

## FARMAKOTERAPIE PRO PRAXI

Kniha byla vydána díky laskavé podpoře společností



FARMAKOTERAPIE PRO PRAXI / Sv. 61

**Doc. MUDr. Romana Ryšavá, CSc.**

# **SYSTÉMOVÉ AMYLOIDÓZY A JEJICH LÉČBA**

## AUTOR

■ **Doc. MUDr. Romana Ryšavá, CSc.**, Klinika nefrologie 1. LF UK a VFN Praha

## RECENZENTI

■ **Prof. MUDr. Miroslav Merta, CSc.**, FN Hradec Králové

■ **Prof. MUDr. Václav Monhart, CSc.**, ÚVN, Praha

## DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ

Autor i nakladatel vynaložili velkou péči a úsilí, aby všechny informace v knize obsažené týkající se dávkování léků a forem jejich aplikace odpovídaly stavu vědy v okamžiku vydání. Nakladatel však za údaje o použití léků, zejména o jejich indikacích, kontraindikacích, dávkování a aplikačních formách, nenesе žádnou odpovědnost, a vylučuje proto jakékoli přímé či nepřímé nároky na úhradu eventuálních škod, které by v souvislosti s aplikací uvedených léků vznikly. Každý uživatel je povinen důsledně se řídit informacemi výrobců léčiv, zejména informací přiloženou ke každému balení léku, který chce aplikovat.

*Ochranné obchodní známky (chráněné názvy) léků ani dalších výrobků nejsou v knize zvlášť zdůrazňovány. Z absence označení ochranné známky proto nelze vyvozovat, že v konkrétním případě jde o název nechráněný.*

Toto dílo, včetně všech svých částí, je zákonem chráněno. Každé jeho užití mimo úzké hranice zákona je nepřipustné a je trestné. To se týká zejména reprodukování či rozšiřování jakýmkoli způsobem (včetně mechanického, fotografického či elektronického), ale také ukládání v elektronické formě pro účely rešeršní i jiné. K jakémukoli využití díla je proto nutný písemný souhlas nakladatele, který také stanoví přesné podmínky využití díla. Písemný souhlas je nutný i pro případy, ve kterých může být udělen bezplatně.

## Romana Ryšavá, SYSTÉMOVÉ AMYLOIDÓZY A JEJICH LÉČBA

© Romana Ryšavá, 2013

© Maxdorf, 2013

Illustrations © Maxdorf, 2013

Cover layout © Maxdorf, 2013

Vydal Maxdorf s. r. o., nakladatelství odborné literatury, Na Šejdru 247/6a, 142 00 Praha 4

e-mail: info@maxdorf.cz, internet: www.maxdorf.cz

Jessenius® je chráněná značka [No. 267113] označující publikace určené odborné zdravotnické veřejnosti

Edice Farmakoterapie pro praxi, svazek 61

**Editor: MUDr. Jan Hugo**

Odpovědný redaktor: **Ing. Eva Hugová**

Grafické řešení, návrh obálky: **design studio maxdorf**

Sazba: **Denisa Honzalová**

Ilustrace: **Ing. Jaroslav Nachtigall, Ph.D.**

Tisk: Books print s.r.o.

Printed in the Czech Republic

**ISBN 978-80-7345-341-1**

*Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mají zásluhu na vydání této knihy. Jde především o vedení Kliniky nefrologie 1. LF UK a VFN Praha za možnost soustředit nemocné s amyloidózou na naší klinice, provádět zde adekvátní diagnostiku a léčbu. Poděkovat bych chtěla i kolegům z 1. interní kliniky – hematologické 1. LF UK a VFN Praha, se kterými úzce spolupracujeme při diagnostice a léčbě nemocných s AL amyloidózou, a kolegům z Revmatologického ústavu 1. LF UK, se kterými společně pečujeme o nemocné s AA amyloidózou. Velký dík také patří MUDr. Evě Honsové, CSc., primářce patologie IKEM, nejen za zapůjčení histologických obrázků uveřejněných v této knize, ale zejména za mnohaletou a precizní spolupráci při diagnostice nemocných se systémovými amyloidózami. V neposlední řadě můj dík patří i mé rodině za trpělivost, se kterou snáší moji pracovní a vědeckou vytíženost.*

*Romana Ryšavá*

# PŘEDMLUVA

Amyloidóza je souhrnný název pro skupinu onemocnění, která mají řadu shodných vlastností, ale často velmi pestrý klinický průběh a manifestaci. Symptomy amyloidózy byly popisovány v učebnicích již před mnoha staletími, ale pravá podstata onemocnění byla odhalena teprve před 150 lety. I přes nepochybný pokrok v diagnostice a léčbě všech forem onemocnění jde stále o chorobu s velmi nepříznivou prognózou. Dílem to může být dáno pozdní diagnostikou, dílem i omezenou reakcí na léčbu u některých pacientů.

Cílem této publikace je zasvětit širší lékařskou veřejnost do tajů této stále ještě záhadné choroby, o které toho v českém písemnictví mnoho napsáno nebylo. Chtěli bychom zde ukázat, že nejenom v diagnostice, ale zejména v léčbě jsme v posledních 20 letech významně pokročili a že můžeme při včasné odhalení onemocnění našim nemocným prodloužit přežívání, či alespoň zlepšit kvalitu jejich života. Rozvoj genetiky také umožnil lépe poznat příčiny některých vrozených forem onemocnění a identifikovat jejich „viníka“. Spolupráce se zahraničím a účast v mezinárodních studiích nám navíc umožňuje podávat i nové léky, které vykazují slibné terapeutické účinky u zvířecích modelů.

