



Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd

Amyloidózy (orgánová postižení a klinické projevy)

Bakalářská práce

Školitel: Doc. MUDr. Josef Herink, DrSc.

Hradec Králové 2010

Monika Šálanská

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji“.

V Hradci Královém dne 13. 5. 2010.

Podpis:.....

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli panu Doc. MUDr. Josefu Herinkovi, DrSc. za jeho vstřícnost, trpělivost, cenné rady a připomínky, díky kterým mohla být tato práce napsána a dokončena.

Obsah

1. Souhrn.....	2
2. Úvod.....	3–6
3. Složení amyloidových proteinů.....	6–8
4. Generalizované amyloidózy.....	9–13
1. Primární amyloidózy.....	9–13
1. Patofyziologie primárních amyloidóz.....	9–10
2. Klinické projevy.....	10–13
2. Sekundární amyloidózy.....	13
1. Patofyziologie sekundárních amyloidóz.....	13
2. Klinické projevy.....	13
3. A β_2 amyloidóza.....	13–14
1. Patofyziologie A β_2 amyloidózy.....	13
2. Klinické projevy.....	14
4. Senilní amyloidóza.....	14
1. Patofyziologie senilní amyloidózy	14
2. Klinické projevy.....	14
5. Hereditární amyloidózy.....	14–16
6. Lokalizované amyloidózy.....	16–17
7. Amyloidózy CNS	17–18
8. Závěr.....	19
9. Seznam použitých zkratk.....	20
10. Použitá literatura.....	21–26

1. Souhrn

Amyloidózy jsou vzácnou skupinou onemocnění, pro které je charakteristické ukládání amyloidových depozit do cílových orgánů. Jedná se o poruchy proteinového metabolismu. Depozita jsou složena z fibrilárních proteinů, které jsou pro jednotlivé typy amyloidóz specifické. V současné době je popsáno 27 amyloidóz. Depozita mají stejný histologický rys – barví se konžskou červení. Histologický preparát získaný z biopsie je nejspolehlivější způsob diagnostiky. Klasifikace amyloidóz podle světové zdravotnické organizace vychází z chemického složení proteinů, ze kterých se tvoří amyloidová fibrila. V této práci jsou amyloidózy rozděleny na generalizované, lokalizované, geneticky podmíněné a na amyloidózy centrálního nervového systému. Klinické projevy amyloidóz jsou rozmanité, od mírných po velmi závažné, záleží především na orgánové manifestaci.

