

Amyloid a amyloidosy

Autor: Prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc.

Části textu týkající se neuropatologie amyloidos, zejména prionových onemocnění redigoval MUDr. Radoslav Matěj, PhD (Oddělení patologie a národní referenční laboratoř TSE - CJN, FTN Krč)

I. Amyloid a amyloidogeneze

II. Typy amyloidos podle molekulárního složení a podle distribuce

- Systémové (generalizované) amyloidosy
- Topicky omezené (orgánové) amyloidosy
- Senilní a doposud biochemicky neurčené amyloidosy

III. Srovnávací hledisko amyloidos

Použité zkratky:

A β P - amyloid beta protein; **AEF** - amyloid enhancing factor; **AH** - amyloid heavy chain; **AL** - amyloid light chain; **ANP** - atrial natriuretic protein; **ApoA1/2/4 (ApoAI/II/IV)** - apolipoprotein A; **APP** - amyloid precursor protein; **β 2MG** - β -2-microglobulin; **Bri** - Bri protein; **Cal** - calcitonin; **CJD** - Creutzfeldt-Jakob disease; **Cys** - cystatin; **ECM** - extracellular matrix; **FAD** - familial Alzheimer's disease; **FAP** - familial amyloid polyneuropathy; **FFI** - Fatal Familial Insomnia; **Fib** - fibrinogen; **GAG** - glykosaminoglykany; **Gel** - gelsolin; **GPI** - glycosyl-phosphatidylinositol; **GSS** - Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease; **IAPP** - islet amyloid precursor protein; **Ins** - insulin; **Ker** - keratoepithelin; **Lac** - lactoferrin; **Lys** - lysozyme; **m.w.** - molecular weight; **Med** - medin; **MHC** - main histocompatibility complex; **MIDD** - monoclonal immunoglobulin deposition disease; **NFT** - neurofibrillary tangles; **OMIM** - Online Mendelian Inheritance in Man; **PHF** - paired helical filaments; **PrP** - Prion protein; **PS 1/2** - presenilin 1/2; **SAA** - serum amyloid A protein; **SAP** - serum amyloid P component; **Sgl** - semenogelin; **TGF β -1** - transforming growth factor β -1; **TTR** - transthyretin

I Amyloid a amyloidogeneze

Amyloidní fibrila

Amyloid je patologická fibrilární forma proteinu v β struktuře (struktuře skládaného listu). Ke vzniku amyloidu dochází agregací původně solubilní (degradovatelné) formy proteinu s primárně nebo sekundárně výrazně zastoupenou β strukturou do formy fibrilární (resistentní na degradaci).

Polypeptid složený do struktury skládaného listu je v extendované neboli rozvinuté či napřímené konformaci. Stabilizace nastává především interakcí mezi jednotlivými polypeptidickými řetězci. Dochází tak, na rozdíl od α helixu, kde stabilizace probíhá uvnitř šroubovice, nejen k intramolekulární interakci mezi vzdálenými částmi polypeptidického řetězce, ale i k intermolekulární agregaci mezi jednotlivými proteiny.

Vzniklé fibrily se skládají z β úseků kde jednotlivé řetězce jsou navzájem uspořádány antiparalelně a leží kolmo na dlouhou osu vlákna. Od nich je odvozen alternativní název amyloidos - *β fibrilosis*. Existuje řada pozorování svědčících pro existenci protofibril (viz. dále). Fibrily jsou velmi resistantní na proteolysu a jejich degradace je tedy velmi omezená (viz. níže).

Mechanismus vzniku amyloidu

Podmínkou vzniku amyloidu je narušený životní cyklus proteinu se vznikem abnormálního přechodného mezičlánku s β strukturou, náchylného k fibrilární agregaci. Podle současných představ vzniká tento amyloidogenní mezičlánek buď ve fázi vzniku nebo ve fázi degradace amyloidogenního proteinu. V dnešním pohledu je přítomnost β struktury (varianta sekundární struktury) pro vznik amyloidní fibrily esenciální. Podle toho existují proteiny primárně náchylné za určitých podmínek k fibrilární agregaci (viz. níže), zatímco jiné proteiny se stávají amyloidogenními až po indukci β konformace (viz. priony). Agregace proteinu do amyloidní fibrily je tedy fyzikální proces, vznikající jako následek různých poruch v životním cyklu proteinu a to od stavu jeho zrodu do fáze jeho degradace a který odráží jeho abnormální konformaci. *Amyloidosis lze tedy definovat jako abnormální biologické stavy vedoucí k optimálním podmínkám pro spuštění zmíněného fyzikálního procesu vytváření amyloidních fibril. Tyto poruchy se týkají vždy jednoho proteinu.* Jejich povaha je doposud známa jen částečně. Mutace amyloidogenního proteinu proces vzniku amyloidu významně urychluje.

Z dosavadních pozorování vyplývá, že může jít na jedné straně o poruchy v procesu sekrece, ať již látky standardně secernované exocytosou (viz. např. atriální natriuretický hormon, kalcitonin a další) nebo uvolnění amyloidogenního peptidu z buněčné membrány proteolytickým zásahem (ectodomain shedding) s jeho následnou fibrilární agregací převážně nebo výlučně v bezprostředním okolí sekreční buňky. Takto lze nahlížet např. na cerebrální amyloidy na basi APP (viz. níže). *V každém případě lze předpokládat, že v této skupině amyloidosis jsou amyloidogenní proteiny secernované* (pro možnou výjimku viz amyloid na basi cytokeratinu). Zákonitosti agregace do fibril jsou jen zčásti známy. Poněkud stranou stojí skupina amyloidosis na basi prionů. Vznik amyloidu je zde vysvětlován změnou konformace α -> β interakcí normálního prionu (α) s patologickým prionem (β).

Dále je to velká skupina *amyloidosis generalizovaných (systémových)*, u kterých dochází k fibrilární agregaci cirkulujícího secernovaného amyloidogenního proteinu (SAA, TTR, AL, lysozym, apoAI, fibrinogen, viz níže) v mnoha tkáních. V patogeneze těchto stavů může hrát roli několik faktorů izolovaně nebo v kombinaci. Jednak jde často o zvýšenou koncentraci amyloidogenního proteinu v séru (viz dále SAA, β 2MG, AL), danou nedostatečným vylučováním amyloidogenního proteinu (viz β 2MG) nebo jeho hyperprodukcí (SAA, AL). Samotné zvýšení koncentrace amyloidogenního proteinu v extracelulární tekutině však není pravděpodobně hlavním faktorem. *Velmi důležitou roli v molekulární patogenezi generalizovaných amyloidosis hraje zřejmě abnormální finální proteolysa amyloidogenního proteinu v tkáních, která vede doposud nejasným způsobem k optimálním podmínkám pro fibrilární agregaci celé molekuly amyloidogenního proteinu (nebo jeho fragmentů) v pericelulárním prostoru tkání a to ve značné vzdálenosti od buněk produkujících amyloidogenní protein nebo zodpovědných za jeho abnormální degradaci. To znamená, že oproti fyziologické (neamyloidogenní) cestě s předpokládanou kompletní degradací kritického amyloidogenního proteinu v lysosomech, je předpokladem vzniku systémové amyloidosis vznik bloku lysosomální degradace s nástupem alternativního mechanismu, jehož podstatu*

neznáme. Lze předpokládat, že by byla porucha omezena na daný amyloidogenní protein a že paralelní lysosomální katabolismus jiných proteinů probíhá nerušeně.

Teprve touto fibrilární agregací se stává porucha morfoloogicky postřehnutelnou. Pokud by se porucha, např. defektní degradace spojená s regurgitací, týkala neamyloidogenního proteinu, jehož fragmenty neagregují do struktur vyššího řádu (amyloidních fibril, nebo jiných fibrilárních struktur), změny by probíhaly v morfoloogicky málo postřehnutelné nebo nepostřehnutelné formě (viz amyloid u Alzheimerovy nemoci).

Finální proteolytické mechanismy pro hlavní zmíněné amyloidogenní proteiny (viz níže) však nejsou dostatečně známy. Předpokládá se, že hlavním degradujícím elementem jsou zejména elementy mononukleárního fagocytárního systému. Nakolik jde o výlučnou intracelulární degradaci v endosomálním systému nebo zda k proteolyse může dojít též (nebo výlučně?) v extracelulárním prostoru (secernovanými proteasami?) není známo. Role lysosomálního systému v amyloidogeneze všech typů je stále nejasná.

V patogenetickém řetězci, vedoucím k deposici amyloidu hraje důležitou roli *faktor urychlující vznik amyloidu (amyloid enhancing factor: AEF)*. K objevu tohoto faktoru vedly klasické pokusy s vyvoláním generalisované amyloidosy opakovanými injekcemi kaseinu myším (indukce SAA, viz níže) kdy po iniciální, několikátýdenní lag fázi nastává fáze deposice amyloidu. Jde o biochemicky doposud nedokonale definovanou látku, připravenou extrakcí tkání postižených amyloidem (nezávisle na typu amyloidogenního proteinu). Je indukována v makrofázích. V tkáni se objevuje 24 - 48 hodin před deposicí amyloidu. Po intravenózní aplikaci AEF (nebo makrofágů z tkání pokusně vyvolávané amyloidosy) dochází k urychlené deposici amyloidu bez iniciální lag fáze. Tento faktor byl připraven i z tkání myší dědičně rezistentních na indukci amyloidosy. Podle některých údajů je AEF glykoprotein o nízké molekulové hmotnosti s výrazným zastoupením β struktury a významnou schopností asociace s řadou molekul. *V experimentu měly tuto vlastnost pouze fragmentované fibrily amyloidu (testováno s SAA amyloidem), nikoliv testované průvodní komponenty amyloidu (SAP, GAG). Tyto amyloidní fibrily tak zřejmě představují nukleační centra vzniku amyloidu, která indukují precipitaci a fibrilární agregaci mechanismem přirovnávaným k prionosám. Pozoruhodné je, že vedle i.v. aplikace došlo k indukci amyloidosy i po podání zmíněného preparátu amyloidních fibril i při podání per os.*

U všech shora uvedených faktorů nutno předpokládat významnou účast *lokálních faktorů určujících, kde k deposici amyloidu v tkáních dojde a jaký bude distribuční charakter amyloidosy*. Ani při generalizovaných amyloidosách není nikdy generalizace úplná. Lze předpokládat, že místa deposice nemusí být identická s místy produkce amyloidogenních fragmentů. Rozdíly v postižení tkání mohou být značné, dokonce existují i rozdíly postižení uvnitř populace buněk stejného typu (např. adipocytů). Je všeobecně uznáváno, že jednou vzniklé ložisko amyloidu působí jako *nukleační faktor* (templát) pro další deposici (odpovídá to i shora uvedeným poznatkům o povaze AEF)

Obecnější zákonitosti lokalizace amyloidních deposit nejsou známy. Znalosti v této oblasti jsou pouze empirické. V minulosti byly amyloidosy rozlišovány podle toho, zda deposice začínala v oblasti basálních membrán a retikulárních vláken (tzv. periretikulinový typ). Šlo o deposici v oblasti malých artérií, arteriol, sinusoid a žil, propagující se v dalším průběhu do parenchymu. Za významné bylo považováno postižení intimy cév, zejména glomerulárních kapilár. Z tehdy definovaných forem amyloidosy šlo o sekundární povšechnou amyloidosu (dnes SAA). Takzvaný perikolagenní typ deposice byl charakterizován začátkem v adventicii cév (artérií i žil), v intersticiu ledvin (ne v glomerulech) a v oblasti sarkolemy srdečního a hladkého svalu a v nervech okolo Schwannových buněk. Sem byla řazena amyloidosa u mnohotného myelomu, tzv. primární amyloidosa (dnes AL) a neuropatické formy. Toto dělení se dnes již nepoužívá vzhledem k značné variabilitě distribuce. Navíc je deposice i u perikolagenní formy ve významném vztahu i k basálním membránám uvedených lokalizací.

Další (koprecipitované) komponenty - nespecifické součásti amyloidních deposit.

Mezi nejvýznamnější patří sérový amyloidní protein P (SAP), glykosaminoglykany, apolipoproteiny a některé další komponenty, deponující se nezávisle na typu amyloidu. Jako častá komponenta řady amyloidů byl prokázán ApoA1, což může způsobit rozpaky v diagnostice. *Přítomnost koprecipitovaných komponent naznačuje, že vznik amyloidu je provázen celou řadou velmi významných dalších lokálních procesů indukovaných amyloidogenním procesem.*

SAP je objemný komplex, skládající se ze dvou pentamerních jednotek. Jde o endogenní kalcium dependentní lektin, jehož nejlépe známými ligandy jsou β -galaktosa a fosfoethanolamin (z dalších lze jmenovat DNA, fibronektin a glykosaminoglykany). SAP je normální komponentou ECM. Je přítomen v elastických vláknech a v glomerulární basální membráně. Jeho funkce v těchto lokalizacích není známá. Primární struktura SAP je do značné míry homologní s tzv. C reaktivním proteinem. Podle současných znalostí je degradován pouze v játrech. Jeho poločas v plasmě je okolo 14 hodin.

Vazba iontu vápníku podmiňuje resistenci SAP na proteolytickou degradaci (která je možná jen v nepřítomnosti kalcia). Protože SAP je integrální součástí všech typů amyloidů (včetně cerebrálních u Alzheimerovy nemoci), přenáší zřejmě proteolytickou resistenci i na amyloid. Charakter SAP reaktivního ligandu amyloidu není znám. Rozvolnění této vazby je cílem moderních terapeutických studií. Vazba SAP na amyloid je možná nejen v průběhu fibrilární agregace, ale také dodatečně na preexistující fibrily amyloidu, čehož se využívá k diagnostice amyloidu *in vivo* (aplikace radioaktivně značeného SAP a sledování jeho vychytávání). SAP je v amyloidu v intaktní formě.

Experimentální amyloidosa (vyvolaná kaseinem) v myších s vyřazeným genem pro SAP probíhá pomaleji. Absence SAP nevedla sama o sobě k detekovatelným změnám.

Z glykosaminoglykanů je to zejména *heparan sulfát* (odpovídající *perlecanu*, typu deponovanému v extracelulární matrix, nikoliv na buněčné membráně). Jde o nekovalentní vazbu. Jejich kvantum je odhadováno na 1-2% hmoty amyloidu. Heparan sulfát byl prokázán ve všech typech amyloidu a to včetně amyloidů cerebrálních. Patogeneticky důležitou komponentou je pravděpodobně *apolipoprotein E*. V případě cerebrální neuronální amyloidosy na basi APP je přítomnost některých isoform apoE (zejména apoE4) považována za významný rizikový faktor rozvoje Alzheimerovy nemoci (viz níže). Z dalších komponent je to *a1 antichymotrypsin*. V amyloidních placích Alzheimerovy nemoci byla

Následky deposice amyloidu

O následcích deposice amyloidu pro biologii tkáně je známo velmi málo. Více méně tradičně se předpokládá interference se zásobením krví a transportem mezi buňkou a kapilárou.