# OBSAH

<b>Předmluva</b> .....	7
<b>1 Úvod</b> .....	10
<b>2 Repetitorium</b> .....	12
2.1 Definice amyloidózy .....	12
2.2 Rozdělení amyloidóz .....	12
2.3 Epidemiologie .....	16
2.4 Etiologie vzniku a patogeneze .....	19
2.5 Klinický obraz a vývoj onemocnění .....	48
<b>3 Diagnostika, diferenciální diagnostika</b> .....	57
3.1 Diferenciální diagnóza amyloidózy .....	70
<b>4 Terapie</b> .....	74
4.1 Specifická léčba .....	74
4.2 Symptomatická léčba orgánového postižení .....	95
<b>5 Chyby a omyly</b> .....	100
5.1 Chyby v diagnostice .....	100
5.2 Chyby v léčbě .....	101
<b>6 Kazuistiky</b> .....	103
6.1 Kazuistika č. 1 – příklad chybné diagnózy .....	103
6.2 Kazuistika č. 2 – nestanovení diagnózy .....	104
<b>Literatura</b> .....	106
<b>Přehled použitých zkratk</b> .....	116
<b>Medailonek autorky</b> .....	118
<b>Rejstřík</b> .....	120

# 1 ÚVOD

Amyloidóza je onemocnění, pro které je charakteristické extracelulární ukládání proteinových hmot fibrilární struktury a běžně se dělí na systémové a lokalizované formy.

Pravděpodobně první, kdo popsal v roce 1639 amyloidózu, aniž znal podstatu onemocnění, byl Nicholaus Fontanus (někdy přepisováno jako Fonteyn). Ve své kazuistice popsal nemocného s epistaxí, ascitem, žloutenkou a abscesy v játrech, který měl také velkou tuhou slezinu vyplněnou „bílými kameny“. Podobný případ popsal i Thomas Bartholini ve své publikaci *Historiarum Anatomicarum Rariorum*. Jeho pacient měl slezinu tak tvrdou, že šla velmi obtížně rozkrojit nožem, a při řezu vydávala zvuk podobný řezání „ztrouchnivělého dřeva“. V 18. století se objevovaly další popisy případů onemocnění, které ještě nemělo přesné označení, ale nepochybně šlo o amyloidózu. Postihovalo zejména nemocné s tuberkulózou či jinými chronickými infekcemi. Carl Rokitansky v roce 1842 popsal nemocného s tuberkulózou, syfilis a otravou rtuťí, který měl játra infiltrována šedivě zrnitými depozity, která měla „tukově-želatinózní“ vzhled. George Budd o několik let později správně analyzoval, že tato depozita v tkáních postižených nemocných nemají cukernou či tukovou podstatu, ale jsou nejspíše bílkovinné povahy (velký obsah albuminu a dalších proteinů) [1].

Termín „amyloid“ pochází od německého botanika Matthiase Schleidena, který jej použil v roce 1838 pro označení škrobových substancí obsažených v rostlinách. V medicíně pak poprvé zazněl od Rudolfa Virchowa v roce 1854. Označení vzniklo vlastně omylem, když Virchow ve snaze prokázat původ depozit škrobového vzhledu v corpora amyloacea v mozku použil jod pro jejich barvení (tzv. Virchowova I. reakce, kdy se řezy orgánů postižených amyloidem namáčejí do Lugolova roztoku a depozita amyloidu vykazují maha-gonově hnědé zbarvení). Podobná depozita stejných tinkčních



vlastností poté prokázal i v jiných orgánech u nemocných, kteří trpěli amyloidózou AA. O 5 let později, v roce 1859, Friedreich a Kekulé přinesli důkazy pro proteinovou podstatu amyloidových depozit, která obsahovala velké množství dusíku [2]. Virchow nicméně provedl zásadní pozorování, když odhalil, že bledý vzhled postižených orgánů je dán jejich ischemií při útlaku cévních struktur amyloidem, a prokázal také depozita amyloidu v glomerulech a aferentních arteriolách ledvin. Popsal také marantické stavy nemocných, kteří trpěli malnutricí způsobenou infiltrací střeva amyloidovými depozity. Většina případů popsaných do druhé poloviny 19. století byli nemocní s amyloidózou AA. Pravděpodobně první popis amyloidózy AL pochází od Samuela Wilkse, který popsal 52letého muže s tukovitými depozity ve viscerálních orgánech, přičemž netrpěl ani tuberkulózou, ani syfilitidou či osteomyelitidou. Měl otoky a albuminurii. Slezina byla extrémně tvrdá, srdce hypertrofické. Tukově voskový vzhled měly i ledviny. Předpokládal, že orgány (zejména játra) jsou „přeplněna“ přídatnou hmotou, která je dělá tužšími a těžšími, a že tento proces není degenerativní, jak si někteří vědci v té době ještě mysleli. Průkaz lehkých řetězců (LC) imunoglobulinů  $\kappa$  či  $\lambda$  v amyloidových depozitech nemocných s AL amyloidózou je až zásluhou George Glennera.

„Metachromatický“ vzhled amyloidových depozit popsal v roce 1878 Paul Ehrlich. Zásadní přínos k histologickému průkazu amyloidových depozit zaznamenal rok 1922, kdy Hermann Bennhold zavedl do klinické praxe barvení konžskou červení, které se používá dodnes. V 60. letech byl také náhodně objeven charakteristický rys amyloidových depozit, a to zelený dichroismus. Byl pozorován v polarizačním mikroskopu při vyšetřování amyloidových plaků nabarvených konžskou červení v mozku nemocného trpícího Alzheimerovou chorobou. Fibrilární strukturu amyloidových depozit pak prokázali v roce 1959 Cohen a Calkins.

V 80. letech 20. století se pak začaly objevovat práce, které přinesly důkazy o genetickém původu některých forem amyloidózy s familiárním výskytem. První z nich se týkaly familiární amyloidové polyneuropatie (FAP).