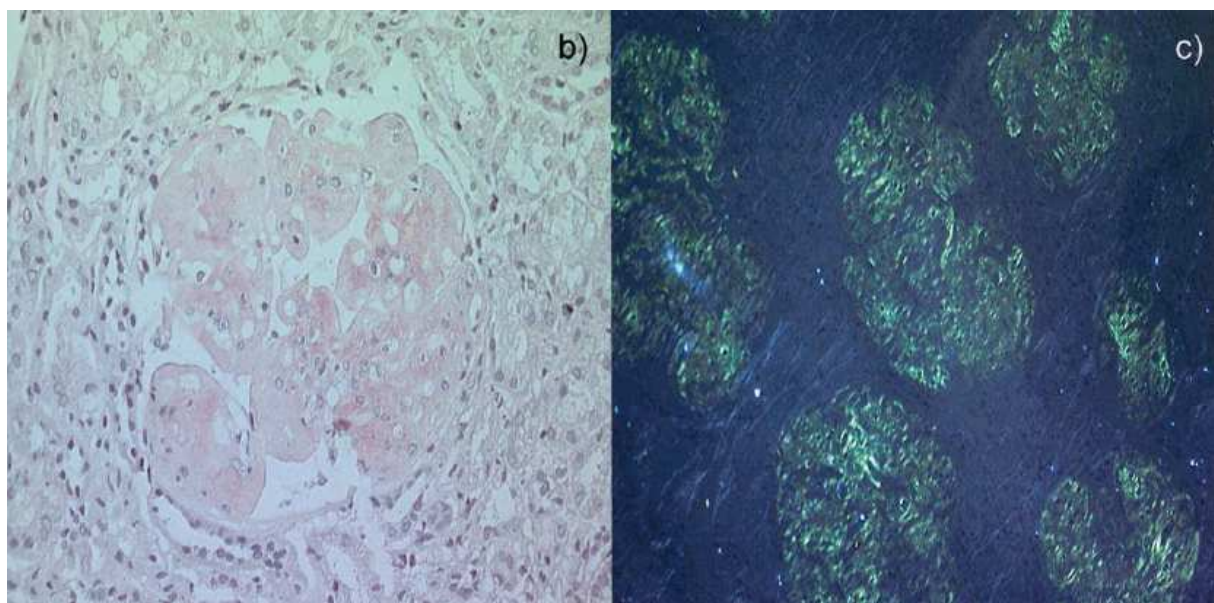
1. Abstract

Amyloidosis is a rare group of diseases, in which a protein, called amyloid, builds up in the organs and tissues. It is disorder of proteinous metabolism. The deposits are composed of fibrilar proteins, they are specific for individual type of amyloidosis. Amyloidosis now covers in man 27 biochemically and clinically distinct types. The deposits have rather identical histological sign. They are coloured by Congo red. The histological specimen obtained from biopsy is of reliable evidence for diagnosis. The classification of amyloidosis in agreement with World Health Organisation is based on chemical structure of proteins that form amyloid fibrils. The amyloidosis is divided into generalized, localized, hereditary and amyloidosis of the central nervous system in this study. The clinical signs of amyloidosis are variable, the spectrum from mild to serious is covered with dependence on organ affliction.

2. Úvod

Amyloidózy jsou skupinou onemocnění, kdy dochází k extracelulárnímu ukládání proteinů v podobě amyloidních fibril (Pepys *et al.*, 2003; Merlini & Bellotti, 2003). Akumulace fibril vede k porušení tkáňové struktury a orgánových funkcí a

tudíž k nemoci. Jako první použil označení amyloid v roce 1854 Robert Virchow při popisu do té doby neznámé extracelulární substance v játrech (Virchow, 1854). Termín amyloid byl následně v 19. století používán k popsání „sádlovité“ struktury tkání napadených orgánů. Je odvozen od *amyloidum* = škrobu podobný, jelikož se tato voskovitá hmota tehdy používanými histologickými metodami barvila podobně jako uhlovodany. Později bylo zjištěno, že amyloid je možno barvit konžskou červení. V normálním světelném mikroskopu se jeví červeně, v polarizovaném světle však jasně zeleně (obr. 1). V roce 1859 Friedreich a Kekule odhalili proteinovou podstatu



Obrázek 1. Mikroskopické fotografie renálního amyloidu barveného konžskou červení b) v světelném mikroskopu c) v polarizovaném světle. Převzato od Hirschfield (2004).

amyloidu. Elektronový mikroskop později odhalil rigidní nevětvené fibrily o průměru okolo 7,5–10 nm a strukturální studie s použitím rentgenové difrakce ukázaly, že amyloidní fibrily sdílí unikátní β -konfiguraci (Hirschfield, 2004).

Historicky byly amyloidózy klasifikovány buď jako systémová nebo lokalizovaná onemocnění. Systémové amyloidózy zahrnovaly primární, sekundární, reaktivní a hereditární amyloidózy, zatímco lokalizované zahrnovaly několik onemocnění s postižením cílových orgánů (Dhawan, nespec.). Moderní klasifikace je založena na povaze uložených fibril (podle WHO-IUIS Nomenclature subcommittee, 1993). U systémových amyloidóz se fibrilární depozita mohou vyskytovat

v parenchymu orgánů všech typů tkání kromě mozku a krevních cév. U různých forem lokalizovaných amyloidóz se rovněž vyskytují depozita, ale jejich výskyt je omezen k specifickým ohniskům nebo jednotlivým orgánům a tkáním. Lokalizované amyloidózy mohou být klinicky bez příznaků s hlavními následky pro konkrétní orgány na rozdíl od systémových, které jsou často fatální a vedou k různým komplikacím (Gilmore *et al.*, 1997; Pepys, 2001).