Empiricky je znám vliv na propustnost basální membrány glomerulů pro proteiny (masivní proteinurie), který je běžným projevem renální amyloidosy postihující glomerulus.

Mechanismus toxického působení amyloidu na tkáň není stále zcela jasný. Amyloidní β protein Alzheimerovy nemoci, aplikován experimentálně do mozku, je toxický pro neurony mnohem více ve formě fibrilární než ve formě amorfni. Stále větší počet studií však ukazuje, že za toxicitu jsou obecně odpovědný solubilní, oligomerní (prefibrilární) agregáty.

Degradace amyloidu.

Amyloidosy jsou progresivní stavy, terapeuticky velmi obtížně ovlivnitelné, s výjimkou odstranění vyvolávající příčiny, pokud je toto možné. Příčina resistance na proteolysu je pravděpodobně mnohočetná. Hlavní příčinou je kompaktnost fibrilární struktury. Nově se však uvádí, že k resistenci na proteolysu významnou měrou přispívá přítomnost vysoce komplexní *molekuly SAP* (serum amyloid protein P). Vzniklý amyloid neindukuje makrofagickou fagocytární reakci. Lze předpokládat extracelulární proteolysu secernovanými proteasami, která je však významně inhibována přítomností SAP (viz shora). Pro možnost pomalé spontánní degradace svědčí úbytek amyloidu vzniklého na podkladě $\beta 2$ mikroglobulinu u hemodialysovaných pacientů při renálním selhání po transplantaci ledvin. To naznačuje existenci určité rovnováhy mezi tvorbou a degradací amyloidu *in vivo*.

Nemožnost indukovat degradaci amyloidu *in vivo* je limitujícím faktorem terapie amyloidosy. Prioritním požadavkem terapie je proto vyloučení příčiny, možné zejména u klasických sekundárních povšechných amyloidos na basi SAA proteinu. Pokud je příčinou mutace proteinu produkovaného játry, byla situace řešena transplantací jater, např. u familiární ATTR. Pozoruhodné je, že úbytku amyloid β proteinu v mozkových placích u Alzheimerovy nemoci bylo dosaženo aktivní nebo pasivní imunizací proti tomuto proteinu i přes existenci hematoencefalické bariery a to jak experimentálně na myším modelu, tak i u prvních pacientů. Existuje předpoklad, že protilátka namířená proti solubilnímu prekursoru může působit proti procesu agregace do fibril. Nelze do budoucna vyloučit terapeutické využití Kongo červeně pro její schopnost molekulárně interagovat s amyloidní fibrilou a potencionálně snižovat její stabilitu.

Průkaz amyloidu a jeho specifikace

Diagnostika amyloidu má dva stupně, zcela analogicky jako u onemocnění spojených s depositací krystalů :

1. *Fysikální* průkaz amyloidu - průkaz amyloidní β fibrily
2. Průkaz *biochemické* povahy - amyloidogenního proteinu

*ad1. Průkaz fyzikální specifiky amyloidu se opírá o průkaz fibrily složené z v konformaci β struktury. Je k tomu využíváno látek, jejichž molekula má k β doménám fibrilárně agregovaného proteinu afinitu. U nejpoužívanější techniky využívající Kongo červeně se nehodnotí barevný efekt vazby, tak jak je tomu běžně v histochemii. Hodnotí se indukovaný (nebo výrazně zesílený) **dvojlom** polarisovaného světla (vlákna amyloidu mohou primárně slabý dvojlom vykazovat) a **dichroismus**.*

Tyto efekty jsou měřitelné díky pravidelné adsorpci molekul barviva (nejspíše prostřednictvím vodíkových vazeb) na povrch amyloidních fibril. Asymetrická β struktura indukuje dva zmíněné optické efekty v polarizovaném světle: dvojlom a dichroismus. Barvivo tento efekt zesiluje a umožňuje jej měřit ve viditelném světle. *Dichroismus* je definován jako schopnost absorbovat část viditelného spektra polarizovaného světla. Dichroická látka se tedy může stát barevnou ve světle polarizovaném, pokud je v běžném nepolarizovaném světle bezbarvá. *Dvojlom* polarizovaného světla je známou schopností krystalických látek měnit směr výsledného hlavního vektoru vnikajícího polarizovaného světla na směr jiný.

Podle Bubise a Wolmana je fenomen zeleného zbarvení amyloidu Kongo červení závislý do značné míry na síle řezu. Zelený dichroismus je vázán na průměrnou sílu řezu 5-10 μ . Řezy slabší (1-2 μ) a silné (okolo 20 μ) zelený dichroismus amyloidu nevykazují. U tenkých řezů jde tón více do modré, u silných řezů více do žluta, oranžova a u nejsilnějších do červena (negativní dichroismus). Významnou roli hraje rozdílné zpomalení paprsku červeného světla při průchodu řezem (detaily viz Histochemie 4:351-356,1965).

Vazbu Kongo červeně lze velmi citlivě detekovat fluorescenčně, protože molekula barviva sama je dosti silný fluorogen. Jako nejvhodnější je doporučována sada filtrů pro detekci fluoresceniisothiocyanatu (abs. max. 495; emise max. 525), méně pro rhodamin (abs. max. 555; emise 580). Výsledek je nutno vždy kontrolovat s dichroismem, aby byla vyloučena nespecifická vazba Kongo červeně (t.j. vazba nevedoucí k dichroismu). Metody používající jiné fluorogeny (Thioflavin T a S) jsou považovány za citlivé, ale méně specifické (není kontrola analogická dichroismu).

Fibrilární struktura je výtečně znázornitelná *elektronovým mikroskopem*. Jde o fibrily nejčastěji 8-10 nm silné, nevětvené, vytvářející různě hustou plst'. Fibrily se skládají z protofilament 2.5 - 3.5 nm silných spirálně se obtáčejících. Jejich počet v jedné fibrile amyloidu může kolísat podle výchozího amyloidogenního proteinu. Šíře fibril tak může kolísat. Maximální šíře byla popsána u TTR (13 nm), minimální u fibril kalcitoninového amyloidu (5-6 nm).

Pro průkaz amyloidu *in vivo* lze použít scintigrafie s radioaktivně značeným SAP, využívající jeho vysoké afinity k deponovanému amyloidu, jehož je integrální součástí (viz níže). U zdravých kontrol je aplikovaný SAP rychle degradován a degradační produkty vyloučeny močí. Vzácně má amyloidem prostoupený orgán dosti příznačný nález při echografii. Je známý obraz "jiskření" (sparkling) v dvojrozměrném echokardiogramu u amyloidosy srdce (stejný obraz byl popsán u Fabryho nemoci).

Přechodem k detailnější klasifikaci již prokázaného amyloidu bylo empirické pozorování inhibice zbarvení Kongo červení preoxidací řezu permanganátem. Šlo zejména o amyloid na basi AA proteinu (sekundární povšechná amyloidosa, viz níže). Tato sensitivita však byla prokázána i u amyloidu na basi β 2MG (viz. níže). V současné době je tato metoda plně nahrazena imunohistochemickým průkazem.

Obr. 1. Různý stupeň infiltrace jaterní tkáně amyloidem.

Obr. 2. Tumoriformní amyloid plíce. Základní struktura plic je zcela setřena infiltrací amyloidem.

Obr. 3. Ultrastrukturální obraz amyloidu. Hustá síť nevětvených fibril

Obr. 4. Deposita amyloidu v barvení Kongo červení. Indukce dichroismu

ad2. Biochemická a imunohistochemická specifikace amyloidu prokazuje proteinový stavební kámen. Dnes v tomto smyslu dominuje imunohistochemie průkazem molekulárně specifického epitopu. Ideální pro detekci je nefixovaná tkáň (kryostatové řezy). Konvenční formaldehydová fixace a zalití do parafínu snižuje možnost imunohistochemické detekce. Za dobře imunohistochemicky prokazatelné v rutinních parafinových řezech se považují amyloid

na podkladě SAA a $\beta 2$ mikroglobulinu. Detekce AL ve fixovaném materiálu je méně spolehlivá. Dalším důvodem snížené spolehlivosti detekce AL imunohistochemickou cestou je značná přirozená variabilita N terminálních úseků lehkých řetězců (jejich variabilní domény).

Pro imunohistochemický průkaz amyloidů je doporučeno vystavit parafinové řezy koncentrované mravenčí kyselině (nebo alkalickému guanidinu) před vlastní detekcí. Jde o empirický postup, který se osvědčil zejména při imunodetekci cerebrálních amyloidů. Kongofilie je tímto postupem zrušena.

Určité problémy může způsobit výraznější příměs koprecipitovaných komponent, zejména z třídy apoproteinů, které jsou v některých případech známy jako stavební kameny amyloidu, jindy jako koprecipitované komponenty, např. Apoprotein A1. Není také dostupná metoda, která by určila, zda je daný protein agregovaný do amyloidní fibrily nebo přítomný pouze jako koprecipitující komponenta. Teoreticky lze připustit, že by v amyloidní fibrile mohly být sdruženy fragmenty dvou různých amyloidogenních proteinů. Doposud byla přesvědčivě prokázána kombinovaná amyloidosa z ApoAIV a transthyretinu (viz. dále) v odlišných fibrilách.

Obr. 5. Průkaz amyloidogenního proteinu imunohistochemicky (renální SAA amyloidosa) a současně koprecipitující SAP komponenty

Obr. 6. Immunohistochemický průkaz tří typů amyloidní infiltrace myokardu.

Amyloidogenní protein se může akumulovat zčásti i v nefibrilárním (amorfním) stavu

Na tento stav můžeme pohlížet jako na *stav preamyloidní* (nebo prefibrilární), pokud dojde postupem času k fibrilární agregaci, nebo jako na *stav paramyloidní*, t.j. amyloidu histologicky podobnému, ale trvale nefibrilárnímu (historický termín). Výrazná preamyloidní nefibrilární deposice amyloidogenního proteinu je známa u *cerebrální amyloidosis na podkladě amyloid β proteinu* a to v tzv. difusních placích (viz. níže). Předpokládá se, že postupem času může pod vlivem řady faktorů do fibril agregovat. V difusních placích se dá detekovat pouze imunohistologicky. Kongo červeně a thiazinová barviva, tedy barviva s molekulární afinitou k β fibrile dávají negativní výsledek. Stále více prací referuje o přítomnosti nefibrilární formy amyloidogenního proteinu vedle formy fibrilární. Odpovídá to koncepci vzniku amyloidu. Pokud nedochází k fibrilární agregaci chybí asociované komponenty (SAP a další, viz shora).

Amyloid β protein byl popsán v nefibrilární formě v kosterním svalu myši s vyřazeným apoE genem jako součást membránového systému sarkomerických inklusí ve vláknech typu II. Pravděpodobně zde nedochází k následné konversi na amyloid.

Nejvýraznější nefibrilární deposice amyloidogenního proteinu vzniká v případě *imunoglobulinů*. Za paramyloidní stav jsou považována jejich amorfní (nefibrilární) deposita, rámcově zvaná *onemocnění z deposice monoklonálních imunoglobulinů* (MIDD - monoclonal immunoglobulin deposition disease). I u nich byly popsány přechody do amyloidosy. Podrobněji jsou zmíněna níže.

Priony (viz dále) se též akumulují do značné míry v nefibrilární formě v mozcích u prionových onemocnění (viz amyloidosa na basi prionů).

Prionový protein byl též popsán v inklusích (spolu s amyloid β proteinem) u tzv. inklusní myositidy (myopatie), patogeneticky nejasného svalového onemocnění starších lidí.

Obr. 7. Schema základních etap procesu amyloidogeneze

Zvláštní postavení mají tzv. *paired helical filaments* vznikající v neuronech CNS z tau proteinu, normálně asociovaného s mikrotululy, tvořící podklad neurofibrilární degenerace neuronů (NFT, neurofibrillary tangles, viz níže). Jejich fyzikální vlastnosti jsou identické s amyloidem: barví se Kongo červení, jejíž vazba indukuje zelený dichroismus a jsou nerozpustné. Pouze elektron mikroskopický obraz je od klasických amyloidních fibril odlišný. Jde o zkroucené tubuly, složené z hyperfosforylovaného tau proteinu (viz cerebrální amyloidosy).

Velmi podobné, ne-li strukturálně a fyzikálně identické intracelulární inkluse vznikající v řadě buněčných typů mimo neurony v procesu stárnutí, např. Biondiho tělíska v ependymu a v epitelu plexus chorioideus (viz senilní amyloid).

Kombinovaným použitím imunohistochemického přístupu s barvivy znázorňujícími fyzikální stav se tak lze vyjadřovat ke stupni assemblace amyloidogenního proteinu do fibril.

II Typy amyloidos podle molekulárního složení a podle distribuce

Amyloidosa není klinicko patologická jednotka - *jde o obecný patologický fenomén*, vznikající na bási celé řady poruch. Svou obecností a charakterem je srovnatelný s analogickým procesem krystalizace organických či anorganických látek, známým z humánní patologie. Symptomatologie amyloidosy má široké rozmezí od projevů pouze v subklinické úrovni až po rychle progredující fatální stavy. Je určena rychlostí deposice a lokalizací amyloidu, jeho působením na tkáň a případně i příznaky základního onemocnění, v jehož rámci k deposici amyloidu došlo.

Presentace amyloidos je možná podle dvou základních hledisek: podle distribuce (klinicko patologický obraz) a podle amyloidogenního proteinu. Na tomto místě bude kladen větší důraz na amyloidogenní protein a na poruchu, která k jeho fibrilární agregaci vedla. Dalším významným hlediskem je dělení na získané a geneticky podmíněné amyloidosy. Geneticky podmíněné formy jsou charakterizovány dominantním přenosem, pomalou progresí a variabilní penetrancí. Jde o heterozygotní stav s mutací na jedné alele. Druhá alela může nebo nemusí vykazovat mutaci v příslušném proteinu. V případě homozygotního stavu lze předpokládat závažnější průběh amyloidosy.

Čím dále tím více se však ukazuje, že velmi důležitou roli hrají *genetické faktory*. Jde především o skupinu amyloidos přenosných geneticky, na podkladě mutace řady amyloidogenních proteinů, které mohou mít za následek změněné odbourávání a tím i případně zvýšenou amyloidogenicitu (viz níže). Jde o dominantní způsob přenosu s klinickou manifestací v dospělosti bez predikovatelného stupně penetrance. Genetická porucha struktury amyloidogenního proteinu může být i příčinou narušeného zpracování v průběhu jeho syntézy a intracelulární fáze životního cyklu (viz např. gelsolin a neuronální amyloid β protein). Genetické polymorfismy zřejmě hrají roli i v případech SAA a AL reaktivních

amyloidosis a mohly by vysvětlit, proč dochází ve skupině se stejným základním onemocněním k amyloidose jen u některých pacientů (viz níže). Zvýšená amyloidogenicita se může projevit až za patologických stavů při zvýšené produkci a obratu.

