

Subkutant injicerat insulin kan ge amyloidinlagring

DIAGNOSTISKA DILEMMAN OCH FALLGROPAR FÖR PATOLOGEN OCH OANADE KONSEKVENSER FÖR DIABETOLOGEN

Daniel Espes, med dr, specialistläkare, sektionen för endokrinologi och diabetologi, Akademiska sjukhuset, Uppsala

Per Westermark, professor emeritus, Uppsala universitet; konsultläkare, avdelningen för klinisk patologi

● per.westermark@igp.uu.se

båda Akademiska sjukhuset, Uppsala

De **systemiska amyloidoserna** utgör en grupp av potentiellt livshotande proteinveckningssjukdomar, som alla leder till progressiv inlagring av specifika proteiner i fibrillär form, dvs amyloid, i ett flertal organ [1]. Proteinerna skiljer sig mellan de olika formerna, liksom patogenesen. För flera av amyloidossjukdomarna saknades länge specifik behandling. Under de senaste åren har det emellertid utvecklats mycket lovande behandlingar mot de vanligaste systemiska amyloidoserna (de av AA-, AL- och transtyretinursprung [A = amyloid, L = lätt immunglobulinkedja]).

Detta har ökat medvetenheten om amyloidos hos både läkare och patienter. Det räcker inte längre att kunna avgöra om amyloidos verkligen föreligger, utan den biokemiska typen måste också bestämmas.

Systemisk amyloidos diagnostiseras vanligen genom mikroskopisk analys av biopsimaterial följd av biokemisk typbestämning med olika metoder baserat på vilken typ av biopsimaterial som tagits. Biopsier kan tas från de organ som ger upphov till symtom, t ex njure, hjärta eller lever, men oftast tas biopsier från en mer lättillgänglig vävnad, vanligtvis subkutan fettvävnad på buken [2]. Finnålsbiopsi kan då användas, men det kräver träning och passar inte för alla amyloidosformer. Det har därför blivit vanligare att biopsier tas kirurgiskt eller med hjälp av hudstans där man med lite träning lätt får tillräcklig mängd subkutan fettvävnad för att såväl ställa diagnosen amyloidos som göra en typbestämning.

I Sverige finns tre helt dominerande systemiska amyloidosformer:

- AA-amyloidos (tidigare benämnd sekundär)
- AL-amyloidos
- ATTR-amyloidos (transtyretin).

AA-amyloidos uppstår oftast till följd av en kronisk inflammatorisk sjukdom. AL-amyloidos är en konsekvens av en plasmacellsklon, benign eller malign, som producerar en amyloidogen lätt immunglobulinkedja. AL-amyloidos förekommer även i en lokal form. Den tredje systemiska amyloidosen orsakas av amyloidproteinet transtyretin (TTR, i amyloid form benämnt ATTR).

ATTR-amyloidproteinet förekommer vid två sjukdomstillstånd. Det ena är hereditär transtyretinamyloidos, som orsakas av en mutation i transtyretinogenen, vilket leder till ett lätt förändrat transtyretin. Vid den andra formen ger icke-muterat transtyretin av okänd orsak upphov till systemisk amyloidos, vilken numera benämns »vildtyps-ATTR-amyloidos« (ti-

»... inlagringar av insulinamyloid kan leda till diagnostiska och kanske terapeutiska problem ...«

digare »senil systemamyloidos«) [3]. I tillägg till de tre i Sverige vanligaste systemamyloidoserna finns ett antal i allmänhet ytterst sällsynta sjukdomar.

Insulin kan ge amyloidinlagring

Det finns ytterligare ett antal proteiner som kan ge upphov till amyloidinlagringar hos människa. Ett sådant protein är insulin. Detta kan vara viktigt för läkare att känna till, eftersom inlagringar av insulinamyloid kan leda till diagnostiska och kanske terapeutiska problem, vilket illustreras nedan.

Vid typbestämning av systemiska amyloidinlagringar förväntar vi oss i första hand att finna ett av de tre ovannämnda proteinerna, som alla kan bestämmas med hjälp av specifika antikroppsfärgningar.

HUVUDBUDSKAP

- Subkutant injicerat insulin kan aggregera till lokala inlagringar med typiska amyloidegenskaper.
- Inlagringarna kan misstolkas som manifestation av systemisk amyloidos, som kan vara ett livshotande tillstånd. Problemet illustreras med tre korta fallbeskrivningar.
- Insulin som omvandlats till amyloidfibriller är biologiskt inaktivt. Skenbar insulinresistens kan således uppträda.
- Fibrillärt insulin kan återföras till aktivt hormon, men det är inte känt om detta kan inträffa med de subkutana inlagringarna.
- Förekomst av insulinamyloid utesluter inte möjligheten att systemisk amyloidos också föreligger.
- Vid stark klinisk misstanke om systemisk amyloidos bör man komplettera med biopsier från underhudsfett där insulin inte administrerats.