Podle moderní klasifikace je známo 27 lidských a 9 zvířecích amyloidóz, přičemž tato klasifikace je založena na daném typu prekurzorového proteinu (Westermarck *et al.*, 2005; Westermarck *et al.*, 2007). Amyloidózy tedy mohou být děleny na základě imunohistochemického, imunofluorescenčního a imunoelktroskopického barvení za použití vysoce specifických protilátek k určení prekurzoru v pozitivních vzorcích jako například AA amyloidózy, které jsou spolehlivě potvrzeny či vyloučeny za použití imunohistochemických metod s použitím AA specifických protilátek. Vzhledem k oficiální klasifikaci, některé prekurzory zapříčiňují lokální amyloidózy, jmenovitě ty, které jsou asociovány s AD prekurzorovým proteinem, A β prekurzorovým proteinem, prionovým proteinem, kalcitoninem, amylinem, atriálním natriuretickým faktorem, prolaktinem, insulinem, laktadherinem, kerato-epitelinem, laktoferinem. Další prekurzory vedou k systémovým amyloidózám, jmenovitě sérum AA, apolipoprotein AII, apolipoprotein AIV, gelsolin, lysozym, fibrinogenový α řetězec, cystatin C a ABri proteinový prekurzor. Některé se pak vyskytují jak v lokalizovaných, tak v systémových amyloidózách, a sice imunoglobulinový lehký a těžký řetězec, β 2 mikroglobulin, transtretin a apolipoprotein AI. U dědičných amyloidóz se navíc k běžným diagnostickým testům mohou dělat i genetické testy, obzvlášť u pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou a typickými klinickými příznaky. Nicméně až 50% pacientů s vrozenou amyloidózou nemá příslušnou rodinnou historii a klinická manifestace je velmi rozdílná. V těchto případech jsou genetické testy téměř 100% potvrzující (Pettersson & Konttinen, 2008).

Proces přeměny jednotlivých typů prvotních bílkovin na amyloidové fibrily je multifaktoriální proces, který se liší podle daného typu prvotních bílkovin. Depozita jsou složena z fibrilárních proteinových prekurzorů, které jsou specifické. Zatím jich bylo popsáno 21 typů, přičemž se jedná o značně různorodé struktury. Naproti tomu ultrastruktura a histochemické vlastnosti všech amyloidů jsou si velmi podobné. Vývoj

amyloidových fibril probíhá velmi uspořádaným sestavováním různorodých prekurzorových proteinů do protofilament. Větší a tedy starší fibrily se podobají ocelovým lanům s třemi až šesti filamenti zavinutými kolem sebe (Dobson, 2001). Amyloidová depozita jsou charakteristicky bohatá na heparan a dermatan sulfát, glykosaminoglykany a proteoglykany, které se nekovalentně váží k fibrilám. Předpokládá se, že tyto látky mají vliv na amyloidogenezi, konkrétně na skládání proteinů do fibril a podporu fibrilární stability (Kisilevsky & Fraser, 1996).

Klinické projevy kolísají od asymptomatických až po vážné a život ohrožující formy. Rozdělujeme je do tří stupňů – mírné, středně závažné a závažné. Toto rozdělení přibližně odpovídá výsledkům ukládání amyloidu a záleží zejména na orgánové manifestaci. Správná diagnóza a klasifikace poskytují užitečná vodítka. Závažné postižení životně důležitých orgánů, jako jsou ledviny, srdce nebo centrální nervový systém, má nejhorší následky (Pettersson & Kontinen, 2008).