Postavení hematoencefalické bariery. U povšechných viscerálních amyloidosis je bariera neporušena a chrání mozkovou tkáň od deposice amyloidu. Jedinou výjimkou mohou být oblasti, ve kterých bariera vytvořena není. Jde o stopku hypofyzy a locus coeruleus. Produkce amyloidogenního proteinu na obou stranách bariery vysvětluje současný výskyt amyloidu v mozku i viscerálně, jako je tomu v případě poruchy TTR a cystatinu C dalších (viz níže). V některých případech je postižena takřka selektivně stěna mozkových cév se sekundárním narušením funkce hematoencefalické bariery (viz tzv. kongofilní cerebrální angiopatie). V poslední době se však otevřela otázka transportu fragmentů amyloidogenního proteinu přes hematoencefalickou bariéru (viz Alzheimerova nemoc)

Obr. 8. Zjednodušené schéma amyloidosis podle distribuce deponovaného amyloidu.

K současnému datu je známo spolehlivě 24 amyloidogenních proteinů:

1. sérový amyloidní protein A (SAA)
2. lehké řetězce imunoglobulinů
3. těžké řetězce imunoglobulinů
4. transthyretin (TTR, prealbumin)
5. β 2 mikroglobulin
6. gelsolin
7. lysozym
8. ApoA1
9. apoA2
10. ApoA4
11. cystatin C
12. fibrinogen (α řetězec)
13. amyloid prekursorový protein (APP)
14. priony (PNRP)
15. BRI protein
16. amylin
17. kalcitonin
18. atriální natriuretický peptid (ANP)
19. medin (derivát laktadherinu)
20. prolaktin
21. laktoferin
22. keratoepithelin
23. semenogelin 1
24. cytokeratin

Poznámka. V literatuře je započítáván i exogenní injekčně aplikovaný insulin, vytvářející amyloid v místě aplikace.

Tento výčet je s velkou pravděpodobností nekompletní, neboť stále jsou publikována sdělení o amyloidu, který se nepodařilo imunohistochemicky specifikovat.

Na základě rozsáhlých studií lze uzavřít, že *β fibrilární (amyloidní) transformace některých proteinů* (typicky TTR, viz níže) *probíhá kontinuálně s věkem a to naprosto převážně zcela subklinicky*. Nakolik jde o výraz genetického polymorfismu klinicky zdravé populace není známo. Faktem je, že v celé řadě orgánů u lidí staršího věku byly popsány izolované fibrilární agregace různých proteinů (viz níže senilní amyloidosy). V následujícím textu jsou popsány amyloidosy, které jsou projevem klinicky manifestního chorobného stavu.

Systémové (generalizované) amyloidosy

Amyloid na basi sérového AA (amyloid associated) proteinu (SAA). SAA patří do skupiny HDL apolipoproteinů. Jde o reaktant akutní fáze, produkovaný v játrech po stimulaci makrofagickými cytokiny. Byla však prokázána jeho produkce i jinými buněčnými typy. Jeho koncentrace u zánětlivých stavů se může zvýšit během několika hodin řádově až 1000x. Váže se na HDL a zvyšuje jeho vazbu na makrofágy v zánětlivých ložiscích, čímž potencuje významně transport cholesterolu sekvestrovaného v zánětlivých ložiscích do jater.

Jde obecně o proces konstitucionální sekrece hepatocyty (viz. kapitola o sekreci), jejíž intenzita je regulována především na transkripční úrovni. U člověka existují 3 transkripčně aktivní geny a jeden pseudogen. Pouze SAA 1 a 2 reagují v akutní fázi zánětu. SAA 3 je nepřepisovaný pseudogen, SAA 4 je trvale produkován jen v basálním množství. Transkripční regulace SAA1 a SAA2 je v dnešní době velmi detailně prostudována a zahrnuje komplexní interakce interleukin-responsivních transkripčních faktorů. Transkript i SAA1 protein byly prokázány i v lidských makrofázích, údajně i v adipocytech a dalších buňkách, ale v podstatně menší míře. Maximum syntesy je v hepatocytech.

Amyloidogeni je pouze SAA1, který je však v populaci poměrně polymorfní. Existují pozorování, podle kterých amyloidogenicitu významně zvyšují některé genetické polymorfismy vedoucí ke zvýšené nestabilitě proteinu a jeho precipitaci do fibril.

S vývojem SAA amyloidosy je spojena *zvýšená* sérová koncentrace SAA. V SAA amyloidu se kumulují neglykosylované N-terminální části o mol. hmotnosti 6-9 kD (v průměru 76 aminokyselin, ale i delší a kratší). Významnou příměs může tvořit i kompletní molekula SAA (mol. hmotnost přibližně 12 kD, obsahuje 104 aminokyselin). V patogenezi hraje zřejmě důležitou roli degradabilita SA proteinu v makrofázích, které představují hlavní degradační elementy.

U myšího kmene s vrozenou resistencí na vyvolání experimentální amyloidosy vykazovaly makrofágy vysokou kapacitu degradace SAA, oproti kmenům vnímavým, u kterých byla kapacita degradace podstatně nižší.

Amyloidosa na basi SAA je prototypem sekundární generalizované amyloidosy. Postihuje celou řadu vnitřních orgánů, zejména ledviny, GIT, slezinu, nadledviny s výjimkou CNS. K poruše degradace SA proteinu a k jeho fibrilární agregaci dochází při chronických zánětech, zejména při rheumatoidní artritidě a některých maligních nádorových procesech. Jde však pouze o malé procento výskytu, naznačující, že ve hře jsou další faktory. Byla popsána i jako forma primární. Doposud však nebyla u člověka popsána primárně geneticky podmíněná varianta. Prototypem experimentálně indukované SA amyloidosy je amyloidosa, vyvolaná opakovanou aplikací kaseinu.

SA amyloid však provází některé geneticky podmíněné poruchy, avšak jako sekundární komplikace. Jde o

- tzv. středomořskou horečku. Její gen byl nedávno identifikován. Kóduje protein, který je pravděpodobně transkripčním faktorem, regulujícím transkripci genů tlumících zánětlivou reakci
- Muckle-Wellsův syndrom (familární amyloidní nefropatie s urtikárií a hluchotou)
- další jsou podrobně zmíněny v práci J.N. Buxbauma: The systemic amyloidoses. Curr Opin Rheumatol 16, 67, 2003)

Amyloid na basi prealbuminu (transthyrethrinu) ATTR (TTR transthyrethrin).

Prealbumin je normální komponentou plasmy (název má od postavení na elektroforeogramu plasmatických bílkovin před albuminem). Název transthyretin pochází od toho, že funguje jako přenašeč hormonů štítné žlázy a retinolu (trans - thyr - retin). U zánětů se jeho koncentrace snižuje (nazývá se také negativní protein akutní fáze).

TTR je produktem jediného genu, není glykosylován a je značně polymorfní. Normálně je ve formě homotetrameru. Monomer má významně zastoupenou β strukturu (Obr.1). Asi 90% proteinu je produkováno játry (konstituční sekrece na vaskulárním pólu), zbytek v plexus chorioideus (sekrece do mozkomíšního moku) a v sítnici (sekrece do sklivce). Poločas v plasmě je poměrně krátký (1.5 - 2.5 dne). Degradován je z větší části v hepatocytech, méně ve svalové tkáni a v kůži. Vychytávání je na podkladě receptorově zprostředkované endocytosy.

Pro zahájení tvorby amyloidní fibrily je nutná disociace tetrameru na monomery za podmínek mírné denaturace při sníženém pH. Naopak amyloidogenicitu TTR významně v experimentu *in vitro* snižovala vazba tyroxinu, která stabilizuje tetramer a brání jeho disociaci a následným konformačním změnám.

Vznik amyloidu významně zvyšují mutace v primární struktuře proteinu, podmiňující zvýšenou konformační nestabilitu při denaturaci. V současné době je známo několik desítek mutací, které různou měrou zvyšují amyloidogenní potenciál. Stav spojený s deposicí TTR lze rozdělit na získané a geneticky podmíněné.

Mezi *získané* patří tzv. *senilní amyloidosa srdce*, zjištělná u 25% lidí nad 80 let věku, která může vést k mírné formě kardiomyopatie. I za takto mírnou formou se však může skrývat mutace TTR. Amyloidní fibrily se skládají z intaktních molekul TTR ve směsi s menšími peptidovými fragmenty.

Geneticky podmíněné TTR amyloidosy mají autosomálně dominantní přenos. Maximum deposice TTR amyloidu je v periferních nervech a v myokardu, méně v ostatních tkáních. Postižení ledvin bylo popsáno, převážně však v oblasti dřeně. Vzhledem k výraznému postižení nervů je známá pod názvem *familiární amyloidní polyneuropatie (FAP)*. Opakovaně byla popsána klinicky závažná leptomeningeální amyloidosa a deposice amyloidu ve sklivci, pravděpodobně jako následek syntézy TTR epitelem plexus chorioideus a sítnicí. Ke klinické manifestaci dochází v nižším věku. Jsou známy akcelerované průběhy s manifestací ve druhém nebo třetím deceniu. Hladina TTR v plasmě je snižena.

Přidatná (mimojaterní) místa syntézy TTR jsou nejspíše příčinou trvajících produkce mutantního TTR u případů léčených transplantací jater.

U geneticky podmíněných TTR amyloidos s mutací v heterozygotním stavu je to směs normálních a mutantních forem proteinu.

Amyloid na basi lehkých řetězců imunoglobulinů (AL amyloidosa, A=amyloid, L= lehké řetězce)

Pozn. k fyziologii Ig. Popis syntesy sekrece Ig molekuly je zcela mimo rámec tohoto textu. Zčásti odkazují na základní charakteristiky tohoto procesu, zmíněné v kapitole sekrece, týkající se problému kompletace molekuly Ig jakožto nezbytného předpokladu pasáže sekretorickou cestou. Pokud jde o degrační procesy v obratu Ig (volného nebo po vazbě na antigen) je detailních studií velmi málo. Lze předpokládat, že degradace Ig probíhá intracelulárně v lysosomálním systému mononukleárních fagocytů, do kterých se dostává receptorově zprostředkovanou endocytosou (přes Fc receptor). O možné extracelulární proteolyse Ig není známo nic. Lehké řetězce Ig (kapa a lambda) patří mezi proteiny velmi bohaté na β řetězce, což přispívá k jejich potenciální amyloidogennosti. Základní schéma molekuly Ig a jejich amyloidogenních částí je na Obr. 2.

Stavy vedoucí k deposici imunoamyloidu jsou charakterisovány přítomností abnormálního klonu B lymfocytů, produkujícího monoklonální Ig. Jde buď o klon *nádorový* (nejčastěji jde o mnohotný myelom, nebo obecně o sekrečně aktivní imunocytom) nebo *nenádorový* (tzv. primární generalisovaná AL amyloidosa charakteru MGUS - monoclonal gamopathy of undetermined significance).

Biochemická analýza AL amyloidu ukázala přítomnost *N-terminálních částí lehkých řetězců (variabilních úseků) nebo jejich fragmentů*, vzácně celých lehkých řetězců (tedy variabilní i konstantní části, viz Obr. 2). Ukazuje se, že k amyloidose vede dvakrát častěji typ konfigurace lambda než kappa. Významným predisponujícím faktorem k fibrilární agregaci kritických amyloidogenních fragmentů Ig je také syntéza nekompletní molekuly Ig. V séru (a v moči) pacientů jsou pak prokazatelné samotné monoklonální lehké řetězce (variabilní a konstantní části), známé pod historickým názvem Bence Jonesův protein (BJP) (objevil ho r. 1845 Dr. Henry Bence Jones). *Tento abnormální produkt je vysoce rizikovým faktorem v dalším rozvoji nemoci.* Jeho patogenita závisí na možnosti jeho další agregace (kovalentní přes SS můstky, ale zřejmě i nekovalentní), indukující dimerisaci. *Vzájemná afinita lehkých řetězců podmiňující stupeň jejich agregace závisí na charakteru složení variabilních částí.* Jednak jde o variabilitu primární, odrážející strukturu antigenního epitopu (podklad idiotypové variability). Touto primární fyziologickou variabilitou se lehké řetězce diametrálně odlišují od jiných, molekulárně uniformních, amyloidogenních molekul, např. transthyretinu (viz shora). Dále se ukazuje, že záměny aminokyselin v dalších úsecích (podmíněné zárodečnými nebo somatickými mutacemi) vedou ke snadné destabilizaci terciární struktury a k agregaci, na jejímž konci je fibrila amyloidu. Jde o komplementární úseky (CR1-3) a o úseky mezi ně vmezené (FR - framework regions). Lze tedy předpokládat i geneticky podmíněnou predisposici ke vzniku imunoamyloidu. *Tyto skutečnosti jsou vysvětlením poměrně nízké incidence amyloidosy u mnohočetného myelomu, která je odhadována pouze na 10-15%.*

Vysokou asociaci s imunoamyloidem vykazuje Asp50 (v oblasti CDR2), Asp31 (v oblasti CDR1) a obzvláště náhrada prolinu v pozici 40 aminokyselinou hydrofobního typu v konservované vmezené FR2 oblasti. Jsou určité předpoklady, že existují další posttranslační modifikace zvyšující amyloidogennost lehkých řetězců, jako třeba stupeň jejich glykosylace. Není rovněž známo, nakolik jsou lehké řetězce v depozitech amyloidu modifikovány proteolysou.

Přítomností cirkulujících přímých prekursorů se patogenese imunoamyloidu odlišuje od předchozích generalisovaných amyloidos, u kterých cirkulují v krvi kompletní normální nebo mutované molekuly prekursorů amyloidu (viz SAA a TTR amyloidosu). Ani u

imunoamyloidu však nelze vyloučit možnost vzniku amyloidogenních fragmentů proteolysou kompletní monoklonální molekuly Ig v periferních tkáních.

Patogeneticky významná jedinečnost cirkulujících fragmentů lehkých řetězců Ig u případů s AL amyloidosou byla prokázána experimentálně. Myšim byly injikovány monoklonální lehké řetězce izolované z močí pacientů s AL amyloidosou a bez AL amyloidosy. Mnohem výraznější amyloidosa s deposicí převážně intaktních použitých lehkých řetězců byla vyvolána užitím BJP z pacientů s amyloidosou, zatímco v případě moče pacientů bez amyloidosy byly výsledky zcela rudimentární.