FALLBESKRIVNING

Under loppet av lite drygt 1 år har vi dock vid det kliniska amyloidlaboratoriet i Uppsala fått oss tillsända sex biopsier, direkt eller via andra patologavdelningar, med lokala amyloidinlagringar förorsakade av injicerat insulin. Dessa amyloidinlagringar hade i allmänhet initialt lett till misstankar om allvarlig systemisk amyloidsjukdom.

Nedanstående tre korta fallbeskrivningar är inhämtade från medföljande remisser, varför den kliniska informationen oftast har varit mycket knapphändig.

FALLBESKRIVNINGAR

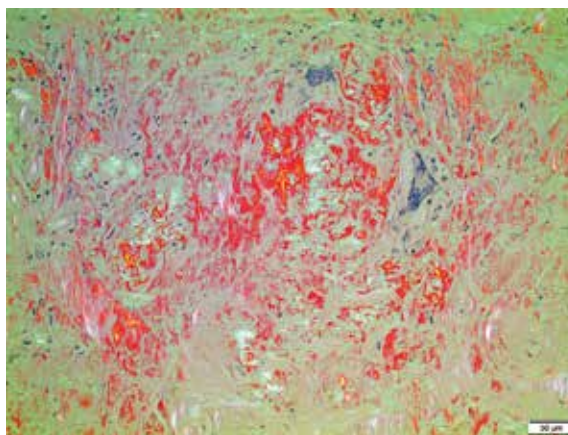
Fall 1. Det första fallet var en man med reumatoid artrit och typ 1-diabetes. Han hade knölar i huden som föranledde biopsi. Denna visade riklig mängd amyloid i subkutis. Utredningen resulterade inte i några fynd som talade för systemisk amyloidos, men möjligheten diskuterades. Paraffinbäddat biopsimaterial sändes till Uppsala från hemortssjukhuset för typbestämning, och i rutinsnitt sågs mycket riktigt riklig mängd av amyloid (Figur 1). Det noterades även en del anslutande flerkärniga celler av främmandekroppstyp. Immunhistokemisk analys med de vanliga antikropparna för typbestämning av amyloid utföll dock negativ. Däremot erhöles en stark reaktion vid färgning med antikroppar mot insulin (Figur 2).

Fall 2. Det andra fallet var en man där misstanke om systemisk amyloidos hade väckts på grund av proteinuri och påvisad M-komponent. En bukfettvävnadsbiopsi visades innehålla amyloid, varför paraffinbäddat biopsimaterial sändes till Uppsala från hemortssjukhuset för typbestämning. Rutinsnitt färgade för amyloid bekräftade mycket riklig mängd av amyloid. Vid försök till typbestämning genom immunhistokemi erhöles en svag reaktion med antikropp mot AL-protein av lambda-typ.

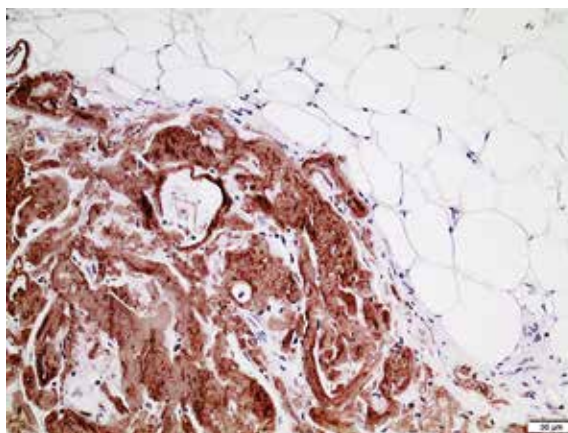
Den preliminära diagnosen blev därför AL-amyloidos, men med reservation för det osäkra fyndet. Nya snitt färgades med antikropp mot insulin, som visade den sanna naturen hos denna amyloid. Vid telefonkontakt med remitterande läkare framkom att patienten hade insulinbehandlad diabetes.

Detta fall demonstrerar att immunhistokemi kan leda till felaktiga slutsatser vid svag reaktion. Bakgrunds färgning kan misstolkas som en äkta reaktion, och detta är ett problem särskilt med kommersiellt tillgängliga antikroppar. Amyloidfibriller är också kända för att kunna binda andra proteiner till sin yta och därigenom ge en falsk reaktion. Slutligen förekommer dubbelamyloider, dvs två systemamyloider hos samma patient. Det brukar nästan alltid innebära separata inlagringar av de två typerna, vilket kan avslöjas med immunhistokemisk analys av snitt.