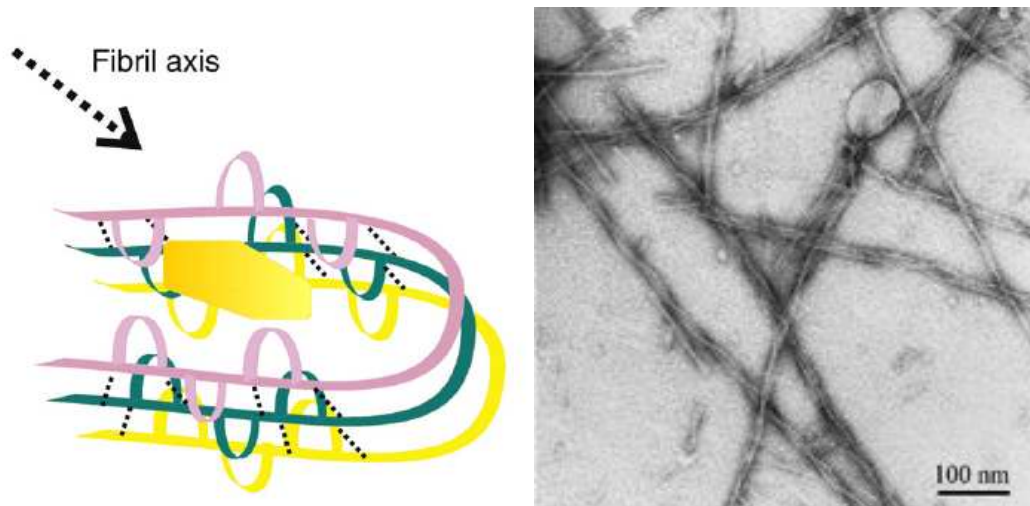
Co se týče léčby amyloidóz, doposud nejsou ustálena žádná mezinárodně uznávaná kritéria přiměřené odpovědi na zvolenou léčbu. Buď se sledují koncentrace, např. monoklonálního imunoglobulinu v séru či klonální expanze, nebo je možné hodnotit funkci postiženého orgánu. Produkce fibril či jejich složení má rozdílnou etiopatogenezi u jednotlivých typů a je proto nutné každý typ ovlivňovat jiným terapeutickým zásahem (Kisilevski *et al.*, 2001). Cílem léčby všech typů amyloidóz je jednak zlepšení poškozených orgánů a jednak zmenšení či zastavení tvorby amyloidogenních peptidů (Adam & Vorlíček, 2001).

Tabulka 1. Chemická klasifikace amyloidóz (upraveno podle Bull.WHO, 1993).

Typ amyloidu	Prekurzorový protein	Distribuce	Klinické příznaky
AL	lehké řetězce Ig	systemová	primární systemová amyloidóza, amyloidóza spojená s myelomem
AH	těžké řetězce Ig	systemová	amyloidóza spojená s chorobou těžkých řetězců
AA	apo SAA	systemová	reaktivní (sekundární) amyloidóza, familiární středozevní horečka, Muckle-Wells syndrom
ATTR	transtyreтин	systemová	familiární amyloidová kardiomyopatie (Dánsko)
AApo1	apolipoprotein-A1	systemová	familiární amyloidová polyneuropatie (Iowa)
Agel	gelsolin	systemová	familiární amyloidová polyneuropatie (Finsko)
Abeta2m	beta-2 mikroglobulin	systemová	amyloidóza vznikající při dialýze
Abeta	beta protein prekurzor	mozek	Alzheimerova nemoc, Downův syndrom, hereditární mozkové krvácení s amyloidem
Acys	cystatin-C	mozek	hereditární mozkové krvácení s amyloidem (Island)
Asc	proteinový prekurzor skrapie	mozek	spongiformní encefalopatie, včetně kuru a Creutzfeldovy-Jakobovy nemoci
AANF	atriální natriuretický faktor	srdce	izolovaná amyloidóza srdce
AIAPP	"islet associated peptide"	pankreas	amyloidóza ostrůvků pankreatu
Alys	lyzosym	systemová	diabetes mellitus 2. typu
Afib	fibrinogen A-alfa	ledviny i systemová	hereditární systemová amyloidóza nezpůsobující polyneuropatii hereditární renální amyloidóza

3. Struktura amyloidových proteinů

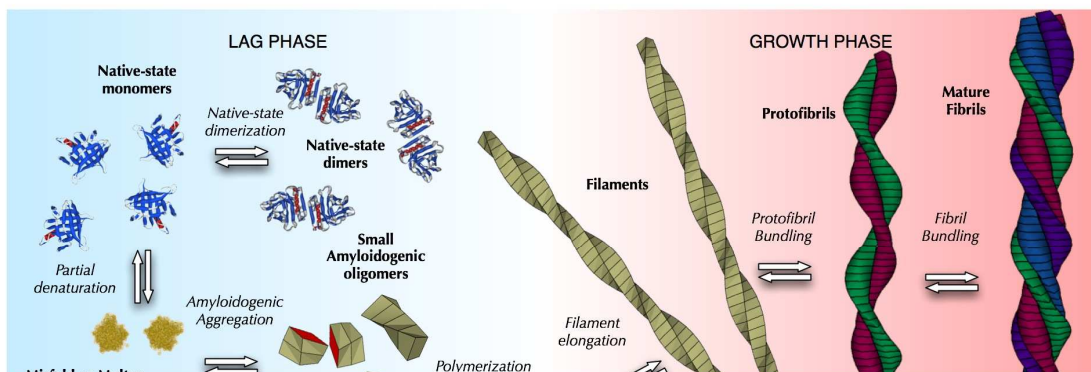
Struktura amyloidových proteinů přirozeně vychází ze struktury prekurzorů z kterých následně amyloidová depozita vznikají. Pro amyloidové fibrily, z nichž každá se skládá ze dvou filament, je typické uspořádání v β strukturu skládaného listu s antiparalelním průběhem filament (Strejček, 1995) (obr. 2). Toto uspořádání, které může být znázorněno rentgenovou krystalografií, je zodpovědné za ultrastrukturální, tinkční a optické vlastnosti amyloidu. Vizualizací pomocí elektronového mikroskopu lze u amyloidu prokázat nevětvené fibrily (obr. 2) o průměru 8–10 nm, jejichž proteinové složení je pro každý typ amyloidu specifické a je přirozeně závislé na typu prekurzoru, resp. principu vzniku.