## 2 REPETITORIUM

### 2.1 DEFINICE AMYLOIDÓZY

Amyloidózu můžeme definovat jako onemocnění, pro které je typické extracelulární, homogenní ukládání amorfních hmot proteinové povahy v tkáních, které se barví pozitivně konžskou červení. Pokud jsou tato depozita pozorována v polarizovaném světle, vykazují typickou žlutozelenou barvu. V elektronové mikroskopii je pak pro depozita typická přítomnost náhodně uspořádaných nevětvených fibril proteinové povahy, které vykazují  $\beta$ -strukturu skládaného listu.

Amyloidózy jsou progresivní stavy, terapeuticky velmi špatně ovlivnitelné. Jedinou možností vyléčení je kompletní odstranění vyvolávající příčiny onemocnění, což je často prakticky nemožné (zejména u hereditárních forem onemocnění).

### 2.2 ROZDĚLENÍ AMYLOIDÓZ

Amyloidózy můžeme dělit podle rozsahu postižených orgánů na systémové či lokalizované a dále je lze dělit podle typu amyloidogenního proteinu. Podle příčiny zvýšené produkce prekurzoru jde o formy získané či hereditární (spojené s mutací v genu, který je zodpovědný za syntézu daného prekurzoru). Každý typ amyloidózy, ať již systémové, či lokalizované, má svůj specifický fibrilární prekurzor (amyloidogenní protein). Do dnešního dne bylo popsáno 30 typů rozdílných fibrilárních proteinů, které mohou vést ke vzniku amyloidózy (tab. 2.1). Označení jednotlivých typů amyloidóz se řídí určitými pravidly, která zahrnují název amyloidového proteinu začínajícího písmenem A (amyloid) a zkratku fibrilárního prekurzoru (např. L – immunoglobulin light chain, TTR – transthyretin). Onemocnění se pak označuje jako AL amyloidóza či ATTR amyloidóza. Názvosloví a dělení jednotlivých forem je

Tabulka 2.1 Typy amyloidóz, amyloidové proteiny a jejich prekurzory

Amyloidový protein	Prekurzor	Distribuce/ forma	Typ dědičnosti	Syndrom či postižené orgány
A $\beta$	$\beta$ protein	lokalizovaná	získaná hereditární	Alzheimerova choroba cerebrální amyloidová angiopatie (holandský typ)
APrP	prionové proteiny	lokalizovaná	získaná hereditární	CJD, alimentárně získaná CJD familiární CJD, GSSD, FFI
ABri	ABri protein	lokalizovaná (systémová?)	hereditární	britská familiární demence (demence, spastická kvadruparéza)
ADan	ADan protein	lokalizovaná	hereditární	dánská familiární demence (katarakta, hluchota, demence)
ACys	cystatin C	systémová	hereditární	cerebrální amyloidová angiopatie (islandský typ)
A $\beta_2$ M	$\beta_2$ mikroglobulin	systémová	získaná	chronická dialýza
AL	lehké řetězce imunoglobulinů	systémová (lokalizovaná)	získaná	primární amyloidóza (asociovaná s MGUS či mnohočetným myelomem)
AH	těžké řetězce imunoglobulinů	systémová (lokalizovaná)	získaná	asociovaná s mnohočetným myelomem, lymfomy
AA	sérový amyloid A	systémová	získaná	sekundární (reaktivní) amyloidóza + FMF, TRAPS, HIDS, FCU, MWS

**Tabulka 2.1** Typy amyloidóz, amyloidové proteiny a jejich prekurzory – pokračování

Amyloidový protein	Prekurzor	Distribuce/ forma	Typ dědičnosti	Syndrom či postižené orgány
ATTR	transthyretin	systemová	hereditární získaná	FAP senilní systémová amyloidóza (SSA)
AApoA I	apolipoprotein A-I	systemová	hereditární	ledviny, játra, srdce
AApoA II	apolipoprotein A-II	systemová	hereditární	ledviny, srdce
AApoA IV	apolipoprotein A-IV	systemová	získaná	asociované se stárnutím
AGel	gelsolin	systemová	hereditární	finská hereditární amyloidóza
ALys	lyzozym	systemová	hereditární	ledviny, játra, slezina
AIAPP	ostrůvkový amyloidový polypeptid (amylin)	lokalizovaná	získaná	pankreas (diabetes mellitus, inzulinom)
Alns	inzulin	lokalizovaná	získaná	iatrogenně vznikající v místech aplikace inzulinu
AFib	fibrinogen $\alpha$ řetězec	systemová	hereditární	ledviny
ALect2	leukocytární chemotaktický faktor 2	systemová	získaná	ledviny
ACal	(pro)kalcitonin	lokalizovaná	získaná	u nádorů tyreoidy
AANF	atriální natriuretický peptid	lokalizovaná	získaná	srdce

■ Tabulka 2.1 Typy amyloidóz, amyloidové proteiny a jejich prekurzory – pokračování

Amyloidový protein	Prekurzor	Distribuce/ forma	Typ dědičnosti	Syndrom či postižené orgány
APro	prolaktin	lokalizovaná	získaná	adenohipofýza
ASPC	plicní surfaktant	lokalizovaná	získaná	příce
AGal7	galektin 7	lokalizovaná	získaná	kůže
ACor	corneodesmosin	lokalizovaná	získaná	epitel rohovky, vlasové folikuly
AMed	lactadherin	lokalizovaná	získaná	cévní stěna (aorta)
AKer	keratopitelin	lokalizovaná	hereditární	dystrofie rohovky
ALac	laktoferin	lokalizovaná	získaná	v rohovce při trichiáze
ASem1	semenogelin 1	lokalizovaná	získaná	atrofie semenných váčků
AOaap	odontogenní asociovaná s ameloblastem	lokalizovaná	získaná	u kalcifikovaných odontogenních tumorů

*CJD* – Creutzfeldtova-Jakobova choroba, *GSSD* – Gerstmannova-Sträusslerova-Scheinkerova choroba, *FFI* – fatální familiární insomnie, *FMF* – familiární středomořská horečka, *TRAPS* – syndrom asociovaný s deficitem receptoru 1 pro tumor necrosis factor, *HIDS* – hyper-IgD-syndrom, *FCU* – familiární chladová urtika, *MWS* – Muckle-ův-Wells-ův syndrom, *FAP* – familiární amyloidová polyneuropatie

pravidelně revidováno nomenklaturním výborem mezinárodní společnosti pro amyloidózu ISA [3].