Opakovaně byly popsány imunocytohy s monoklonální gamapatií a rozsáhlou intracelulární deposicí fibrilárně uspořádaných lehkých řetězců. Část intracelulárních deposit bylo v endoplasmatickém retikulu a v membránových systémech náležejících sekretorické cestě, část v makrofázích a v lysosomálním systému celé řady buněčných typů. Interpretace těchto výjimečných nálezů je obtížná (viz níže).

AL amyloidosa je známa jako *forma generalizovaná a forma lokální tumoriformní*. Distribuce u *generalizované formy* je povšechná. Agregace do fibril probíhá prakticky ve všech orgánech, s výjimkou CNS. Maximum deposice je v ledvinách, myokardu, slezině, nadledvině, může být v játrech, plicích, ale i v měkkých tkáních (kůži, kloubech, karpálním tunelu). Bývá makroglosie. Může být postižen periferní nervový systém.

Forma lokální (tumoriformní) se vyskytuje v řadě orgánů (např. hrtan, plíce, gastrointestinální trakt, ale i mozek). Nikdy nelze zcela vyloučit, zda nejde o projev současně probíhající generalisaci amyloidosy

Amyloidogenní fragmenty Ig mohou agregovat alternativním, neamyloidním způsobem. Jedním z nich, velmi běžným, je agregace BJP ve formě *hyalinních válců resp. proteinových krystalků* v renálních tubulech, vedoucí k tzv. myelomové nefrose na podkladě nefrohydrosy. Tato agregace předpokládá přesycení resorpčního mechanismu v proximálních tubulech a precipitaci s Tamm-Horsfalovým glykoproteinem v distálním nefronu.

Další alternativní deposicí je amorfni generalizovaná deposice monoklonálních lehkých řetězců Ig (zejména typu kappa) v neamyloidní amorfni formě. Svým výrazně hyalinním vzhledem však amyloid připomíná. Maximum deposice je v basálních membránách. Barvení Kongo červení je však negativní. V elektronovém mikroskopu jsou deposita amorfni, filamentosní (bez β struktury) nebo mikrotubulární. Od amyloidu je odlišuje, vedle negativy v barvení Konžskou červení, též absence sérového amyloid P proteinu. Pro tato deposita byl v historii použit název *paramyloid*. Vzhledem k tomu, že ve výjimečných případech byla prokázána deposice celého Ig, tedy i těžkých řetězců je tento stav nazýván "*onemocnění z deposice monoklonálních imunoglobulinů*" (monoclonal immunoglobulin deposition disease, MIDD). Spojení agregace amorfniho typu a typu fibrilárního bylo popsáno u několika pacientů a svědčí o existenci dalších, pravděpodobně lokálních tkáňových faktorů, které se podílejí na typu výsledné agregace. Agregace Ig nastává za těchto stavů generalisovaně.

V nefropatologii spadá MIDD do širší kategorie fibrilárních/mikrotubulárních glomerulopatií (Kongo negativních), které mohou být součástí generalizovaného postižení. Tyto procesy jsou nepochybně heterogenní co do patogenese a rozlišování je stále závislé na morfologii deposit, na kterou zde nelze zacházet (viz literatura).

Obr. 9. Varianty osudu monoklonálního imunoglobulinu (jednoho z lehkých řetězců)

Poslední známou variantou osudu monoklonálního Ig je stav spojený s jeho excesivní a prakticky kompletní endocytosou makrofágy (zejména v okolí nádorových ložisek). Proto mezinárodně užívaný název "crystal storing histiocytosis" (i když o krystaly vždy nejde). Velmi často se na endocytose podílí celá řada dalších buněk, takže jde pak o generalizovaný proces. Takovýto stav lze popisně nazvat generalizované lysosomální stádání monoklonálního Ig. V lysosomech endocytovaný protein v krystalické, amorfni nebo fibrilární formě. Fibrily jsou odlišné of fibril amyloidních.

Obr. 10. Monoklonální gamapatie (Ig kappa). Endocytosa proteinu dermálními histiocyty

Za toho stavu dochází také k toxickému poškození tubulárních funkcí ledvin endocytovaným monoklonálním imunoglobulinem, zejména v oblasti proximálních tubulů. Může dojít až k nekrose.

Obr. 11. Varianty ultrastruktury lysosomálních deposit endocytovaných monoklonálních Ig

Obr. 12. Typy postižení ledvin u monoklonální gamapatie

Imunoamyloid na basi fragmentů těžkých řetězců Ig (AH - amyloid heavy chain) jako kontrast k AL - amyloid light chain). Doposud byly popsány zcela ojedinělé případy. U jednoho z nich šlo o těžkou renální amyloidosu u starší pacientky s deposicí fragmentu těžkého řetězce IgG v mesangiu glomerulů.

Amyloidosa na basi β 2 mikroglobulinu ($A\beta$ 2MG). β 2MG je ubikviterní protein lokalizovaný na buněčném povrchu všech buněk v těsné funkční s molekulami MHC I komplexu. Nejde o transmembránový protein. Patří do kategorie malých proteinů (m.w. okolo 12 kDa). Má výrazně zastoupenou β strukturu. Má konstantní hladinu v extracelulární tekutině. Za normálních okolností je vylučován ledvinami. Amyloidní agregace β 2MG nastává za stavů trvale zvýšené sérové koncentrace, což nastává prakticky pouze u dlouhodobě dialysovaných pacientů. Příčinou je skutečnost že neprochází póry hemodialyzační membrány a následně se hromadí v extracelulární tekutině. Tím vznikají, vzhledem k významné přítomnosti β konformace, předpoklady pro vznik amyloidu. Podle dostupných studií jde asi o 10%-30% výskyt u dlouhodobě hemodialysovaných pacientů.

β 2MG amyloidosa má poměrně typická predilekční místa deposice. Jde především o synovii, chrupavky (kloubní a meziobratlových destiček) a kostní tkáň. To vede ke klinickému obrazu spondylartropatie, syndromu karpálního tunelu, často i osteolytických ložisek (nodulární kostní deposita amyloidu). Predisponujícím faktorem je zřejmě přítomnost chondroitin sulfátu, který v experimentu *in vitro* významně katalysoval fibrilární agregaci β 2MG. Viscerální lokalizace může být rozsáhlá, ale většinou je subklinická. Postiženy jsou především cévy. Na deposici β 2MG amyloidu je pozoruhodně resistantní slezina. Depositata amyloidu obsahují intaktní β 2MG (jako dimer), ale popsány byly i zčásti degradované formy. Tinkčně a ultrastrukturálně jsou depositata typická. Amyloid je citlivý na kalium permanganátovou preoxidaci.

Amyloidosa na basi lysozymu (ALys). Doposud bylo popsáno jen několik případů. Jde o generalizovanou amyloidosu, podmíněnou geneticky (autosomálně dominantní přenos). Bývají masivně postižená zejména játra. Mutace v enzymovém proteinu (Ile56Thr nebo Asp67His) způsobuje jeho destabilizaci a fibrilární agregaci. Výsledky analyzy složení

amyloidu u heterozygotů ukázaly, že se do fibril agreguje pouze intaktní mutovaný protein (nikoliv protein normální).

Amyloidosa na basi α řetězce fibrinogenu (AFib). α řetězec je největší ze všech tří řetězců fibrinogenu. Je tvořen 610 aminokyselinami. Amyloidosa na basi tohoto proteinu je známa pouze v dědičné formě. Přenos je autosomálně dominantní. Postihuje celou řadu vnitřních orgánů (játra, slezinu, nadledviny), zejména však ledviny (je také zvána hereditární renální amyloidosa), kde masivně postihuje glomeruly. Periferní nervový systém není postižen. V depozitech amyloidu u heterozygotní mutace byla prokazatelná pouze mutantní forma proteinu.

Amyloidosa na basi cystatinu C (ACys). Cystatin C je inhibitorem cysteinových proteás (kathepsinů B, H a L). Jde o neglykosylovaný polypeptid o 120 aminokyselinách. Je produkován celou řadou buněčných typů, včetně monocytů. Je přítomen ve všech tělních tekutinách, včetně cerebrospinálního likvoru (koncentrace 6.5 mg/l). Mutantní cystatin C je enormně náchylný k dimerisaci, která je ireversibilní, vede k afunkčnosti proteinu a usnadňuje fibrilární agregaci. Amyloid obsahující degradační produkty mutantního proteinu se deponuje generalizovaně. Jde o systémovou amyloidosu s postižením řady orgánů i mimo oblast jejich cévní sítě. Po diagnostiku je využívána kůže, ve které je depozice prokazatelná v oblasti basálních membrán okolo kožních adnex, okolo adipocytů a ve stěně cév. Masivně jsou však postiženy meningeální a cerebrální cévy, což je podkladem cévních ruptur a mozkových hemorragií. Jednotka byla nazývána *hereditární cerebrální amyloidová angiopatie - islandský typ* vzhledem k topice příznaků. Výstižnější je biologický termín *systémová amyloidosa na basi cystatinu C*. V neuropilu k depozici amyloidu nedochází (může být však přítomna nespecifická depozice amyloid β proteinu, úměrná věku).

Monocyty pacientů vykazovaly v tkáňové kultuře sníženou sekreci cystatinu C, což by mohlo vysvětlit jeho sníženou hladinu v extracelulární tekutině

Cystatin C se však může sekundárně akumulovat v depozitech amyloid β proteinu u Alzheimerovy nemoci. Přítomnost cystatinu C byla dále popsána v intraneurálních inkluzích buněk předních rohů míšních u amyotrofické laterální sklerozy.

Amyloidosa na basi ApoAI (AApoAI). ApoAI je kvantitativně nejvíce zastoupený apoprotein třídy HDL. Jde o protein o 243 aminokyselinách, produkováný enterocyty, hepatocyty a celou řadou dalších buněk. Mutantní protein je poměrně vysoce amyloidogenní. Depozice amyloidu je generalizovaná, s maximem v ledvinách (časté je renální selhání), játrech a srdci (bývá fatální kardiomyopatie) a ve slezině. V ledvinách bývá maximum depozice mimo glomeruly. Velmi často se popisuje kožní depozice amyloidu (difusní nebo papulární). Též postižení laryngu bylo opakovaně popsáno. Běžně se nazývá non-neuronopatická dědičná generalizovaná amyloidosa, i když postižení periferních nervů bylo opakovaně popsáno. Postižení se manifestuje již v heterozygotním stavu (autosomálně dominantní přenos) a může se manifestovat v mládí již od druhého decenia). V amyloidu byl ve všech doposud studovaných případech přítomen N terminální úsek mutantního proteinu, obsahující přibližně 80 aminokyselin a to i v amyloidních depozitech u heterozygotů (divoký protein, produkt divoké alely, na amyloidose neparticipoval). U pacientů s renálním a kardiálním selháním se osvědčila transplantace.

Divoký protein se deponuje v aortální intimě a je spolu s medinovou amyloidosou v medii aorty (viz amyloidosa na basi medinu) podkladem aortální amyloidosy závislé na věku.

Amyloid se deponuje zčásti ve formě difusní, zčásti ve formě mikronodulární. Existují náznaky, že by ApoA1 intimální amyloid mohl vykazovat vazbu na stupeň aterosklerosy. Deposice amyloidu na basi ApoA1 (N terminální části proteinu) byla prokázána i meniscích kolenního kloubu jako izolovaný proces. Amyloidní agregace divokého proteinu ApoA1 je podkladem plicní amyloidosy psů.

Amyloidosa na basi Apo AII (AApoAII). Jde o geneticky podmíněnou amyloidosu, postihující ledviny a myokard. Zdůrazňuje se postižení cévní stěny v mnoha orgánech. Doposud byly popsány ojedinělé případy.

Amyloidosa na basi Apo AIV (AApoAIV) nebyla zatím popsána v samostatné formě. Amyloid na této basi byl nedávno popsán jako součást kombinované amyloidosy (kodeposice u ATTR) u velmi staré ženy. Oba amyloidy se deponovaly nezávisle. Nešlo o mutantní proteiny.

Amyloid na basi gelsolinu (AGel). Gelsolin je protein regulující růst filamentosního aktinu (aktinu F). Obecně je považován za jednoho z regulátorů motility buněk. Defekt je provázen sníženou buněčnou motilitou. Hlavním místem jeho působnosti je tedy cytosol. Vedle toho však existuje sekreční forma gelsolinu, jejíž funkcí v plasmě je ochrana před aktinem uvolňovaným z rozpadlých buněk, který by spontánně excesivně polymerizoval. Obě tyto formy jsou alternativním produktem jediného genu. Jedna z forem si uchovává signální peptid a přechází do sekreční dráhy buňky (sekreční, sérová forma), druhá zůstává v cytosolu. Normální koncentrace sérového gelsolinu je okolo 220 µg/ml. Cytoplasmatický gelsolin je produkován celou řadou buněčných typů, zejména buňkami svalové tkáně.

Amyloidosa na basi gelsolinu je autosomálně dominantní onemocnění s rohovkovou dystrofií a polyneuropatií, počínající většinou jako paresa horní větve lícního nervu. Amyloid se za těchto okolností ukládá v rohovce, v nervech a v některých dalších orgánech. Převládá deposice v basálních membránách cév. Vzhledem k autosomálně dominantnímu přenosu je i heterozygotní stav klinicky manifestní. U homozygotů bývá postižení závažnější. Tato forma amyloidosy patří k prozatím nejlépe probádaným na molekulární úrovni. U gelsolinové amyloidosy (finská familiární amyloidosa) je hlavním patogenetickým momentem mutace v oblasti proteinu, která je společná oběma jeho uvedeným variantám. Sekreční varianta je však v průběhu sekrečního procesu díky mutaci, odkrývající nová štěpná místa, odlišně proteolyticky zpracována. Tím je vyštěpen právě amyloidogenní úsek 71 aminokyselin, který agreguje do amyloidních fibril. Tímto abnormálním proteolytickým zpracováním musí vzniknout i deficit protektivní funkce sérového gelsolinu. O případné dysfunkci mutantní cytoplasmatické isoformy nejsou přesvědčivé doklady.

Gelsolin byl imunohistologicky prokázán v neuronálních Lewyho těliscích.

Topicky omezené (orgánové, izolované) amyloidosy

Jde o stavy charakterizované deposicí amyloidu, jehož stavebním kamenem je transmembránový glykoprotein (ev. jeho sekreční forma), endokrinně aktivní polypeptid nebo průvodní peptid sekrečního granula. Společným rysem je lokální charakter amyloidu. Fibrily amyloidu jsou deponovány v pericelulárním prostoru buňky produkující amyloid. Za významný podpůrný faktor se považuje nadměrná stimulace k sekreci amyloidogenního

proteinu, případně jeho více amyloidogenní molekulární varianty a přítomnost látek podporujících fibrilární agregaci. Určitou výjimkou v této skupině jsou prionové amyloidy, které jsou však výrazně topicky omezené na CNS. Patří se zdůraznit, že i amyloidy projevující se standardně generalizovaně mohou mít lokální izolovanou variantu, jak to bylo opakovaně popsáno u AL amyloidosy. Vysvětlení proto chybí, nutno však předpokládat, že monoklonální Ig je efektivně agregován do amyloidních fibril v okolí patologického klonu B lymfocytů.

Cerebrální amyloidosy (neurocentrické a angiocentrické) na bázi tzv. cerebrálního amyloidního prekursorového proteinu (APP). Tyto amyloidosy jsou topicky omezené na mozkovou tkáň, přesto, že kritický amyloidogenní protein je ubikviterní.

APP je transmembránový protein, produkt jediného genu (lokus je na 21. chromosomu). Jeho struktura odpovídá membránovému receptoru. Skládá se se z 695-770 aminokyselin. Variabilita je dána sestřihovými variantami, s vystřižením exonů 7, 8 a 15 v různé kombinaci (obr. 4).

Terminologie: APP amyloid prekursor protein, APP_{695/751/770} isoformy APP s uvedenou délkou aminokyselinového řetězce, sAPP sekretorická forma APP proteinu, AβP amyloid β protein (též βA4 kde číslovka odráží mol. hmotnost 40 kD), AβP₁₋₄₃ informace o maximální délce řetězce. Čísla udávají počet aminokyselin (zde maximální), P3 je fragment fyziologické cesty štěpení α sekretasou (jde o fragment AβP₁₇₋₄₂) APP₆₉₅ (vystřiženy exony 7 a 8) je považován za typickou neuronální isoformu. APP_{751/770} isoformy jsou převážně koncentrovány v nonneuronálních elementech. Jde o celou řadu tkání, např. tkáň svalovou, aortu, pankreas, leukocyty, zvláště pak α granula destiček (viz níže nexin). V mozku jsou tyto isoformy zejména silně zastoupeny v glii. Jejich sekretorická forma APP (viz níže) má neuroprotektivní a obecně neurotrofní účinek.

N konec APP a převážná část řetězce je extracelulární, na C konci je krátký transmembránový úsek zakotvený do buněčné membrány. Do cytoplasmy ční jen nepatrný terminální C úsek. Protein má několik funkčních domén. *Kritickým amyloidogenním úsekem je pericelulární úsek, tvořený 39-43 aminokyselinami, zčásti zakotvený do buněčné membrány, nazývaný přímo "amyloid β protein" (AβP).*

V písemnictví je zmiňováno několik dalších variant AβP. Tzv. *appican* je sestřihová varianta, s navázaným řetězcem chondroitin sulfátu (sestřihová varianta s vystřiženým 15. exonem). Takto vzniklý variantní produkt APP představuje proteoglykan. Je ubikviterní, v mozku však byla jeho produkce prokázána pouze v astrocytech.

Nexin II je varianta APP obsahující jednu z variabilních domén APP, tzv. Kunitzův proteasový inhibitor, KPI). Jde o sekretorickou variantu výše uvedených isoform APP_{751/770}. Má charakter proteasy, přítomné v celé řadě tkání, včetně mozku. Má důležitou roli v hemokoagulaci. Je bohatě zastoupen v α granulích krevních destiček.

Funkce APP. V neuronech hraje transmembránový APP pravděpodobně roli v synaptogenesi v průběhu embryonálního vývoje a má nepochybně řadu funkcí, spojených s přenosem vzruchu a protekcí neuronů před inzulty nejrůznějšího druhu. Sekretorická forma je indukovaná depolarizací neuronální membrány a má zřejmě roli v přenosu vzruchu. Někteří se domnívají, že AβP moduluje, po uvolnění do extracelulárního prostoru, aktivitu receptorů. Nic není známo o funkci isoform APP v glii, ve které je bohatě exprimován, zejména ve formě asociované s chondroitin sulfátem (*appican*).

Velmi propagovaná je teorie, podle které hraje transmembránový APP roli v mezibuněčném kontaktu neuronálních i non-neuronálních buněk. Funkce APP v jiných buněčných typech je známa velmi málo s výjimkou nexinu II (viz shora).

APP byl prokázán v sekrečních granulích neuroendokrinních buněk bovinní dřeně nadledvin, tedy v buněčném sekretorickém systému velmi blízkém sekreci neuronální (viz oddíl sekrece), ve které hraje APP zřejmě velmi důležitou roli (viz níže). Dále bylo prokázáno, že APP také sehrává roli v apoptotické signalizaci.

Syntesa APP probíhá klasickým způsobem na ribosomech, pomocí signálního peptidu je translokován do endoplasmatického retikula, dále do Golgiho aparátu. V *trans-Golgi* zoně se APP transportuje jako transmembránový protein konstitucionální sekrecí na buněčnou membránu, do které je inkorporován. *V neuronech je transportován axonálním transportem do synaptických oblastí* nejen intracerebrálně, ale i do periferních nervů. Narušení axonálního transportu může mít za následek stagnaci APP v průběhu axonu. *V presynaptických oblastech je lokalizován na axolemě a participuje na recyklaci synaptických váček spolu s jejich integrálními membránovými proteiny (synaptofysinem, synaptogaminem a SV2), od kterých se má následně oddělit a putovat cetrifugálně do oblasti perikarya neuronu.* Do dendritů je transportován velmi pomalu. U sekretorické varianty podléhá parciální proteolyse sekretasami již v průběhu sekreční cesty (viz. dále).

Vedle transmembránové formy APP existuje fyziologická forma sekreční (sAPP), vznikající buď odštěpením prakticky celé pericelulární části transmembránově lokalizovaného APP nebo již v průběhu sekretorické cesty. Tato proteolytická úprava se odehrává buď *in situ* v buněčné membráně (údajně však probíhá převážně v nonneuronálních elementech) nebo k ní může dojít, jak se ukazuje, již v průběhu sekreční cesty, tedy intracelulárně (zejména v neuronech, viz. níže). Veškerá známá proteolytická úprava APP je realizovaná třemi proteasami, tzv. sekretasami (α , β , γ). Sekretasy α a β odštěpí extracelulární část APP od části zakotvené a dávají tak vzniknout sekretorickým formám. α sekretasa štěpí APP v oblasti 16. aminokyseliny A β P segmentu - zhruba uprostřed kritického amyloidogenního úseku. *Její aktivita tedy velmi dobrou prevencí vzniku celistvého amyloidogenního A β P.* Variantní "processing" β sekretasou, zejména v kombinaci s gama sekretasou vyštěpí kritický amyloidogenní A β P segment (viz. obr.13). Poměr mezi fyziologickou α úpravou a ostatními variantními amyloidogenními formami se může za různých okolností měnit. *Je známo, že A β P je konstitucionálně produkován i za normálního stavu a v malém množství prokazatelný v extracelulární tekutině, včetně mozkomíšního moku.* Jeho produkce může kolísat v závislosti na některých stresových buněčných situacích (viz. níže). APP produkovaný v CSF je možné detekovat a jeho snížená hladina spolu se zvýšením fosforylované formy tau proteinu se využívá v klinické dg. Alzheimerovy nemoci a CJD.

K fixaci amyloidogenní cesty se zvýšenou produkcí kritického A β P dochází autosomálně dominantními mutacemi v A β P proteinu (zejména v oblasti proteinu obsahujícího štěpné místo pro α sekretasou) a v presenilitech - proteinech asociovaných doposud ne zcela jasným způsobem s úpravou, transportem a cílením APP buňkou (viz. níže).

Uspokojivé vysvětlení amyloidogenní cesty na úrovni buňky však doposud chybí.

Existují pozorování, dle kterých je amyloidogenní A β P (zvláště pak delší varianta o 42 aminokyselinách) uvolněn z APP již v průběhu translokace endoplasmatickým retikulem, či Golgiho aparátem, tedy před insercí APP do buněčné membrány a nezávisle na lysosomálním systému. Současně to ukazuje, že příslušné proteolytické enzymy mohou APP upravovat již v průběhu sekreční dráhy. Je pravděpodobné, že toto předčasné uvolnění A β P může být za některých okolností vystupňováno a vést ke zvýšené sekreci amyloidogenního peptidu. Za zmínku stojí i transgenní experimenty prokazující, že změna poměru sestřihových isoform APP ve prospěch APP_{770/751} ve smyslu jejich zvýšení oproti normálnímu neuronálnímu APP₆₉₅ vedly k těžké formě AD. Změna poměru byla vyvolána cílenou mutagenesou v intronech.

Méně jasná je *role lysosomálního aparátu* v produkci A β P amyloidu. Pokud by nedošlo k úpravě transmembránově situovaného APP α sekretasou, nastoupila by sekretasa β , která by oddělila objemný N terminální konec před A β P úsekem. Ten by se pak s celým C - terminálním zbytkem molekuly spolu se zakotvující částí buněčné membrány procesem endocytosy dostal do lysosomu, kde by ho uvolnila γ sekretasa. Některé experimenty však svědčí pro přímé cílení signifikantní části APP do lysosomů již v průběhu sekreční cesty. Zákonitosti těchto procesů jsou však dosud velmi málo známe.

Fragmenty APP byly prokázány v neurolysosomech u některých lysosomálních enzymopatií spojených s tvorbou residuálních lipopigmentových tělísek (neuronální ceroidlipofuscinosa, normální neurolipofuscin - age pigment). Experimentální práce nanačující velmi obtížnou degradabilitu A β P v lysosomech, což může k fenoménu lysosomální akumulace amyloidního peptidu přispívat.

V případě cerebrální A β P amyloidosy (A β) jde obecně biologicky o spontánní proces, probíhající trvale v malé intenzitě v dospělosti a vedoucí ve stáří, zcela subklinicky, k amyloidním depositům v tzv. senilních placích a v cévách. Situace je zcela analogická progresivní deposici amyloidu v řadě jiných orgánů (viz. níže). Tento basální spontánní proces může být akcelerován celou řadou faktorů a vést tak k progresivní destrukci neuronální a cévní sítě a tím k závažným klinickým změnám, jejichž dominantním projevem je demence. Tato klinicko patologická jednotka se nazývá Alzheimerova nemoc (AD).

Alzheimerova nemoc ve formě sporadické je nejčastější příčinou demence u starých lidí. Jen asi 2-7% je podmíněno dědičnou poruchou, má familiární charakter a rychlý průběh s manifestací ve středním věku.

Odlišení subklinicky probíhajících senilních změn od subklinické formy AD na základě neuropatologických změn je nemožné, neboť veškeré degenerativní změny (viz. níže) jsou společné, takže rozlišení je v současné době možné na podkladě kvantitativních rozdílů (další podrobnosti viz. neuropatologické monografie).

Akcelerující faktory nepodmíněné geneticky. Ke zvýšené produkci A β P dochází v mozku obecně za stavů označovaných souhrnně jako buněčný stres. Jde o ischemii, stavy spojené s traumatem mozku, či energetickou deprivaci nejrůznějšího druhu, nebo o variabilní lokální faktory typu změny pH, vlivu iontů těžkých kovů, při kterých dochází k aktivaci štěpení β sekretasou. Pravděpodobně nejdůležitější jsou vlivy, které usnadňují a katalysují fibrilární agregaci nadměrně produkovaného A β P. Kumulace těchto faktorů je pravděpodobně podkladem procesu amyloidní deposice spontánně probíhající s věkem. Významným akcelerujícím faktorem je přítomnost isoform apoE4 (viz. níže). Je dobré zdůraznit, že výrazná akumulace nefibrilárního A β P byla opakovaně prokázána u velmi starých osob, u kterých nebyly za života patrné žádné známky demence.

Faktory geneticky podmíněné. Přenos je ve všech těchto případech autosomálně dominantní. Jde jednak o významné faktory modifikující a o faktory kausální, podmiňující familiární výskyt, časný vznik a fatální průběh cerebrální amyloidosy (familiární AD - FAD). K současnému datu je akceptováno 11 odlišných genetických faktorů (viz. OMIM), z nichž jsou nejprobádanější a nejvýznamnější následující.

- *Isoformy apoE* (kódovaného na chromosomu 19), zvláště pak kombinace E4/E4, považovaná za faktor usnadňující fibrilární agregaci. *Jde o faktor modifikující, nikoliv faktor kausální.*
Apo E je produkován celou řadou buněčných typů. V CNS je to astroglie, mikroglie a neurony samotné. Isoforma 4 je považována za faktor zvyšující beta konformaci A β P a usnadňující jeho fibrilární agregaci. Isoforma 2 působí v opačném smyslu.
- *mutace v lokusu APP* (lokus je na chromosomu 21), zejména v oblasti kódující A β P, v místech, kde štěpí α sekretasa.
- *trisomie 21. chromosomu (Downův syndrom).* Patogenetickým faktorem je abnormálně zvýšená produkce APP, daná triplicitou lokusu. U osob s Downovým syndromem se v pátém deceniu rozvíjí cerebrální amyloidosa se všemi rysy Alzheimerovy nemoci. V mozcích pacientů s Downovou chorobou bylo prokázáno signifikantní zvýšení transkriptu APP proti kontrolám.
- mutace v genu pro presenilin 1 (lokus na chromosomu 14).
- mutace v genu pro presenilin 2 (lokus na chromosomu 1).

Mutace zmíněných proteinů zodpovídají za 70-80% AD s časným začátkem. Průběh je velmi rychlý a fatální. Mechanismus akcelerace nemoci mutacemi v těchto proteinech není doposud objasněn.

Preseniliny jsou transmembránové ubikviterní proteiny o doposud ne zcela známé funkci. Jsou normálními konstituenty neuronálního perikarya. Presenilin 2 je zčásti homologní s presenilinem 1. Současné poznatky svědčí pro jejich úzký vztah ke sekretase v tom smyslu, že oba představují samotný enzym, štěpící intramembránové úseky transmembránových proteinů. Tím je v současnosti nahrazen původní předpoklad jejich neenzymového charakteru. Lze tedy dedukovat, že mutace v presenilinech, vedoucí k urychlené Alzheimerově nemoci, nevedou ke ztrátě katalytické aktivity, ale k převážnému vyštěpování amyloidogenního úseku v membráně neuronu. Jde *de facto* o kvalitativní poruchu sekrečního mechanismu na basi "ectodomain shedding" (viz. úvod).

Společným jmenovatelem všech stavů je v první řadě zvýšená produkce A β P, zejména řetězce o 42 aminokyselinách (A β P₁₋₄₂), vystupňovaná zejména u geneticky podmíněných forem nemoci a zejména existence faktorů, usnadňujících jeho fibrilární agregaci.