Obrázek 2. Příklad β strukturálního uspořádání filament amyloidových fibril (vlevo) (převzato z Chang *et al.* 2008) a vizualizace nevětvených amyloidových fibril (vpravo) (zdroj – internet).

Všechny typy amyloidu mají společnou tzv. P komponentu (AP), která je složena z deseti glykosylovaných polypeptidových podjednotek, tvořících dvě pentamerní matice pootočené proti sobě o polovinu jednotky. AP tvoří jakýsi tmelící prvek spojující fibrily v kompaktní hmotu. Tato hmota tvoří 5–15 % amyloidových depozit. Fyziologicky má tento protein v organismu pozitivní vliv spočívající v ochraně buněčného chromatinu před působením protilátek, virů a bakterií. Váže se, pravděpodobně prostřednictvím Ca^{2+} , na buněčnou membránu bakterií a kvasinek (Strejček, 1995). Sérový amyloidový protein (SAP) využívaný pro tvorbu amyloidových depozit má delší poločas přežívání v plazmě a pro jeho vazbu na amyloidové fibrily je nezbytná přítomnost glykosaminoglykanů. Bylo experimentálně prokazováno, že SAP-knockoutové myši mají výrazně vyšší hladiny autoprotilátek (antinukleární protilátky – ANAb, protilátky proti bazální membráně glomerulů – antiGBM) a častější výskyt infekčních komplikací (Pepys, 1998). Kromě těchto dvou základních složek (fibrily a P komponenta) se na formaci amyloidových depozit podílejí ještě apolipoproteiny (především ApoE a ApoJ) a glykosaminoglykany (především heparan-sulfát). Ty mají vliv na přeměnu solubilních prekurzorů do nerozpustných fibril a podporují tím uspořádání do formace β skládaného listu. Současně se předpokládá ještě existence dalšího faktoru – AEF (amyloid enhancing factor). Jde pravděpodobně o lyzozomální proteázu neutrofilních leukocytů nebo makrofágů, jejíž přesné složení není známo. Doposud se tato látka získává extrakcí z amyloidových depozit a na její aktivitu by mohly mít vliv i některé růstové faktory (pro

granulocyty – G-CSF či pro makrofágy – M-CSF) (Yokota *et al.*, 1998). Přesný mechanismus amyloidogeneze není jasný, ale předpokládá se, že probíhá způsobem znázorněným na obr. 3. Na vzniku amyloidu se může dále významně podílet tvorba a kinetika amyloidových prekurzorů, kdy u většiny amyloidóz nalézáme jejich zvýšenou tvorbu. Není však prokázána přímá a jednoduchá závislost mezi závažností vyvolávajícího procesu, množstvím amyloidových prekurzorů a vznikem amyloidózy (Schreinberg & Benson, 1980). Dalším momentem může být mutace v genu, který kóduje vznik daného prekurzoru. Takto patologicky změněné bílkoviny jsou obtížně degradovatelné z důvodu chybného prostorového uspořádání a v důsledku toho snáze tvoří agregáty fibril a následně depozita amyloidu (většina familiárních forem amyloidóz).



Obrázek 3. Obecný princip vzniku amyloidových fibril. Převzato z Giurleo & Malaga, 2008.

ERROR: ioerror
OFFENDING COMMAND: image

STACK: