

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**SCREENING SYSTÉMOVÝCH AMYLOIDÓZ  
V MATERIÁLU ENDOSKOPICKÝCH BIOPSÍÍ**

**Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2018**

**Martin Květoň**

## **PODĚKOVÁNÍ**

V první řadě bych rád poděkoval přednostce Pracoviště klinické a transplantační patologie IKEM, doc. MUDr. Evě Honsové, Ph.D. za vstřícnost a ochotu umožnit mi další vzdělávání, a také za rady a při vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěl za trpělivost a pomoc poděkovat celému kolektivu mých kolegů a kolegyně. V neposlední řadě děkuji vedoucímu práce, prof. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za rady a cenné připomínky.

### **ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

.....

Bc. Martin Květoň

# ABSTRAKT

---

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

Diplomová práce  
Kandidát: Bc. Martin Květoň  
Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách  
Školitel: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.  
Název: Screening systémových amyloidóz v materiálu endoskopických biopsií

## CÍL PRÁCE

Systémové amyloidózy tvoří komplexní a heterogenní skupinu závažných onemocnění, které jsou výsledkem konformační poruchy proteinů a jejichž společným znakem je ukládání patologických proteinových hmot (amyloidu) v extracelulárním prostoru tkání. Diagnostika amyloidóz je založena na histopatologickém vyšetření tkáňových vzorků a přímé demonstraci přítomnosti amyloidových depozit. Celkovým účelem této diplomové práce bylo vytvořit, aplikovat a následně evaluovat screeningový program zaměřený na systémové amyloidózy.

## METODY

V první části experimentální studie byly porovnány dostupné barvicí techniky, používané k průkazu amyloidových hmot ve tkáni. Druhá část experimentální studie spočívala v provádění screeningových vyšetření u endoskopických biopsických vzorků gastrointestinálního traktu.

## VÝSLEDKY

Na základě výsledků porovnání byla jako vhodná screeningová technika zvolena metoda, využívající barvivo Sirius red F3B. V rámci screeningového programu bylo histopatologicky vyšetřeno celkem 4285 vzorků od 2572 pacientů. U celkem deseti vzorků od pěti pacientů byla v biopsiích zachycena amyloidová depozita a u čtyř pacientů byla provedena typizace amyloidózy.

## ZÁVĚRY

Cíle, které byly v úvodu této diplomové stanoveny, se podařilo naplnit. Z dostupné odborné literatury byl sestaven up-to-date přehled základních informací o systémových amyloidózách. Mezi histopatologickými technikami byla experimentálně vybrána ta, která se nejvíce hodí pro screeningové použití a následně bylo otestováno 4285 vzorků od 2572 pacientů. Výsledky mají navíc pro screeningem zachycené pacienty reálný klinický význam, protože umožnily zahájení odpovídající terapie.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** Systémové amyloidózy, Amyloid, Screening, Sirius red F3B, Histopatologie

# ABSTRACT

---

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Biological and Medical Sciences

Diploma thesis  
Candidate: Bc. Martin Květoň  
Branch of study: Specialist in Laboratory Methods  
Supervisor: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.  
Title: Screening for systemic amyloidoses in endoscopic biopsy samples

## BACKGROUND

Systemic amyloidoses constitute a complex and heterogeneous group of serious diseases that result from protein misfolding and whose common feature is the deposition of pathological protein substances (amyloid) in the extracellular space of tissues. Diagnostics of amyloidoses is based on histopathological examination of tissue samples and direct demonstration of the presence of amyloid deposits. The overall purpose of this diploma thesis was to create, apply and subsequently evaluate a screening program focused on systemic amyloidoses.

## METHODS

In the first part of the experimental study, available staining techniques used for the detection of amyloid deposits in the tissue were compared. The second part of the experimental study consisted of performing screening examinations on endoscopic biopsy samples of the gastrointestinal tract.

## RESULTS

Based on the results of comparison, a method employing the Sirius red F3B dye was chosen as a suitable screening technique. Within the screening program, a total of 4285 samples from 2572 patients were histopathologically examined. In a total of ten samples from five patients, amyloid deposits were found, and typing of amyloidosis was performed in four patients.

## CONCLUSIONS

The aims set at the beginning of this thesis have been met. An up-to-date summary of basic information on systemic amyloidoses has been assembled from available literature. Among histopathological techniques has been experimentally selected the one that is most suitable for screening use, followed by the examination of a total of 4285 samples from 2572 patients. In addition, the results have been clinically relevant to the screened patients, since they enabled an appropriate therapy to be initiated.

