
8. Ghiso J, Pons-Estel B, and Frangione B: Hereditary cerebral amyloid angiopathy: The amyloid fibrils contain a protein which is a variant of cystatin C, an inhibitor of lysosomal cysteine proteases. Biochem Biophys Res Commun 1986; 136: 548-54.
9. Blöndal H, Guðmundsson G, Benedikz E, Jóhannesson G. Dementia in Hereditary Cystatin C amyloidosis. In: Alzheimer's Disease and Related Disorders. K. Iqbal, H.M. Wisniewski, B. Winblad (editors), Alan R. Liss, Inc., New York, 1989. (in press).
10. Kitamoto T, Ogomori K, Tateishi J, Prusiner SB. Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. Laboratory Investigation 1987; 57: 230-6.
11. Löfberg H, Grubb A. Quantitation of gamma-trace in human biological fluids: Indications for production in the central nervous system. Scand J Clin Lab Invest 1979; 39: 619-26.

12. Löfberg H, Grubb A, Nilsson E, Jansson Ó, Guðmundsson G, Blöndal H, Árnason A and Thorsteinson L. Immunohistochemical characterization of the amyloid deposits and quantitation of pertinent cerebrospinal fluid proteins in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Stroke* 1987; 18: 431-40.
13. Rubinow A, Cohen A. Skin involvement in Generalized amyloidosis. *Ann Int Med* 1979; 88: 781-5.
14. Breathnach SM, Bhogal B, Dyck RF, De Beer FC, Black MM, Pepys MB. Immunohistochemical demonstration of amyloid P component in skin of normal subjects and patients with cutaneous amyloidosis. *Brit J Dermatol* 1981; 105, 115-24.
15. Pepys MB. Amyloidosis: Some recent developments. *Q J Med, new series* 67, 1988; 252: 283-98.
16. Khan AM, Walker F. Age related detection of tissue amyloid P in the skin. *J Pathol* 1984; 143: 183-6.
17. Breathnach SM. The cutaneous amyloidoses. *Arch Dermatol* 1985; 121: 470-5.
18. Coria F, Castano E, Prelli F, Larrondo-Lillo M, van Duinen S, Shelanski ML, Frangione B: Isolation and characterization of amyloid P component from Alzheimer's disease and other types of cerebral amyloidosis. *Lab Invest* 1988; 58: 454-7.