Agregace A β P do fibril je děj poměrně složitý, vyznačující se některými specifickými rysy. Jde především o chemické reakce, při nichž dochází k produkci volných radikálů a k poškození okolních buněk. Tyto průvodní chemické reakce jsou nejspíše jedním z faktorů podmiňujících toxicitu agregujícího (nikoliv již agregovaného) A β P. Pro precipitaci amyloidu a vznik mikroskopicky detekovatelných lesí je nutné vytvoření primárního fokusu (nidus) překonáním kritické koncentrace A β P, který pak působí jako nukleační faktor. Fibrilární agregace je tedy pouze jedním ze dvou fyzikálních stavů A β P, amorfního a fibrilárního. Toto je situace v patofysiologii amyloidu neobvyklá. Naznačuje, že fibrilární agregace vyžaduje v mozkové tkáni speciální podmínky (viz. též priony). Tato situace může být v patogenese amyloidos (i mimo Alzheimerovu nemoc) velmi častá. O pozitivním vlivu imunizace proti A β P na průběh Alzheimerovy nemoci je stručná zmínka v úvodu.

V extracelulární tekutině je A β P přítomen řádově v nízkých (nanomolárních) koncentracích a to jak za normy, tak u Alzheimerovy nemoci. V pokusech *in vitro* však nastává spontánní agregace A β P v koncentracích tisícínásobných. To ukazuje na nutnost existence endogenních faktorů snižujících kritickou koncentraci. Za takovéto faktory jsou považovány některé z molekul, které jsou v depozitech prokazatelné.

Pokud jde o samotný A β P, varianta o 40 aminokyselinách agreguje do fibril podstatně pomaleji než varianta s 42 aminokyselinami.

Příměsi jsou zčásti stejné jako v amyloidech obecně: sérový protein P, heparan sulfát, produkty astrocytů apoprotein E (zejména zmíněná isoforma 4), působící ve smyslu amyloidogenním, dále apo J (clusterin), opět produkt astrocytů, působící ve směru antiamyloidogenním. Dlouho známou příměsí je C1q složka komplementu (produkovaná aktivovanou mikroglíí) a acetylcholinesterasa.

Lokalizace amyloidu. Je pozoruhodné, že cerebrální amyloidosy, jakožto topicky omezené amyloidosy, mají částečně i rysy generalizované poruchy. Zvýšená produkce A β P (nikoliv fibrilární depozice) u geneticky podmíněných forem AD byla prokázána i v kultivovaných kožních fibroblastech. Tato zvýšená produkce je příčinou zvýšené koncentrace A β P v tkáňových tekutinách, včetně mozkomíšního moku za těchto stavů.

Experimentálně byla prokázána možnost transportu A β P přes hematoencefalickou bariéru jak samostatně, tak však zejména v asociaci s apoproteinem J (clusterinem). Rovněž asociován s apoE4 může být transportován přes

tuto bariéru do CNS (nikoliv v asociaci s apo E2, E3). Existuje dokonce názor, že A β P je produkován extracerebrálně, je transportován do CNS přes hematoencefalickou bariéru a v mozku precipitován do fibril.

Deposita A β P byla v serii 11 případů nalezena v kůži a ve stěvné stěně okolo cév a ve vazivu. Tato deposita měla charakter preamyloidu, t.j. vykazovala specifickou reakci s protilátkou proti A β P, ale nebyla kongofilní a tudíž ani fibrilární.

Deposice A β P amyloidu v mozku probíhá ve dvou odlišných lokalizacích: *ve vztahu k neuronální síti (neurocentricky) a v cévní stěně (angiocentricky)*. Je to zřejmě výrazem toho, že vedle neuronů, které jsou nepochybně významnými producenty A β P je A β P produkován i elementy cévní stěny mozkových a leptomeningeálních cév. Současně dochází, na rozdíl od jiných typů cerebrálních amyloidos (viz. priony) intraneuronálně k fibrilární transformaci (tau) proteinů do fibril.

1. *Neuropil šedé hmoty - neurocentrická deposice*. Hlavním producentem A β P v této lokalizaci jsou neurony. A β P se hromadí ve dvou odlišných formách.

Jednou z nich je forma *amorfní* (identifikovatelná impregnací solemi stříbra), identifikovaná nedávno, ve které se A β P ukládá buď difusně v určitých oblastech kůry nebo ve formě klasických drobných dispersních ložisek, tzv. plaků (tzv. difusní plaky). Tato ložiska nejsou detekovatelná Kongo červení ani thioflavinem S, pouze imunohistologicky. Je všeobecná tendence je považovat za prekursory plaků amyloidních.

V senilních placích jsou obecně velmi častá větší deposita APP v dystrofických neuritech jako následek narušeného axonálního transportu v degenerujících neuronech (viz. shora). V některých neuronech bylo u Alzheimerovy nemoci prokázáno hromadění APP (tedy prekursorového β proteinu) v neuronálním perikaryu, zejména v nc. basalis Meynerti.

Druhou je *forma fibrilární* s klasickými amyloidními fibrilami, vykazujícími kongofilii se zeleným dichroismem a typickou ultrastrukturou v EM. Tato forma je přítomna ve formě plaků, zvaných klasické. Plaky difusní (zvané též některými autory preamyloidní) a klasické (amyloidní) se vyskytují převážně odděleně, jejich překryv je jen částečný. Další detaily o jejich složení a vztahu k dystrofickým neuritům a neurofibrilární degeneraci neuronů přesahují rámec tohoto textu. Ve spektru variant A β P v amyloidu neuropilu dominuje A β P₁₋₄₂.

Obr. 13. Schema štěpení APP

Obr. 14. Deposita amyloid β proteinu v kortexu u Alzheimerovy nemoci

2. *Angiocentrická deposice (cerebrální amyloidní angiopatie - CAA, též kongofilní angiopatie)*. Za hlavního producenta A β P ve stěně mozkových a leptomeningeálních cév jsou považovány buňky hladkého svalstva a pericyty. U obou byla prokázána schopnost produkce APP. V amyloidních depositách cévní stěny dominují kratší formy A β P (A β P 40). Amyloid je ukládán primárně do basálních membrán. Deposice amyloidu začíná v zevní části stěny. Postihuje především leptomeningeální cévy a cévy kůry mozkové. Hluběji situované cévy v mozkovém tkáni jsou postiženy vzácně. Deposice amyloidu je provázána degenerativními změnami, oslabením cévní stěny a poruchou hematoencefalické bariéry. Jedním z nejzávažnějších projevů cerebrální amyloidní angiopatie je mozková hemoragie, většinou atypicky lokalizovaná (mimo basální ganglia). Deposice amyloidu jde společně s deposicí amyloidu v neuropilu a je tedy integrální součástí Alzheimerovy nemoci. CAA může v

některých případech výrazně dominovat (kongofilní angiopatie bez demence je prokazatelná u 60% starších lidí).

V rámci AD existuje varianta zvaná hereditární mozková hemoragie s amyloidosou - Dánský typ, představující ustálený fenotyp s naprostou převahou angiocentrických změn nad změnami neurocentrickými. Zodpovědné jsou mutace postihující 21. (glycin za alanin) nebo 22. (glutamová kyselina za glutamin) aminokyselinu A β P. Selektivní postižení cerebrálních a leptomeningeálních cév postrádá vysvětlení. V cévách mimo mozek není amyloid na bázi A β P prokazatelný.

Obr. 15. Alzheimerova nemoc. Deposice amyloid β proteinu v cévní stěně artérií

3. *Intraneuronální fibrilogenesa.* Deposice A β P amyloidu je provázena amyloidní transformací neuronálního tau proteinu (protein asociovaný s mikrotubuly). Příčinou této transformace je trvale udržovaný hyperfosforylovaný stav tau proteinu (pravděpodobně nedostatečná defosforylace či hyperfosforylace na specifických místech molekuly - např. vlivem mutací)). V tomto stavu nemůže nastat jeho fyziologická asociace s mikrotubuly. Takto hyperfosforylovaný tau protein se následně agreguje do fibril, které vytvářejí intraneuronálně tzv. párová helikální filamenta (paired helical filaments, PHF), jejichž dalším stadiem jsou NFT (neurofibrillary tangles), ve kterých jsou přítomny vedle PHF i jednoduchá filamenta. Tinkcí odpovídají PHF a NFT amyloidu - jsou kongofilní a indukovaný dvojlom má zelený dichroismus. Odpovídá to průkazu β struktury roentgenovou difrakcí.

V PHF je vedle tau proteinu přítomen dle některých autorů i A β P, α 1 antichymotrypsin, heparan sulfát, fibroblastový růstový faktor, apoE a ubikvitin. Ubikvitinace naznačuje tendenci k degradaci PHF v proteasomu. Popsána byla i neenzymatická glykosylace proteinu v PHF. Heparan sulfátu se přisuzuje významná role v katalýze ireversibilní fosforylace tau proteinu a tím nepřímo v katalýze dalších změn. Proti extraneuronálnímu amyloidu však údajně chybí SAP.

Struktura analogická NFT byla prokázána v některých nonneuronálních buňkách v průběhu procesu stárnutí (viz. senilní amyloid).

Obr. 16. Akumulace hyperfosforylovaného Tau proteinu v neuronech.

Schema vývoje změn u geneticky podmíněné Alzheimerovy nemoci

1. molekulární úroveň (primární patologické změny na úrovni DNA)

(mutace v APP genu / mutace v genu PS1, PS2, ev. v dalších genech)

převaha amyloidogenní cesty se zvýšenou sekrecí A β P (převaha β a gama sekretasy nad α sekretasou),

zejména jeho amyloidogenních variant (A β P₁₋₄₂) produkující buňky: neuron a nonneuronální buňky

ovlivnění modifikujícími faktory
(apoE isoformy, komplementem, cytokiny)



preamyloidní deposice nefibrilární AβP v neuropilu (neurocentricky, formování difusních plak) a v cévách – podle dosavadních studií probíhá ve fázi minimálního kognitivního defektu (nově zavedený termín související se zlepšenou diagnostikou)

další ovlivnění shora zmíněnými modifikujícími faktory



precipitace do fibril se současným toxickým působením na okolní elementy, zejména neuronální, vznik amyloidních plaků a intraneuronální poruchy τ proteinu s nástupem neurofibrilární degenerace a vznikem PHF, v konečném stadiu rozpad neuritů a zánik neuronu - demence

(někteří autoři předpokládají, že toxicita je vázána na intermediární stadia v tvorbě amyloidních fibril)

Amyloid na basi BRI proteinu (Aβri). Jde geneticky podmíněnou poruchu zvanou Britská familiární demence, resp. dánská familiární demence, obě na společném podkladě amyloidosy vzniklé z transmembránového neuronálního proteinu (je přítomen za normálních okolností i mimo neurony, ale tam k prokazatelné deposici amyloidu nedochází). Na tkáňové úrovni je obraz deposice a distribuce analogický Alzheimerově nemoci. Amyloid je tvořen fragmentem abnormálního BRI proteinu zvaném Aβri, kódovaném BRI2 genem. V případě dánské varianty se fragment, odlišné struktury, ale ze stejného výchozího proteinu BRI označuje Adan. V obou případech je deposice jak neuronální tak cévní.

Amyloid na basi prionů (A^{PrP}). Priony (název je odvozen od jejich infekční a proteinové povahy) jsou normální komponentou celé řady tkání, zejména tkáně nervové. Jde o proteiny skládající se primárně z 253 aminokyselin, kódované jediným genem (množné číslo znamená existenci isoform, daných posttranslačními modifikacemi: různou proteolytickou modifikací a/nebo glykosylací). Jsou produkovány jako sekretorické proteiny, resp. sialoglykoproteiny a jsou cíleny vesikulárním transportem do buněčné membrány. V neuronech putují axonálním transportem do výběžků. Maximálně jsou koncentrovány v oblasti synapsí. V buněčné membráně jsou zakotveny svým C terminálním koncem pomocí GPI (glykosylfosfatidylinositolu). Zpětným membránovým tokem při endocytose se dostávají do lysosomů a předpokládá se jejich recyklace mezi těmito kompartmenty. Jejich funkce je neznámá.

V lymfocytech se údajně zúčastní na procesu aktivace mitogeny. U myši s vyřazeným prionovým genem nebyly v průběhu pokusu zjištěny žádné podstatné funkční nebo strukturní změny CNS, projevovaly se u nich jen nevýrazné poruchy denního rytmu, poruchy spánku a poruchy paměti.

Molekula prionového proteinu se může stát patogenní (a infekční) posttranslační změnou své konformace, aniž by se změnila její primární struktura. Fyziologické priony mají minimální zastoupení β struktury (β struktura 3%, α helix 42%), zatímco u "patogenního prionu" je β struktura strukturou dominantní (43%, proti α helixu 30%, viz. též obr. 6). Změna konformace vyžaduje značné množství energie a není vyloučeno, že může být katalyzována dalším faktorem, například proteinem typu chaperonu.

Změna konformace, ale i výrazně zpomalená degradace těchto aberantních konformačních forem jsou pokládány za hlavní patogenní momenty ve skupině fatálních neurologických onemocnění souhrnně zvaných jako prionová onemocnění (prion diseases), mezi něž v lidské patologii patří Jakobova-Creutzfeldtova nemoc (a její nedávno popsaná nová varianta v souvislosti s epidemií bovinní spongiformní encefalopatie), Gerstmannův-Strauslerův-Scheinkerův syndrom, familiární fatální insomnie a kuru.

Změna konformace prionu má za následek vznik takřka absolutní resistance k proteolyse a následně progresivní akumulaci konformačně abnormální varianty prionu. Předpokládá se, že hromadění je dáno trvalou konverzí nově syntetizovaných prionů na formy resistantní za současného výrazného snížení degradability těchto forem. Mechanismus poškození tkáně patogenními priony není znám. *Poškozena je pouze nervová tkáň, přestože PrP^{Sc} jsou vždy v hostitelském organismu generalizované.*

Byla prokázána generalizace mozkovou tkání z jednoho fokusu inokulace. Kumulace prionů je pro neuron fatální. Variabilní část kumulovaných prionů se mění na amyloid.

Tento proces se by se dal přirovnat k působení krystalků kysličníku křemičitého, který je rovněž nezničitelný a trvale tkáň během svých intracelulárních pasáží destrukuje.

Terminologie: PrP = prionový protein, PrP^c (též PrP^{sen}) = normální, celulární prionový protein, sensitivní na proteolysu, PrP^{res} (též PrP^{sc}) = obecný název pro patologický prion s β konformací, resistantní na proteolysu, původně izolovaný ze scrapie (ovčí prionové encefalopatie), δ PrP = mutované formy prionů, PrP^{CJD}, PrP^{GSS}, PrP^{FFI} = alternativní název pro priony izolované z uvedených prionových nemocí, PrP^d případně jako souhrnný název prionu způsobujícího onemocnění, PNRP gen prionu.

Mechanismy vedoucí ke konverzi prionu normálního na prion infekční jsou schematicky znázorněny probrány v následujícím textu.