Fall 3. Det tredje fallet var en man där njurmedicinaren misstänkt amyloidos och där bukfettvävnadsbiopsi visats innehålla rikligt med amyloid. Paraffinbäddat biopsimaterial skickades vidare till Uppsala från hemortssjukhuset för typbestämning. I rutinsnitt framträdde fettvävnad med ovanligt riklig mängd amyloid. Det fanns också en vävnadsreaktion med spridda flerkärniga jätteceller av främmandekroppstyp. Immunhistokemi med de vanliga antikropparna mot amyloidfibrillprotein utföll negativ, varför



Figur 1. Biopsi från subkutis (fall 1) med rikliga inlagringar av insulinamyloid. Snitt färgat med kongorött och analyserat i polarisationsmikroskop. Amyloid dominerar bilden och framstår som röda eller gröna områden. (Storleksmarkör 50 μm .)



Figur 2. Biopsi från subkutis (fall 1) med rikliga inlagringar av insulinamyloid. Snitt immunfärgat för insulin. Amyloid framstår som brunfärgat, homogent område. (Storleksmarkör 50 μm .)

insulinantikroppar testades med positivt resultat. Vid telefonkontakt med remittenten framkom att patienten hade insulinbehandlad typ 1-diabetes.

DISKUSSION

Insulin som amyloidfibrillprotein

Redan på 1940-talet visades det att insulin experimentellt lätt kan överföras till fibrillär form genom upprepad upphettning och nedkylning i sur lösning [4]. Sådana fibriller har typiska amyloida egenskaper, såsom affinitet för färgämnet kongorött med åtföljande dubbelbrytning vid polarisationsmikroskopi och karakteristiskt utseende vid elektronmikroskopi. Genom att en sådan fibrillsuspension görs alkalisk kan den övergå i sin ursprungliga form, dvs fritt insulin.

Som kuriosum kan nämnas att insulinets fibrillbildande egenskaper har använts som en metod att renframställa hormonet från ett pankreasextrakt.

Den första beskrivningen av insulinamyloid, uppkommen hos en patient som behandlats med 5 veck-

»Amyloidinlagringarna kan alltså ge upphov till något som kliniskt kan uppfattas som insulinresistens.«

ors infusion av insulin, är från 1983 [5]. Här kunde det visas att insulinamyloiden i det fallet hade porcint ursprung. Den första rapporten om amyloidinlagring på platsen för subkutana injektioner av insulin, också detta porcint, är från 1988 [6]. Senare har det visats att andra insulinformer, inklusive humant insulin, kan ge upphov till lokal amyloidbildning på platsen för injektioner [7].

Numera används inte porcint insulin vid framställning, och även humaninsulin (t ex Insulatard, Insuman, Actrapid och Humulin) blir alltmer ovanligt i klinisk rutin, även om det fortfarande förekommer. Vid typ 1-diabetes används som rutin en syntetisk långverkande insulinanalog (t ex insulin glargin och insulin detemir) i kombination med snabbverkande syntetiska insulinanaloger (t ex insulin aspart och insulin lispro).

Som ett alternativ till upprepade insulininjektioner kan en insulinpump användas, vilken ger en kontinuerlig infusion av ett snabbverkande insulin som bas och extra bolusdoser vid måltider.

Vid behandling av typ 2-diabetes är det fortfarande vanligt med medellångverkande humant NPH-insulin (t ex Insulatard och Insuman) vid initiering av insulinbehandling. Även vid behandling av typ 2-diabetes blir dock långverkande syntetiska insulinanaloger mer och mer dominerande.

Hur olika syntetiska insulinanaloger skiljer sig avseende risken för bildande av fibrillära strukturer och amyloid är i dag inte känt. Att exogen insulinbehandling i sig kan ge upphov till »knölar« är allmänt känt, eftersom insulin stimulerar fettbildning och därmed leder till lipohypertrofi. På grund av det bör alla patienter instrueras att variera platsen för injektion av insulin. Däremot är risken för bildandet av insulinamyloid mycket dåligt studerad och ingår nog sällan i den differentialdiagnostiska arsenalen ens på en diabetesmottagning.