Amyloidový fibrilární protein je definován jako protein, který je součástí amyloidových depozit v tkáních. Barví se pozitivně konžskou červení a dále vykazuje zelený dichroismus, pokud se amyloidová depozita barvená konžskou červení pozorují v polarizačním mikroskopu. Chemická struktura každého proteinu musí být jasně definována přesnou sekvencí aminokyselin v proteinu a průkazem, že tvoří fibrily. Kromě identifikace 30 lidských fibrilárních prekurzorů je registrováno i 10 fibrilárních zvířecích prekurzorů a 6 intracelulárních inkluzních tělísek, která jsou na rozdíl od amyloidových fibril lokalizována intracelulárně, ale vykazují řadu vlastností typických pro amyloidové fibrily (např. Lewyho tělíska, Hiranova tělíska, Huntingtonova tělíska, neurofibrilární spleti).

Ještě i dnes se můžeme setkat s používáním starších nomenklaturních označení (zavedených do praxe v první polovině minulého století), kde byly amyloidózy děleny na primární, sekundární, tvořící tumory a asociované s mnohočetným myelomem. Jde o dělení překonané a zastaralé a nemělo by se používat. Stejně tak zavádějící byl i pojem „paraamyloid“, který se používal pro označení drobných izolovaných depozit v tkáních vykazujících tinkční vlastnosti amyloidu. Ani tento pojem by se již neměl v patologických nálezech objevovat.

## 2.3 EPIDEMIOLOGIE

AL amyloidóza představuje nejčastější typ systémových amyloidóz s odhadovanou incidencí výskytu 8,9 na 1 milion obyvatel [4]. Prevalence onemocnění je však výrazně vyšší a v poslední době stoupá, zejména v důsledku delšího přežívání pacientů s monoklonálními gamapatiemi nejistého významu (MGUS) či maligními plasmadyskraziemi. Medián věku, kdy se onemocnění manifestuje, je 70. rok života, u lidí mladších 40 let je onemocnění vzácné (méně než 10 % všech případů). Muži jsou o něco častěji postiženi v porovnání se ženami, a to asi v poměru 3 : 2. Medián přežívání neléčených nemocných na Mayo Clinic byl 13 měsíců, pokud měli i manifestní srdeční postižení, pak se zkracoval na 6 měsíců

[5]. Přežívání nemocných s AL amyloidózou se v poslední době výrazně prodloužilo. Medián přežívání neselektované populace 868 nemocných z italské Pavie sledovaných v letech 1986–2007 byl 3,8 let [6]. U pacientů, kteří velmi dobře odpovídali na léčbu, se medián přežívání prodloužil na 6–8 let. Pokud však měli nemocní echokardiograficky prokázané srdeční postižení, bylo jejich přežívání jen 21 měsíců v porovnání s těmi, kteří ho neměli (82 měsíců,  $p < 0,001$ ). Srdeční postižení je tak nejdůležitějším negativním prognostickým rysem pro celkové přežívání nemocných s AL amyloidózou. Ve Velké Británii je AL amyloidóza uváděna jako příčina úmrtí u jednoho z 1500 zemřelých.

Přesné údaje o výskytu AA amyloidózy v neselektované populaci nemocných jsou velmi obtížně zjistitelné. Ve starších publikacích se výskyt odhadoval na 4 pacienty na 100 000 obyvatel [7]. Déle než 4 roky přežívalo 40 % nemocných a více než 10 let jen 25 % pacientů. V jiné studii byla prevalence AA amyloidózy jako komplikace u nemocných s chronickým revmatickým onemocněním (ještě před zavedením biologické léčby) popisována v Evropě u 5–20 % nemocných [8]. To znamená, že u každého pátého až dvacátého nemocného, který trpěl některým z chronických revmatických onemocnění, se vyvinula v průběhu let AA amyloidóza. V USA byla incidence menší, nejspíše v důsledku agresivnější léčby revmatických onemocnění. V nejvyšším riziku jsou nemocní, kteří mají trvale aktivní onemocnění s vysokými koncentracemi sérového amyloidu A (SAA) a C-reaktivního proteinu (CRP) a s opakovanými atakami artritidy a extraartikulárními projevy choroby.

Se zavedením nových terapeutických postupů, včetně biologické léčby, se incidence AA amyloidózy u revmatických onemocnění snížila, naopak přibýlo případů, kde AA amyloidóza vzniká jako důsledek chronických infekcí dekubitů či jako komplikace hidroadenitidy. Ve všech uváděných studiích také stoupá počet případů, kde nejsme schopni ani za pomoci nejnovějších diagnostických metod určit základní, vyvolávající onemocnění (až v 18 % případů) [9]. Medián vzniku AA amyloidózy od prvních příznaků základního revmatického onemocnění byl v souboru 64 nemocných z Mayo Clinic odhadován na 212 měsíců [10]. V postmortálních studiích je

incidence AA amyloidózy u nemocných s revmatickým onemocněním velmi variabilní a kolísá mezi 5 a 60 %. Jisté je, že amyloidóza se prokáže za života pacientů jen v malém počtu případů. Přibližně 10 % nemocných s revmatoidní artritidou umírá na komplikace, které souvisejí s přítomností amyloidózy, a nebo na infekční komplikace spojené s léčbou [11]. Medián přežití nemocných s AA amyloidózou se v současnosti pohybuje kolem 133 měsíců a významně závisí na koncentraci SAA [12]. Pokud se podaří léčbou udržet koncentraci SAA pod 4 mg/l, dramaticky se tím prodlouží doba přežití v porovnání s jedinci, u nichž je koncentrace SAA vyšší než 155 mg/l (až 18×). Podobná data přinesla i starší studie ze stejného pracoviště, kde koncentrace SAA v séru < 10 mg/l byla spojena s regresí depozit amyloidu v tkáních a 10leté přežívání bylo 90 %, zatímco dlouhodobá koncentrace SAA > 50 mg/l vedla k nárůstu amyloidových depozit a 10leté přežívání bylo jen 40 % (rozdíl v přežívání mezi skupinami byl významně signifikantní,  $p = 0,0009$ ) [13].

Amyloidóza jako příčina renálního postižení byla v českém registru renálních biopsií prokázána v 4,65 % případů [14]. Tento registr neumožňuje diferencovat jednotlivé typy amyloidóz, nicméně z celkového počtu 2128 renálních biopsií, které byly v ČR provedeny v letech 1995–2006, byla diagnóza AA či AL amyloidózy stanovena v 99 případech.

ATTR amyloidóza je nejčastější formou hereditárních amyloidóz. Odhadovaná prevalence onemocnění celosvětově je 1/100 000 obyvatel. Výskyt velmi kolísá v závislosti na regionu; je několik endemických oblastí s velmi vysokou prevalencí onemocnění, až 1/1000 obyvatel (Portugalsko, Švédsko, Japonsko) [15]. Zdá se tedy, že kromě variability fenotypové penetrace jednotlivých mutací má vliv na rozvoj onemocnění i vnější prostředí. Některé práce také naznačují, že maternální typ přenosu je spojen se závažnějším fenotypem, v důsledku čehož se spekuluje o vlivu možných mitochondriálních polymorfismů na rozvoj onemocnění [16]. Dominantní klinická manifestace (postižení srdce, periferního nervového systému či ledvin) závisí na typu mutace. Před érou zavedení ortotopické jaterní transplantace (OLT) do standardní léčby těchto stavů bylo průměrné přežívání nemocných 11 let od doby stanovení diagnózy [17].



## 2.4 ETIOLOGIE VZNIKU A PATOGENEZE

Amyloidové fibrily jsou dlouhé až 1  $\mu\text{m}$  a tlusté 8–10 nm a je pro ně typické uspořádání v  $\beta$ -strukturu skládaného listu. Fibrily jsou nevětvené a skládají se ze 4–6 protofilament 2,5 až 3,5 nm tlustých, s antiparalelním průběhem, která se spirálovitě obtácejí. Jejich počet v jedné fibrile může kolísat podle typu prekursoru. Nejvíce jich bývá u ATTR, nejtenčí pak jsou fibrily u A $\beta$ . Toto uspořádání, které může být demonstrováno rtg krystalografií, je zodpovědné za ultrastrukturní, tinkční a optické vlastnosti amyloidu.

Ke vzniku amyloidu dochází agregací původně solubilní (degradovatelné) formy proteinu do fibrilární struktury, která je rezistentní na degradaci. Na rozdíl od  $\alpha$ -helixu je stabilita  $\beta$ -struktury skládaného listu dána interakcí mezi rozvinutými polypeptidovými řetězci, kdy dochází k vazbám i mezi vzdálenými částmi řetězce. Tím se posiluje jejich stabilita. Podmínkou vzniku amyloidu je narušený životní cyklus proteinu se vznikem abnormálního přechodného mezičlánku s  $\beta$ -strukturou, náchylného k fibrilární agregaci. Tento amyloidogenní mezičlánek vzniká buď ve fázi vzniku, nebo ve fázi degradace amyloidogenního proteinu. Přítomnost  $\beta$ -struktury jako varianty sekundární struktury proteinu je pro vznik amyloidové fibrily nezbytná. Agregace proteinu do amyloidové fibrily je tedy fyzikální proces vznikající jako následek různých poruch v životním cyklu proteinu, a to od stavu jeho zrodu do fáze jeho degradace, odrážející jeho abnormální konformaci. Důležité je, že tyto poruchy se vždy týkají jen jednoho proteinu. Eventuální mutace v genech pro některé proteinové prekurzory může vznik amyloidových depozit značně urychlit.

Při vzniku amyloidózy je velmi důležitá kinetika tvorby a zároveň schopnost degradace amyloidových prekurzorů, kdy u většiny amyloidóz nalézáme zvýšenou tvorbu prekurzorů. V patogenezi těchto stavů však mohou mít roli oba faktory izolovaně nebo v kombinaci. Nebyl také prokázán přímý a jednoduchý vztah mezi závažností vyvolávajícího procesu, množstvím amyloidových prekurzorů a vznikem amyloidózy [18]. Ke zvýšené koncentraci amyloidogenního proteinu v séru může vést jeho nadprodukce (např. SAA, LC a částečně i  $\beta_2\text{M}$ ) či nedostatečné vylučování amyloidogenního proteinu

( $\beta_2M$ ). Samotné zvýšení koncentrace amyloidogenního proteinu v extracelulární tekutině však není pravděpodobně jediným a ani hlavním faktorem. Velmi důležitou roli v molekulární patogenezi generalizovaných amyloidóz má zřejmě abnormální finální proteolýza 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. Klíčovou roli v kompletní degradaci kritického amyloidogenního proteinu mají lyzozomy, zejména makrofágů, jejichž nedostatečná činnost při vhodných vnějších podmínkách může přispívat ke vzniku fibril. Předpokládáme, že tato porucha je omezena na daný amyloidogenní protein a že paralelní lyzozomální katabolismus jiných proteinů probíhá nenarušeně. U některých lokalizovaných forem amyloidóz nebývají jejich prekurzory v cirkulaci zvýšené. Jejich lokální sekrece je způsobena uvolněním amyloidogenních peptidů z buněčných membrán daného orgánu proteolytickým štěpením s následnou agregací fibril převážně v okolí sekreční buňky. Takto vznikají zejména cerebrální amyloidózy.

Dalším momentem, který přispívá ke vzniku některých forem amyloidózy, může být mutace v genu, který kóduje vznik daného prekurzoru. Je-li důsledkem mutace změna sekvence aminokyselin v proteinu, stávají se takto patologicky změněné bílkoviny obtížně degradovatelné pro chybné prostorové uspořádání a v důsledku toho snáze tvoří agregáty fibril a následně depozita amyloidu (většina familiárních forem amyloidóz).

V neposlední řadě může k přeměně strukturně normálních proteinů na amyloidogenní prekurzory přispět vliv některých dalších faktorů, např. AGE (produkty pokročilé glykace proteinů). Zvýšené hladiny AGE (především karboxymethyllysinu) pravděpodobně modifikují i  $\beta_2M$ , který je u nemocných s renálním selháním významně zvýšený, a tím přispívají k jeho zvýšené reaktivitě a tvorbě depozit u  $A\beta_2M$  amyloidózy. Komplex AGE- $\beta_2M$  navíc atrahuje monocyty/makrofágy, které pak zvýšeně uvolňují řadu cytokinů. Současně může sti-

mulovat aktivitu osteoklastů a tím podporovat kostní resorpci se vznikem změn typických pro  $A\beta_2M$  amyloidózu [19].

Existuje několik hypotéz, které se snaží vysvětlit tvorbu fibril. Je to např. „krystalizační“ hypotéza, která předpokládá, že agregace fibril je procesem polymerace, kdy nejprve vzniká jádro, na které se později naváží další prekursory. Jiná hypotéza, „konformační“, předpokládá chybné prostorové uspořádání prekursoru, který se stává odolným vůči proteázám a indukuje chybné uspořádání i dalších bílkovin [20].

Amyloidová depozita se mohou ukládat do různých orgánů či tkání, ale ani u systémových amyloidóz není distribuce depozit rovnoměrná. Některé orgány bývají postiženy častěji než jiné, a i rozsah postižení uvnitř populace buněk stejného typu může být rozdílný (např. adipocytů). K rozvoji onemocnění a jeho lokalizaci proto mohou přispět i některé změny na lokální úrovni, které usnadní fibrilogenezi. Příkladem může být vliv abnormálního metabolismu proteinů bazální membrány glomerulů na rozvoj amyloidózy ledvin. Při experimentálně navozené sekundární amyloidóze u myši byla zaznamenána zvýšená exprese genů pro laminin B2, entaktin a  $\alpha 1$ -řetězec kolagenu IV s 2–3násobným zvýšením hladin jejich mRNA. Toto zvýšení lze pozorovat ještě před objevením amyloidových depozit, takže se předpokládá, že nejde o důsledek deponování amyloidu v bazálních membránách glomerulů, ale naopak o jeden z možných faktorů, který se na tvorbě depozit podílí [21]. Jednou vzniklé ložisko amyloidu dále působí jako nukleační faktor pro další depozici amyloidu.

Další patogenetický model předpokládá přímý vliv FLC (volných lehkých řetězců, free light chain) na metabolismus mezangiálních buněk ledvin. FLC se naváže na povrch mezangiálních buněk prostřednictvím receptoru pro LC a následně je internalizován a vychytáván lyzozomy. FLC intracelulárně spouští některé signální děje, kdy dochází k migraci c-fos a  $NF\kappa B$  do jádra buňky, výsledkem čehož je transkripce MCP-1 a PDGF- $\beta$ . MCP-1 funguje jako chemokin pro zánětlivé buňky. PDGF- $\beta$  způsobuje rozvláknění buněčného povrchu mezangiálních buněk, zvětšení jejich povrchu a následně expanzi mezangiální matrix. Aktivované mezangiální buňky současně zvýšeně exprimují metaloproteinázy (zejména

MMP-2), které vedou k destrukci extracelulární matrix, na jejíž místo se pak ukládají amyloidové fibrily [22].

Všechny typy amyloidu mají kromě specifické fibrilární komponenty společnou P komponentu (AP), jejímž cirkulujícím prekurzorem je SAP, patřící mezi proteiny akutní fáze, resp. kalcium-dependentní lektiny. P komponenta je složena z 10 glykosylovaných polypeptidových podjednotek tvořících dvě pentamerní matrice pootočené proti sobě o polovinu jednotky. AP tvoří jakýsi tmelící prvek spojující amyloidové fibrily v kompaktní hmotu. Tato hmotu tvoří 5–15 % amyloidových depozit. SAP má fyziologicky v organismu pozitivní vliv spočívající v ochraně buněčného chromatinu před působením protilátek, virů a bakterií. Váže se, pravděpodobně prostřednictvím  $\text{Ca}^{2+}$ , na buněčnou membránu bakterií a kvasinek [23]. V experimentu bylo prokazováno, že SAP-knock-outované myši mají výrazně vyšší hladiny autoprotilátek (antinukleární protilátky – ANAb, protilátky proti bazální membráně glomerulů – anti-GBM) a častější výskyt infekčních komplikací [24]. SAP využívaný pro tvorbu amyloidových depozit má delší poločas přežívání v plasmě a pro jeho vazbu na amyloidové fibrily je nezbytná přítomnost glykosaminoglykanů. Pokud se na SAP naváže kalcium, stává se rezistentním vůči proteolytické degradaci, což zřejmě přenáší i na amyloidová depozita.

Kromě těchto dvou základních složek (fibril a P komponenty) se na formaci amyloidových depozit podílejí ještě apolipoproteiny (především ApoE a ApoJ) a glykosaminoglykany (zejména heparansulfát). Ty mají vliv na přeměnu solubilních prekurzorů na nerozpustné fibrily a podporují tím uspořádání do formace  $\beta$ -skládaného listu. Kromě zmíněných složek se předpokládá ještě existence dalšího faktoru – AEF (amyloid enhancing factor), urychlujícího vznik amyloidu. Jde pravděpodobně o lyzozomální proteázu neutrofilních leukocytů nebo makrofágů, jejíž přesné složení není známé. Objevuje se v tkáních 24–48 hodin před vlastní depozicí amyloidu. Dopusud se tato látka získává extrakcí z amyloidových depozit a na její aktivitu by mohly mít vliv i některé růstové faktory (pro granulocyty – G-CSF či makrofágy – M-CSF) [25].

Příčina rezistence na proteolýzu je pravděpodobně multifaktoriální. Hlavní příčinou je kompaktnost fibrilární struktury

ry. Vzniklý amyloid neindukuje fagocytární reakci makrofágů. Dále se uvádí, že k rezistenci na proteolýzu významnou měrou přispívá přítomnost SAP. Proteolýza extracelulárně secernovanými proteázami je významně inhibována přítomností SAP. Na druhé straně pro možnost pomalé spontánní degradace amyloidu svědčí úbytek depozit vzniklých na podkladě  $A\beta_2M$  amyloidózy u pacientů hemodialyzovaných při renálním selhání, poté co podstoupili transplantaci ledviny, či u nemocných s AL amyloidózou, kde po HDM/ASCT došlo ke kompletní hematologické remisi.

### 2.4.1 AL amyloidóza

Prekurzorem u tohoto typu amyloidózy jsou buď kompletní imunoglobulinové LC, nebo jejich  $NH_2$ -koncové fragmenty. Amyloidogenní LC a jejich fragmenty vykazují obrovskou heterogenitu, a tak prakticky u každého nemocného je složení amyloidové fibrily jedinečné. Podle statistických údajů jsou více amyloidogenní LC  $\lambda$  (především typ VI), většinou se uvádí poměr  $\lambda/\kappa$  3 : 1, zatímco u nemocných s mnohočetným myelomem to bývá obráceně, přibližně 2 : 3 [26]. Nemocní, kteří mají AL amyloidózu z LC  $\lambda$ , mají predilekčně postižené ledviny, tam kde amyloidové fibrily obsahují LC  $\kappa$ , bývají dominantně postižená játra [27]. Mnohem více konformačních změn postihuje variabilní část LC imunoglobulinů (zejména  $V_{\lambda VI}$ ).

Podklad nadměrné produkce imunoglobulinů tkví v existenci patologického klonu plasmatických buněk. Počty buněk tohoto klonu v kostní dřeni bývají jen mírně zvýšené (norma do 5 %; zde bývá 5–10 %). Určitá mírná proliferace klonu plasmatických buněk je zodpovědná nejen za produkci paraproteinu (resp. LC), ale vede i k poruše vyžívání ostatních plasmatických buněk, a tím ke snížení syntézy vlastních protilátek s určitým stupněm humorálního imunodeficitu. Určitý stupeň poruchy vyžívání buněčných elementů v kostní dřeni může být způsoben také depozity amyloidu, která se mohou v kostní dřeni usazovat (postihuje kolem 20 % jedinců).

Amyloidogenní klon plasmatických buněk v kostní dřeni může obsahovat i některé další struktury, jako vyžralé B lymfocyty a plasmatické buňky z periferního poolu [28]. Výjimečně byl klon plasmatických buněk identifikován i v jiných

orgánech, např. ve slezině. V *in vitro* studiích bylo také prokázáno, že vlivem působení některých vnějších faktorů (zejména cytokinů, jako je IL-6, v součinnosti s dalšími cytokiny, např. IL-1 a TNF $\alpha$ ) může dojít k tomu, že se klony periferních plasmatických buněk přemění na klony, které jsou prakticky totožné s klony z kostní dřeně, a tyto cirkulující klony tedy mohou fungovat jako prekurzory schopné diferencovat se na dřevňové plasmatické buňky [29]. Tato pozorování ukazují na možnost intraklonální diferenciaci u nemocných s AL amyloidózou. Tato situace může do určité míry komplikovat i některá terapeutická opatření u nemocných s AL amyloidózou, jelikož tímto způsobem může dojít ke kontaminaci kmenových buněk, které se sbírají z periferie před ASCT, a to může být důvodem relapsu onemocnění [30].

Za normálních podmínek je *in vivo* tendence fibrilárních AL prekurzorů měnit strukturu a formovat amyloidogenní proteiny poměrně malá, na rozdíl od modelů *in vitro*, kde se to děje poměrně snadno. Odhaduje se, že jen asi 5 % monoklonálních LC formuje amyloidové fibrily. V jedné studii zahrnující 1384 nemocných s MGUS, kteří byli v průměru sledováni po dobu 10 let, se ukázalo, že AL amyloidóza se vyvinula jen u 10 nemocných [31]. Je proto jisté, že tvorbu amyloidových depozit usnadňují některé skutečnosti a určité podmínky, za kterých k změně struktury LC dochází. Patří mezi ně zejména to, jak velký fragment LC je syntetizován (menší rezidua mají větší sklon ke změně prostorového uspořádání), tvorba abnormálních disulfidových vazeb mezi LC a nízký izoelektrický bod. Významnou skutečností je také fakt, že amyloidogenicitu LC zvyšuje jejich posttranslační modifikace (glykosylace, cysteinylace, oxidace tryptofanu).