1. *Spontánní sporadické formy.* Jde pouze o Jakobovu-Creutzfeldtovu nemoc. Ostatní prionová onemocnění mají dědičný základ. Mechanismus vzniku sporadických forem není uspokojivě vysvětlen, pokud lze vyloučit exogenní původ a mutace v PRNP genu. Přítomnost polymorfismů M129M a E229K značí pouze zvýšenou predisposici, nikoliv kauzální vztah (jde o polymorfismy). Přítomnost homozygotní mutace M129M se hodnotí jako vysoká predisposice pro infekci PrP^{CJD}.

U sporadických případů je nutno brát v úvahu možnost fokálního vzniku patogenního prionu v jediném neuronu (např. somatickou mutací PRNP genu) s následným šířením konformační změny neuronální sítě, jak bylo prokázáno experimentální inokulací patogenního prionu do mozků experimentálních zvířat. Za zmínku stojí, že nadměrná produkce prionů, indukovaná experimentálně transfekcí divokého genu, vedla k příznakům prionové nemoci s konverzí částí prionů na β patogenní formu. Je však otázka nakolik se nadměrná produkce prionů může u sporadických lidských nemocí uplatnit. V úvahu připadá i jejich snížená degradabilita.

2. *Infekční přenos patogenního prionu* (t.j. prionem s β konformací) z člověka na člověka byl prokázán jednoznačně u kuru (na podkladě kanibalismu), a v některých případech lidské *Jakobovy-Creutzfeldovy nemoci* (iatrogenní přenos). Existuje důvodné podezření, že některé ze sporadických atypických případů této nemoci, lišících se neuropatologicky od forem klasických (více amyloidních plak podobných kuru) jsou ve vztahu k bovinní spongiformní encefalopatii (u všech postižených byl přítomen predisponující polymorfismus M129M v homozygotní formě). Ve zvířecích chovech (hovězí dobytek, ovce) je za hlavní zdroj nákazy považováno infikované krmivo (např. masokostní moučka připravená z infikovaných zvířat), ale lze předpokládat i transplacentární přenos.

Infekčnost prionů je podle všech dosavadních experimentů vázána na přítomnost normálních prionů u hostitele. Podstatou infekčnosti a toxického působení patogenních prionů obecně je v dnešním pohledu interakce patogenního prionu s prionem normálním (tvorba dimerů) vedoucí ke změně konformace hostitelského prionu. Předpokládá se nezbytný stupeň homologie mezi oběma priony, zejména při mezidruhovém přenosu, který je jinak obtížný nebo nemožný.

Myši s vyřazeným PrP genem jsou rezistentní k experimentální infekci priony. Samotná absence prionů však u nich nevede k prokázatelné neurologické a neuropatologické poruše. Ukazuje se však, že případnou mezidruhovou bariéru lze překonat způsobem inokulace, nejlépe přímou aplikací testované tkáně do mozku, zvýšením dávky či pasáží původně "cizího" prionu.

3. *Vertikální, geneticky podmíněný, přenos* mutace strukturálního PRNP genu je příčinou GSS, FFI a asi 10% případů CJD. Přenos je autosomálně dominantní s různou penetrancí. Manifestní nemoc vznikne i u nosiče jedné mutované alely prionového genu. Do dnešní doby bylo popsáno přes dvacet patogenních mutací a polymorfismů, které mají významný modifikující vliv. Není známo nic o možných homozygotních formách.

Předpokládá se, že mutantní priony jsou náchylné k spontánní patogenní β konformaci. Pokud byl studován normální protein, produkováný u nosičů druhou, nepostíženou (divokou) alelou, byla prokázána jeho nerozpustnost, ale sensitivita na proteolysu, což lze pokládat za potencionálně přechodný stav k patogenní β konformaci. Tyto nálezy by mohly vysvětlit úspěšnost horizontálního (infekčního) přenosu inokulací extraktu tkáně mozku u většiny dědičně podmíněných případů humánních prionových onemocnění (CJD, GSS, FFI) na myši a některé primáty. *Takováto současná možnost vertikálního (genetického) a horizontálního (infekčního) přenosu nemá v molekulární patologii geneticky podmíněných nemocí obdoby.*

Předpokládá se rovněž, že mutace v prionovém genu by mohly predisponovat k infekci exogenním patogenním prionem. Jedním z důvodů pro tento předpoklad je existence jinak prokazatelně patogenních mutací u klinicky asymptomatických případů (nekompletní penetrance). To vše je důvod k úvahám, zda jsou priony výhradním patogenetickým agens. Uvažuje se o viru nebo o defektním proteinu chaperonového typu.

Patogenesa tkáňových změn u prionových nemocí. V presymptomatickém stadiu dochází ke kumulaci PrP^{res} v nervových výběžcích a v synapsích. Od určitého stupně kumulace nastane regrese neuronů s jejich zánikem nebo s různými histologicky patrnými degenerativními změnami (viz. níže). Proces je lokalizován primárně v šedé hmotě, bílá hmota je postižena sekundárně jako následek neuronální degenerace. V dalším rozvoji změn dochází k různě vyjádřené precipitaci konformačně modulovaného prionu do deposit. Část prionů v placích může být přítomna ve formě amorfní, detekovatelné pouze imunohistologicky (primitivní, difusní plaky). Část plaků má priony uspořádané do amyloidních fibril s typickou tinkcí a ultrastrukturálním vzhledem. Z dosavadních pozorování se nedá jednoznačně uzavřít, zda se u geneticky podmíněných stavů podílejí na tvorbě amyloidních fibril výhradně mutantní priony, i když pro to některé nálezy svědčí. Množství amyloidu u základních variant prionových onemocnění silně kolísá. Tyto nálezy svědčí pro to, že fibrilární transformace nemusí být bezprostředním následkem konformačně změněných molekul prionů.

Patologický genotyp prionových nemocí se manifestuje třemi základními klinicko-patologickými jednotkami: *Jakobovou-Creutzfeldtovou nemocí, Gerstmannovou-Strausslerovou-Scheinkerovou nemocí a familiární fatální insomnií.* Jakobova-Creutzfeldtova nemoc, jako jediná z těchto tří má prokazatelně jak získaný (infekční), tak geneticky podmíněný vznik. Zbylé dvě byly popsány pouze jako geneticky podmíněné.

amyloidů. Jako všechny endokrinní amyloidosy je však omezen na okolí nádorově transformované endokrinní buňky.

Ukazuje se, že C buňky jsou sice hlavním, ne však jediným buněčným typem produkujícím kalcitonin. Jeho produkce byla prokázána i v hepatocytech.

Kalcitonin je kódován homologním genem β CGRP (calcitonin gen related peptide) a genem amylinu. *Gen kalcitoninu* produkuje dvě sestříhové varianty: *kalcitonin* a tzv. *α CGRP* s odlišným biologickým účinkem (jde o neurotransmitter, blíže viz. doporučená literatura). Jak kalcitonin tak jeho sestříhová varianta (α CGRP) jsou produkovány buňkami medulárního karcinomu. *Gen β CGRP* je vysoce homologní s předchozím genem. *Gen amylinu* kóduje peptid amylin (viz. níže). Oba CGRP mají charakter neuropeptidů a mají vasodilatační účinek. Spolu s amylinem se účastní regulace metabolismu glukosy s účinkem protichůdným insulinu. V C buňkách thyreoidey a v nádoru z C buněk je nejvíce exprimovaná produkce kalcitoninu a zčásti jeho isoformy α CGRP. Expres zbylých dvou genů je minimální nebo je utlumena zcela.

Amyloidosa na basi medinu (AMed). Jde o získanou amyloidosu topicky omezenou, podle současných poznatků, na svalovou vrstvu artérií. Medin (název podle výskytu v medii) je částí molekuly laktadherinu, který je produkován hladkými svaly stěny cévní, ale i dalšími buňkami mimo cévní stěnu, např. epitelem mléčné žlázy. Amyloidní fibrily složené z tohoto fragmentu se vyskytují takřka ve 100% v medii aorty starých lidí. Zvýšené množství bylo prokázáno ve stěně cévní u temporální arteriitidy. Jeho význam v patologii arteriální stěny je pravděpodobně velmi malý. Důsledky jeho deposice však nebyly doposud studovány.

Amyloid na basi laktoferinu (ALac). Laktoferin je produkován slznou žlázou a je kvantitativně výrazně zastoupeným proteinem slz. ALac byl prokázán v rohovce jako průvodní znak oční trichiasy, a některých dalších očních onemocněních, tedy jako sekundární fenomén. Predisposicí k vzniku amyloidu je mutace v příslušném genu.

Amyloid na basi semenogelinu I (ASgI) je jedním z amyloidů provázejících proces stárnutí. Jde o amyloidosu *vesiculae seminales* (semenných váčků). Zmíněný protein je hlavní komponentou sekretu žlásky. Může být provázen laktoferinem. Afekce je zcela lokální a je zcela nezávažná.

Amyloid na basi keratopithelinu (AKer). Je podstatou jedné z forem geneticky podmíněných dystrofií rohovky. Deposice amyloidu není vázána na zánětlivé procesy oka. Je podmíněna mutací v genu TGF β I (indukovaném TGF β), který kóduje protein keratopithelin. Přenos je autosomálně dominantní. Keratopithelin byl prokázán jako průvodní komponenta jiných amyloidos oka.

Amyloid na basi cytokeratinu (AKer) byl prokázán imunohistochemicky v kožních lesích typu lichen amyloidosus a v tzv. makulární amyloidose, což jsou autochtonní kožní onemocnění (ne tedy příznaky generalizovaných amyloidos !). Jde o tzv. primární kožní amyloidosu. Dále je amyloid na basi cytokeratinu prokazatelný jako lokální sekundární proces při některých kožních nádorech (trichoepiteliom, basaliom, Bowenova dermatosa a některé další) - sekundární kožní amyloidosa. Dostupné výsledky jsou doposud pouze z imunohistochemických studií. Jejich společným jmenovatelem je, že jde o typy cytokeratinu (nejčastěji CK 5) patřící do skupiny keratinů basických (skupina II).

Poznámka: Buněčná patologie této amyloidosy se liší od všech předchozích tím, že jde o extracelulární deposita amyloidogenního proteinu na basi cytoskeletálního proteinu, který není normálně secernován. Jediné srovnání je možné s amyloidem na basi gelsolinu (viz. shora), což je protein působící v cytosolu, účastní se na regulaci aktinu, u kterého však byly prokázány sestříhové sekretorické varianty. V případě sekundární kožní amyloidosy je diskutován vznik ze zanikajících nádorových buněk.

Amyloid na basi amylinu (AIAPP). Amylin (islet amyloid polypeptid) je peptidový hormon produkovaný a secernovaný spolu s insulinem β buňkami pankreatických ostrůvků. Vyskytuje se i v některých dalších úsecích GIT a v buňkách periferního endokrinního systému. Je tvořen peptidem o 37 aminokyselinách, uvolněným z prekursoru o 89 aminokyselinách. Peptid je kosegregován v sekrečních granulích s insulinem a společně s ním přechází do krve. Za normálních okolností je dále proteolyticky zpracován na menší peptidy. Jde o produkt jednoho ze skupiny tzv. kalcitoninových genů, spolu s kalcitoninem (a jeho sestřihovou variantou α CGRP) a s tzv. β CGRP (viz. shora). Svým účinkem je protichůdný insulinu (tlumí syntesu glykogenu, vstup glukosy do buněk, stimuluje degradaci glykogenu). Fysiologicky se vyskytuje v lysosomech B buněk ostrůvků spolu s insulinem. Jde pravděpodobně o výraz regulace sekrece lysosomálním systémem (krinofagie, viz. první díl skript).

Deposice amylinového amyloidu je pouze lokální. Probíhá velmi často v závislosti na věku a subklinicky. Kritickým amyloidogenním faktorem se zdá být nadměrná stimulace sekrece β buněk. Snad proto je deposice amyloidu vystupňovaná nejvíce u diabetu typu II a je pravděpodobné, že k zániku β buněk za tohoto stavu přispívá (viz. níže). Podle doposud ojedinelých studií začíná deposice amyloidu intracelulárně jednak volně v cytosolu, jednak v depositách ohraničených membránou. Byly popsány komunikace intracelulárních deposit s extracelulárním prostorem. Naprostá většina amyloidu je deponována extracelulárně. Velmi často je amyloidogenese vystupňována u insulinomů z β buněk. Amyloid se skládá z celého peptidu i jeho fragmentů. Kritická amyloidogenní (β) struktura je mezi 20. a 30. aminokyselinou.

Toxicita amylinu byla prokázána v tkáňových kulturách lidských a krysích Langerhansových ostrůvků, obohacených exogenně přidaným amylinem. Toxicita byla vázána na fibrilární agregaci amylinu do amyloidních fibril v mediu. Podobně toxicita testovaných amylinů různých živočišných druhů byla vázána na schopnost jejich fibrilární agregace.

Amyloid na basi insulinu (AIns) spontánně vznikající nebyl doposud u člověka popsán. Lokální amyloid z insulinu však byl prokázán v místech aplikací tohoto hormonu u diabetiků typu I (iatrogenní amyloidosa). Spontánní výskyt amyloidu na basi insulinu byl popsán u některých hlodavců (*Octodon degus*).

Obr. 17. Isolovaná amyloidosa Langerhasových ostrůvků

Atriální srdeční amyloidosa na basi atriálního natriurického peptidu (ANP). ANP amyloidosa, zvaná též ANF (dle atrium natriuretic factor) je velmi častým nálezem v srdečních síních (myokard komor není postižen) u starších lidí. Podle některých sestav se vyskytuje u lidí v šestém deceniu v 67%. Jde o fibrilární agregaci síňového natriurického hormonu (atrial natriuretic peptide - ANP) a to jak prohormonu, tak i jeho fragmentů, které z něho normálně vznikají a které představují aktivní formu hormonu.

Je syntetizován jako prohormon (proANP₁₋₁₂₆) a je proteolyticky upraven na C-terminální peptid (ANP₉₉₋₁₂₆, zvaný kardiodylantin) a N-terminální peptid (ANP₁₋₉₈). Oba tyto peptidy byly v atriální amyloidose prokázány. Spolu s atriálním natriuretickým hormonem je v malém množství spoluprecipitován do amyloidu i t.zv. mozkový natriuretický peptid (BNP-brain natriuretic peptide), který je za normálních okolností syntetizovaná v malém množství i v síních srdce. Drobná deposita amyloidu byla prokázána intracelulárně v kardiocytech síní, většina deposice je však extracelulárně v intersticiu, zčásti subendokardiálně a v cévách síní.

Jde o lokalizovaný amyloid, deponovaný v nejbližším okolí produkující buňky. Síňová amyloidosa nemá definovatelný klinický korelát. Predispozicí a akcelerujícím faktorem se může stát hypersekrece hormonu při srdečním selhávání.