Tre risker med amyloidinlagringar av injicerat insulin

Åtminstone tre tänkbara konsekvenser av förekomst av insulinamyloid bör diskuteras. För det första föreligger helt uppenbart risk för felaktig diagnos av systemisk amyloidos. Risken är naturligtvis särdeles stor om man underlåter direkt typbestämning av amyloid och endast förlitar sig på kliniska fynd som förekomst av monoklonal gammopati av oklar signifikans (MGUS) (AL-amyloidos) eller reumatoid artrit (AA-amyloidos). Också vid typbestämning kan förekomst av insulinamyloid innebära problem, eftersom det kan ge förhöjd bakgrundsfärgning med risk för »falskt positiva« färgningar, vilket illustreras i fall 2.

Den andra konsekvensen är att det injicerade insulinet inte når cirkulationen utan i stället deponeras i

fibrillär form i den subkutana vävnaden. Det är inte utrett hur mycket som kan deponeras vid varje injektion, men sannolikt varierar detta från gång till gång och blir mest påtagligt om injektionen sker i redan befintlig amyloidinlagring. Redan existerande amyloid påskyndar nämligen omvandlingen av insulin till amyloidfibriller. Amyloidinlagringarna kan alltså ge upphov till något som kliniskt kan uppfattas som insulinresistens [8].

Vidare kan det också innebära att blodsockret blir mycket svängande då insulinbehovet kan verka variera från gång till gång baserat på var det injiceras. I en mycket noggrann genomgång av alla publicerade fall av insulinamyloid visades att detta faktiskt kan vara fallet [7].

Ytterligare en risk med insulinamyloid är att fibrillerna, som är polymerer av insulin, inte nödvändigtvis är resistent mot depolymerisering och därmed skulle kunna frisättas på nytt som lösligt insulin [9]. Teoretiskt skulle alltså det insulin som deponerats i amyloidform i underhudsfettet kunna frigöras och därmed få allvarliga följder. Något sådant fall har oss veterligen dock inte beskrivits, men kunskapen på det området är mycket ofullständig.

Det finns också en tredje risk. Förekomst av lokala insulinamyloidinlagringar utesluter inte möjligheten att också systemisk amyloidos föreligger. Om amyloid påvisas i underhudsfett som typbestäms till insulinamyloid, kan det finnas risk att systemisk amyloidos därmed utesluts. Även om annan amyloid kan finnas i den vävnad där insulindepositionerna ligger, kan mängden vara liten och därmed drunkna i de oftast mycket rikliga insulinamyloidinlagringarna. Om klinisk misstanke om systemisk amyloidos kvarstår bör således nya biopsier tas från vävnad där insulin inte injicerats. ○

● Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.

Citera som: *Läkartidningen*. 2019;116:FSUF

REFERENSER

- Merlini G, Westermark P. The systemic amyloidoses: clearer understanding of the molecular mechanisms offer hope for more effective therapies. *J Intern Med*. 2004;255(2):159-78.
- Westermark P. Subcutaneous adipose tissue biopsy for amyloid protein studies. *Methods Mol Biol*. 2012;849:363-71.
- Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, et al. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid*. 2018;25(4):215-9.
- Waugh DF. A fibrous modification of insulin. I. The heat precipitate of insulin. *J Am Chem Soc*. 1946;68(2):247-50.
- Störkel S, Schneider HM, Müntefering H, et al. Iatrogenic, insulin-dependent, local amyloidosis. *Lab Invest*. 1983;48(1):108-11.
- Dische FE, Wernstedt C, Westermark GT, et al. Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient. *Diabetologia*. 1988;31(3):158-61.
- Nilsson MR. Insulin amyloid at injection sites of patients with diabetes. *Amyloid*. 2016;23(3):139-47.
- Nakamura M, Misumi Y, Nomura T, et al. Extreme adhesion activity of amyloid fibrils induces subcutaneous insulin resistance. *Diabetes*. 2019;68(3):609-16.
- Waugh DF. Regeneration of insulin from insulin fibrils by the action of alkali. *J Am Chem Soc*. 1948;70(5):1850-7.

SUMMARY

Amyloid from insulin treatment: a pitfall for the pathologist and the diabetologist

Biopsies from six diabetic patients with subcutaneous amyloid deposits formed by injected insulin have been sent to our laboratory during the last year. In all but one of the six patients a subcutaneous adipose tissue biopsy was taken due to suspicion of systemic amyloidosis.

Four of these patients had renal insufficiency, with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) in three while the fifth had heredity for transthyretin amyloidosis. In the sixth patient a biopsy was taken due to subcutaneous nodules at insulin injection sites. In all biopsies, large amounts of amyloid were present and their biochemical nature was elucidated by immunohistochemistry or western blot.

The risk of incorrect interpretation with misdiagnosis of systemic amyloidosis is underlined. The consequences this may have on insulin treatment are insufficiently studied.