Byla tendence identifikovat nějaké genetické rysy, které by predikovaly, které LC jsou amyloidogenní a které jsou „pouhou“ součástí MGUS. Analýza genové exprese identifikovala celkem 12 genů, které mohou pomoci odlišit AL amyloidózu od mnohočetného myelomu s přesností 92 % [32]. Mezi tyto geny patří např. gen CCND1 pro cyklin D1. Plasmatické buňky u nemocných s AL amyloidózou zvýšeně exprimují cyklin D1, což může vést ke zvýšené produkci LC těmito buňkami [33]. Současně tyto buňky zvýšeně exprimují na svém povrchu nízkoafinní IgG Fc receptor CD32 B a kalretikulín (pleio-

tropní kalcium-dependentní vazač) [34]. Až 40 % plasmocytů na svém povrchu také exprimuje CD20 antigen, čehož by se potenciálně dalo využít při léčbě těchto pacientů [35]. Z dalších genetických abnormalit typických pro AL amyloidózu je možné jmenovat translokaci postihující 14q32 lokus (pro těžké řetězce Ig), která je přítomna až u 75 % případů [36]. Méně časté jsou translokace t(11;14) (q13; q32) či t(4;14) (p16.3; q32).

Všechny typy imunoglobulinů či jejich části mohou způsobovat renální poškození, pokud jsou syntetizovány v nadbytku. Jejich jak přímý, tak nepřímý toxický efekt může vést ke glomerulární i tubulární dysfunkci. Nepřímý toxický efekt se vysvětluje infiltrací tkání amyloidovými depozity, a tím narušením jejich integrální struktury, výsledkem čehož je selhávání funkce napadeného orgánu. Amyloidogenní fibrily, resp. prefibrilární oligomery, mohou však mít přímý cytotoxický efekt na buňky, typicky např. vliv amyloidogenních LC na poškození kardiomyocytů [37]. Fibrily zde mohou spustit oxidační stres, atrahovat chemokiny, zvyšovat produkci prozánětlivých cytokinů a navodit apoptózu kardiomyocytů. Zajímavé je, že ke zlepšení srdeční dysfunkce postiženého myokardu (monitorováno pomocí NT-proBNP) dochází za situace, kdy se chemoterapií podaří snížit či normalizovat koncentrace FLC v séru, aniž se přitom nějakým způsobem zmenší depozita amyloidu v myokardu. Tyto nálezy svědčí pro přímý cytotoxický vliv FLC na kardiomyocyty.

LC cirkulují v krvi ve formě monomerů (mol. hmotnost 22 000 Da) či dimerů (mol. hmotnost 44 000 Da) a jejich filtrace glomeruly závisí právě na jejich molekulové hmotnosti. Monomery volně procházejí do moči, zatímco filtrace dimerů dosahuje jen asi 8 % inulinové clearance u daného pacienta. LC  $\kappa$  existují ve formě monomerů, zatímco LC  $\lambda$  cirkulují jako dimery. Za normálních okolností jsou LC syntetizovány v nadbytku v porovnání s těžkými řetězci (zhruba o 40 % více). Dvě třetiny celkového množství produkováných LC představují řetězce  $\kappa$ , proto je poměr  $\kappa/\lambda$  za normálních podmínek 1,8 : 1. Ty LC, které se nespotřebují pro syntézu imunoglobulinů, se proto dostávají do cirkulace ve formě FLC (zhruba 500 mg/d). FLC mají v plasmě krátký poločas ( $\kappa$  2–4,  $\lambda$  3–6 hodin) a velmi rychle se distribuují do různých tkání,

a tak 80 % všech FLC v organismu je uloženo extravaskulárně. To je velmi důležité z pohledu jejich následného odstraňování z organismu. Ledviny jsou ústředním orgánem odpovědným za metabolismus LC imunoglobulinů. I u zdravých jedinců lze prokázat malé množství FLC v moči, jejich vylučování většinou nepřesáhne 10 mg/d. Za normálních okolností je totiž 99 % profiltrovaných LC reabsorbováno (pomocí endocytózy a transportních proteinů megalinu a cubilinu) a hydrolyzováno epitelem proximálních tubulů na aminokyseliny a peptidy. Ledviny jsou schopny tímto mechanismem denně metabolizovat 10–30 g FLC. Pokud dojde k překročení kapacity proximálních tubulů pro zpětnou resorpci LC, dostávají se do moči a následně dochází k rozvoji známé Bence-Jonesovy proteinurie (BJP). BJP je vlastně původní označení pro přítomnost FLC v moči. BJ protein vykazuje specifické vlastnosti. Při zahřátí moči na 40–60 °C dochází k jeho precipitaci, zatímco během varu či při pokojové teplotě se kompletně rozpustí. Těto unikátní vlastnosti BJP si poprvé všiml londýnský praktik dr. William MacIntyre, který moč svého nemocného s mnohočetným myelomem (MM) odeslal k analýze dr. Henrymu Bence-Jonesovi. Ten pak zajímavý nález publikoval v roce 1847 v Lancetu.

Jakákoli forma renálního (zejména tubulárního) poškození snižuje reabsorpci a degradaci LC a tím zvyšuje jejich exkreci [38]. U nemocných s renálním selháním se poločas FLC v plasmě prodlužuje až na 2–3 dny a tito nemocní mají 20–30× vyšší hladiny v porovnání se zdravými kontrolami [39]. Koncentraci LC v séru monitorujeme pomocí FLC, které do značné míry korespondují s produkcí LC v kostní dřeni.

AL amyloidóza komplikuje průběh mnohočetného myelomu u 5–10 % pacientů. Vyskytuje se i u řady dalších maligních hematologických onemocnění (Waldenströмова makroglobulinemie, chronická lymfatická leukemie, non-hodgkinské lymfomy či POEMS syndrom), nicméně v 60–70 % zůstává projevem MGUS, benigní formy paraproteinemie. Obě pohlaví jsou AL amyloidózou postižena stejně s mírně vyšší incidencí u mužského pohlaví. Onemocnění se většinou manifestuje mezi 50. a 60. rokem života, ale výjimkou nejsou ani jedinci mladší 40 let či naopak ve věku nad 80 let.