Amyloid v adenohipofyze. Deposice amyloidu v prostoru adenohipofyzy je velmi častý nález, úměrný věku. Rovněž často je amyloid deponován v hypofysárních adenomech o různých sekrečních profilech. Proces deposice amyloidu probíhá subklinicky. Charakteristika amyloidního proteinu je technicky obtížná pro malý rozsah změn. Nedávno byl identifikován jako první amyloidogenní hormon *prolaktin* (resp. jeho fragmenty) v senilním amyloidu hypofyzy. **Jde tedy o amyloid na basi prolaktinu (APro)**

Senilní a doposud biochemicky neurčené amyloidy

V řadě případů existuje pouze empiricky prokázaná amyloidosa na podkladě fyzikálního průkazu.

Z toho důvodu existuje stále čistě deskriptivní termín *senilní orgánová amyloidosa*, zahrnující deposici amyloidu v závislosti na věku v *adenohipofyze* (výjimka viz. výše), v *kůře nadledviny* (v obou lokalitách je popisována diskretní jak intra- tak extracelulární deposice. V *žilách portální oblasti* byl u starých lidí nalezen v 37% amyloid zčásti imunohistochemicky neurčený, zčásti na basi TTR.

Výrazná deposice amyloidu v závislosti na věku probíhá v oblasti epitelu *plexus chorioideus*. Amyloidogenní protein však není znám. Proces doprovází intracelulární deposice argyrofilních, kongofilních a dichroických vláknitých struktur, blízkých párovým helikálním filamentům v neuronech (viz. NTF u Alzheimerovy nemoci), zvaných v této lokalizaci Biondiniho tělíska. Tato tělíska byla nalezena i v řadě endokrinních buněk.

Deposice amyloidu u všech těchto stavů probíhá subklinicky.

Část amyloidogenních proteinů ze skupiny senilní amyloidosy byla již určena, jako aortální intimální senilní amyloidosa na basi Apo A1 (viz. výše), nebo senilní kardiální amyloidosa na basi TRR (viz. výše). Nutno připomenout poměrně významnou, byť subklinicky probíhající cerebrální amyloidosu na podkladě AβP (viz. výše).

Ve studovaných sériích šlo o incidenci řádově desítek procent, naznačující, že jde o projev velmi častý, jehož intenzita však může kolísat. Tento základní proces může být akcelerován dalšími faktory. Patogeneticky lze tuto formu amyloidosy těžko hodnotit. Amyloidogenní proteiny mohou být a jsou v různých orgánech různé, takže lze na tento stav pohlížet jako na spontánně probíhající biochemicky odlišné orgánově specifické amyloidosy, tedy jako na senilní "mnohočetnou amyloidosu" (každá z amyloidos na basi jednoho typu proteinu), mnohočetný proces, nejspíše způsobený procesem stárnutí (AApoA1 v aortě, AβP v mozku, amyloid na basi prolaktinu v adenohipofyze, na basi TTR v myokardu, semenogelinový amyloid v semenných váčcích, neznámý amyloid v plexus chorioideus). Patří sem i doposud ne zcela jednoznačně definovaný amyloid v chrupavce, v synovii kloubní a v meziobratlových ploténkách prokazatelný ve vysokém procentu ve stáří, zejména v degenerativních procesech typu artrosy (studie z poslední doby prokazují vznik z Apoproteinu AI, který je produkován chondrocyty). Nutno připomenout i kombinovanou ATTR a

AApoAIV amyloidosu - viz. ApoAIV amyloid). S touto senilní "polyamyloidosou" samozřejmě kontrastují amyloidosy způsobené izolovanou poruchou obratu jednoho určitého amyloidogenního proteinu.

Poněkud stranou stojí senilní "monoproteinová" generalizovaná TTR amyloidosa, odlišující se od izolované senilní TRR amyloidose myokardu a od dědičně podmíněné TRR amyloidosy. V každém takovém případě je však nutno na dědičný původ pomýšlet.

Část neurčených amyloidos však reprezentuje klinicky manifestní poruchy. Jde o amyloid v *osteoartrótických lesích* (i když zde jde spíše o sekundární, průvodní jev).

III. Srovnávací hledisko systémových amyloidos

Povšechné amyloidosy získané. Amyloidogenním proteinem je protein normální. V některých případech však může hrát roli polymorfismus.

- *AA* (amyloid z SAA proteinu): deposice generalizovaná (při nádorech, zánětlivých procesech),
Distribuce: viscerální (zejména slezina, ledviny, nadledviny, GIT a řada dalších orgánů)
- *AL* (*imunoamyloid*) (*AL - amyloid z lehkých řetězců - light chains*): deposice generalizovaná, viscerální (při monoklonálních gamapatiích (nádorových nebo nenádorových)
Distribuce: myokard, ledviny, plíce, cévy, GIT a řada dalších orgánů, včetně periferního nervového systému (i autonomního, ne CNS!). Může být syndrom karpálního tunelu. Typ distribuce se u AA i AL amyloidos může do značné míry překrývat a vyznačuje se velkou variabilitou. *Amyloid na basi těžkých řetězců* není zde zmíněn pro svou vzácnost.
- *Aβ2MG* : deposice generalizovaná (u hemodialysovaných)
Distribuce: klouby (chrupavka, synovie, pouzdro), kostní tkáň juxtaartikulárně, ale i mimo oblast kloubů s vývojem cystických lézí. Typický je syndrom karpálního tunelu.
- *Senilní ATTR* : deposice generalizovaná (vzácná forma)
Distribuce: převládá deposice v myokardu komor. Jednotící moment: diseminovaná deposice normálního TTR (produkt divoké alely). U syndromu senilní systémové amyloidosy (SSA) je nutno odlišit geneticky podmíněnou deposici mutantního TTR a paralelní "multiproteinovou" deposici orgánově specifických senilních amyloidů (viz. shora).

Povšechné amyloidosy podmíněné geneticky. Amyloidogenní jsou mutantní proteiny, nebo jejich fragmenty.

- *ApoA1*: deposice generalizovaná s potencionálně významnými hepatopatickými rysy.
Distribuce: těžké postižení jater se selháním, deposice v řadě dalších orgánů. Renální amyloid je omezen na dřeň. Velmi často infiltrace kůže a laryngu. Může být postižení periferního nervového systému. Doposud studován malý počet případů. Pozornost by měla být věnována ApoA1 amyloidu v intimně artérií a jeho vztah k aterosklerose
- *ApoA2* : tendence ke generalisaci s výrazným postižením ledvin. Tendence k postižení cév. Doposud byly popsány zcela ojedinělé případy
- *Lysozym* : deposice generalizovaná s hepatopatickými ev. nefropatickými rysy.
Distribuce: intenzivní deposice amyloidu v ledvinách (glomerulárně), játrech, dále postižení GIT, cév, sleziny. Pravděpodobně není postiženo srdce. Doposud je známo pouze několik případů.

- α řetězce fibrinogenu : generalizovaná deposice s nefropatickými rysy
Distribuce: masivní postižení ledvin, dále sleziny, nadledvin. Postižení periferního nervového systému nebylo doposud popsáno. Pravděpodobně není deposice v játrech a v srdci. Doposud je znám malý počet pacientů.
- TTR : deposice generalizovaná s neuropatickými a kardiomyopatickými rysy
Distribuce: takřka pravidelně v periferním nervovém systému (podle toho i klinický název *familiární amyloidní polyneuropatie*) a v myokardu. Často je popisován syndrom karpálního tunelu. Opakovaně bylo popsáno postižení thyreoidey, dále sklivce a leptomeninx. Postižení ostatních orgánů (ledvin, sleziny) zřejmě variabilní.
- *Gelsolin*: generalizovaná deposice, často s neuropatickými rysy
Distribuce: rohovka, periferní nervy, basální membrány cév, potních žlázek. Postiženy mohou být i renální glomeruly. V CNS byla popsána lokalizace v některých neuronech a v Lewyho tělískách a to i mimo gelsolinovou amyloidosu.
- *Cystatin C*: deposice generalizovaná s postižením cerebrálních cév
Distribuce: cévní stěna, zejména cerebrální a meningeální artérie, ale i basální membrány v

Amyloidosy podle postižení orgánů

Zde jsou zmíněny pouze stavy s výrazným postižením určitého orgánu, tedy na pozadí generalizace procesu amyloidosy

renální postižení : je běžné u získaných generalizovaných amyloidos.

Familiární postižení je typické pro amyloidosu na basi:

- α řetězce fibrinogenu (rychlý průběh s hypertensí)
- lysozymu
- ApoA1
- ApoA2

hepatální postižení: je poměrně výjimečné u získaných forem (AL, ATTR).

Familiární těžké postižení se ukazuje být příznačné pro amyloidosu na basi:

- ApoA1
- lysozymu

neuropatické forma (periferní neuropatie): přichází v úvahu u získaných forem.

Z dědičných je to především amyloidosa na basi:

- transthyretinu
- ApoA1
- gelsolinu

amyloidosa myokardu: je častá u získaných forem na basi

- SAA
- AL
- transthyretinu a to jak divokého (ve stáří) i mutantního

amyloidové opacity ve sklivci : deposice amyloidu z transthyretinu

amyloid v rohovce:

- deposice gelsolinu jako projev systémové amyloidosy
- lokálně omezené amyloidosy na basi laktoferinu (sekundární při zánětlivých očních procesech nebo primární geneticky podmíněný proces na stejné proteinové basi

kožní amyloidosa : na basi cytokeratinu jako autochtonní kožní proces (primární nebo sekundární v rámci kožních nádorů - viz. shora) nebo jako projev generalizované amyloidosy, údajně především na basi ApoAI

amyloidosa s postižením mozkových cév (dříve tzv. kongofilní angiopatie): (včetně neurologické symptomatologie) - neurologicky závažné amyloidosy (mimo prionosy, které jsou svým základním projevem odlišné).

Dvě z těchto formy nemají viscerální postižení (klasická biopsie není tedy přínosná):

- *Alzheimerova nemoc* s výraznou angiocentrickou deposicí amyloid β proteinu

- t.zv. *familiární britská (a dánská) demence*, způsobená mutací Bri proteinu
Další amyloidosy jsou kombinací postižení CNS (cév, neuronů, leptomening) a viscerálního postižení (detaily viz. v hlavním textu shora). Klasická biopsie z viscerálních míst může být přínosná u geneticky podmíněných amyloidos na basi:
 - *cystatinu C* (viscerálně vs. bez příznaků)
 - *gelsolinu* (současně zákal rohovky a periferní neuropatie)
 - *transthyretinu* (může mít významné postižení leptomeninx a sklivce)

amyloid aortální (ve stáří)

- deposice v intimě - ApoA1
- deposice v medii - medin

Tato schémata vycházejí z literárního přehledu. Vzhledem k variabilitě tkáňových změn u amyloidos nemusí pokrývat vyčerpávajícím způsobem celou problematiku diferenciální diagnózy

závěr - identifikace amyloidu *versus* diagnosa amyloidosy

Identifikace amyloidu jako β fibrily není v zásadě žádný zásadní problém (vazba Kongo červeně s indukci dvojlomu a dichroismu, ultrastrukturální průkaz fibril). Velmi obtížná je identifikace typu amyloidosy, která naráží v praxi na obtížnosti imunohistochemické detekce stavebního kamenu amyloidu *in situ* v rutinních parafinových řezech. Optimálně by měl být každý amyloid vyšetřen biochemicky po extrakci nefixovaného vzorku, např. kryostatového řezu (ideálně po selekci od ostatních komponent mikrodisekcí) a podroben sekvenční nebo hmotnostní analýze. Do jisté míry je toto možné i v případě standardního parafinového vzorku tkáně. Tím by byl ideálně stanoven molekulární typ. Po té by mělo následovat hodnocení procesu, který k amyloidose vedl, včetně toho, zda jde o získaný, či geneticky podmíněný proces, případně charakter fragmentů amyloidogenního proteinu (stupeň proteolytické degradace u získaných forem, účast mutantního proteinu ve srovnání s divokým proteinem u geneticky podmíněných amyloidos, které mají dominantní přenos)

V hodnocení amyloidos nutno brát v úvahu :

- nespecifický výskyt monoklonálních gamapatií, který může být zavádějící ve smyslu falešné diagnózy AL amyloidosy
- významnou účast koprecipitujících proteinů (viz. úvodní část) v ložisku amyloidu, zejména těch, o kterých je známo, že mohou být také primárně amyloidogenními (ApoA1). Není k dispozici metodika, která by dovolila odlišit, zda je takový protein ve fibrile nebo jen jako mimofibrilární příměs. Určitou pomocí by mohlo být zvýšení positivity (nebo indukce positivity) po použití mravenčí kyseliny (viz úvod). Teoreticky nelze vyloučit ani možnost, že by v jedné fibrile mohou být přítomny dva amyloidogenní proteiny.

U klasické sekundární AA amyloidosy přichází ve výjimečných případech v úvahu objasnění genetického přenosu v rodinách. Primárně geneticky podmíněná AA amyloidosa nebyla

doposud jednoznačně prokázána. Rozhodující se stále ukazuje být genetický přenos její primární příčiny, stručně zmíněné níže.

Okrajovou záležitostí (i když biologicky velmi zajímavou a v budoucnosti velmi pravděpodobně velmi významnou) může být nejen stanovení příměsí nefibrilárních (nekongofilních) komponent kritického amyloidogenního proteinu (zejména v případě AL amyloidosy, viz. výše), ale i stanovení molekulárních variant deponovaného proteinu a tím se přiblížit mechanismu prefibrilární a terminální fibrilární agregace a role buňky samotné v mechanismu amyloidosy. V souhrnu jde o sekvenci: **amyloid-specifikace stavební molekuly, popřípadě specifikace mechanismu její agregace**

Pouhé konstatování, že v bioptickém (nebo pitevním) vzorku je prokazatelný amyloid není dostatečné. Jde o diagnosu na úrovni biofyzikální, nikoliv na úrovni biologické. Pouze diagnosa na úrovni biologické má zásadní výpovědní hodnotu, neboť vypovídá nejvíce o specifické patogenese stavu. V tomto smyslu jsou klinici zcela závislí na expertise patologa, resp. molekulárního patologa nebo biochemika.

identifikace neznámých amyloidů

Nové typy amyloidu, s doposud neznámým výchozím amyloidogenním proteinem se identifikují biochemickou cestou, která zahrnuje solubilizaci proteinů ve studovaném vzorku, jejich elektroforesu, izolaci kritického proužku a sekvenování nebo hmotnostní analýsu. Optimální je izolace amyloidového deposita mikrodisekční technikou (odstranění nespecifických proteinů). Po stanovení jeho primární struktury pak může být protein určen srovnáním s doposud známými proteiny podle příslušných sekvenčních databází, zjištěn jeho gen a podroben analýze DNA.

Konec - poslední vklad únor 2009