**KEYWORDS:** Systemic amyloidoses, Amyloid, Screening, Sirius red F3B, Histopathology

# OBSAH

---

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>CÍL A ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÝ ZÁKLAD PRÁCE</b> .....	<b>11</b>
3.1	HISTORIE .....	11
3.1.1	<i>Stručný historický vývoj diagnostiky amyloidóz</i> .....	11
3.1.2	<i>Z historie medicínského screeningu</i> .....	12
3.2	AMYLOID A AMYLOIDÓZA OBECNĚ.....	13
3.3	STRUKTURA AMYLOIDU.....	15
3.3.1	<i>Nativní struktura proteinů</i> .....	15
3.3.2	<i>Mechanismy udržující proteostázu</i> .....	15
3.3.3	<i>Struktura amyloidových fibril</i> .....	15
3.3.4	<i>Oligomery a fibrilogeneze</i> .....	17
3.3.5	<i>Další komponenty depozit</i> .....	17
3.4	OBECNÉ PRINCIPY PATOGENEZE AMYLOIDÓZ .....	18
3.4.1	<i>Tkáňová specificita</i> .....	19
3.5	NOMENKLATURA AMYLOIDÓZ.....	20
3.6	ZÁKLADNÍ INFORMACE K VYBRANÝM TYPŮM AMYLOIDÓZ .....	23
3.6.1	<i>AA amyloidóza – Sérový amyloid A</i> .....	23
3.6.2	<i>AL amyloidóza – Lehké řetězce imunoglobulinů</i> .....	24
3.6.3	<i>Hereditární amyloidózy</i> .....	25
3.6.3.1	<i>ATTR amyloidóza – Transthyretin</i> .....	27
3.6.3.2	<i>AApoAI amyloidóza – Apolipoprotein A-I</i> .....	27
3.6.3.3	<i>AApoAII amyloidóza – Apolipoprotein A-II</i> .....	27
3.6.3.4	<i>ACys amyloidóza – Cystatin C</i> .....	28
3.6.3.5	<i>AFib amyloidóza – Fibrinogen A<math>\alpha</math></i> .....	28
3.6.3.6	<i>AGel amyloidóza – Gelsolin</i> .....	28
3.6.3.7	<i>ALys amyloidóza – Lysozym</i> .....	28
3.6.4	<i>Další typy systémových amyloidóz</i> .....	28
3.6.4.1	<i>ALECT2 amyloidóza – Leukocytární chemotaktický faktor 2</i> .....	28
3.6.4.2	<i>A<math>\beta</math>2M amyloidóza – <math>\beta</math>2-mikroglobulin</i> .....	29
3.7	POSTIŽENÍ GIT U SYSTÉMOVÝCH AMYLOIDÓZ .....	29
3.8	DIAGNOSTIKA SYSTÉMOVÝCH AMYLOIDÓZ .....	31
3.8.1	<i>Diagnostika</i> .....	31
3.8.2	<i>Průkaz amyloidu</i> .....	31
3.8.3	<i>Biopsie pro průkaz amyloidu</i> .....	32
3.8.4	<i>Další techniky průkazu amyloidu</i> .....	33
3.8.5	<i>Typizace</i> .....	33
3.8.6	<i>Proteomika</i> .....	34
3.9	ZDRAVOTNICKÝ SCREENING.....	35
<b>4</b>	<b>ÚVOD EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI</b> .....	<b>37</b>
4.1	POUŽÍVANÁ ZAŘÍZENÍ, SPOTŘEBNÍ MATERIÁL A CHEMICKÉ LÁTKY .....	37
4.1.1	<i>Zařízení</i> .....	37
4.1.2	<i>Spotřební materiál</i> .....	38
4.1.3	<i>Chemikálie</i> .....	39
4.1.4	<i>Další reagenty</i> .....	40
4.2	METODIKA ZPRACOVÁNÍ BIOLOGICKÝCH VZORKŮ .....	41
4.2.1	<i>Odběr a transport biologického materiálu</i> .....	41

4.2.2	<i>Histopatologické vyšetření tkáňového vzorku</i>	41
4.2.2.1	<i>Proces převedení tkáňového vzorku do matricového média</i>	42
4.2.2.2	<i>Faktory ovlivňující rychlost a kvalitu dílčích kroků tkáňového procesu</i>	44
4.2.2.3	<i>Zhotovení tkáňových řezů</i>	45
4.2.2.4	<i>Histologická barvení</i>	45
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST I: VÝBĚR VHODNÉ SCREENINGOVÉ TECHNIKY</b>	<b>48</b>
5.1	POUŽITÁ BARVIVA A METODICKÉ POSTUPY BARVICÍCH TECHNIK	48
5.1.1	<i>Kongo červen</i>	48
5.1.1.1	<i>Kongo červen – metoda dle Highmana</i>	50
5.1.1.2	<i>Kongo červen – metoda dle Stokesa</i>	51
5.1.2	<i>Sirius red F3B</i>	52
5.1.2.1	<i>Sirius red – metoda dle Llewellyna</i>	54
5.1.2.2	<i>Sirius red – metoda dle Steinera</i>	55
5.1.3	<i>Thioflavin T</i>	56
5.1.3.1	<i>Thioflavin T – metoda dle Vassara a Cullinga</i>	57
5.1.3.2	<i>Thioflavin T při pH 1,5 – metoda dle Burnse</i>	58
5.2	HODNOCENÍ BARVICÍCH TECHNIK	59
5.2.1	<i>Hodnocené parametry</i>	59
5.2.2	<i>Přímé mikroskopické porovnání</i>	60
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI I</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST II: VLASTNÍ SCREENINGOVÝ PROGRAM</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI II</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>DISKUSE</b>	<b>66</b>
<b>10</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>68</b>
<b>11</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ</b>	<b>69</b>
<b>12</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK</b>	<b>74</b>
<b>13</b>	<b>APPENDIX I – SAA, SAP</b>	<b>75</b>
<b>14</b>	<b>APPENDIX II – HISTOLOGICKÁ BARVENÍ NA AMYLOID</b>	<b>76</b>

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>OBRÁZEK 1</b> STRUKTURA MOLEKULY KČ.....	48
<b>OBRÁZEK 2</b> STRUKTURA MOLEKULY BARVIVA SIRIUS RED F3B.....	52
<b>OBRÁZEK 3</b> NESPECIFICKÁ VAZBA BARVIVA SIRIUS RED F3B NA CYTOPLAZMATICKÁ GRANULA. ....	53
<b>OBRÁZEK 4</b> FALEŠNÁ POZITIVITA PŘI POUŽITÍ BARVIVA SIRIUS RED F3B.....	53
<b>OBRÁZEK 5</b> STRUKTURA MOLEKULY BARVIVA THIOFLAVIN T.....	56
<b>OBRÁZEK 6</b> KČ DLE STOKESE. SLIZNICE TENKÉHO STŘEVA S DEPOZITY AMYLOIDU. ....	60
<b>OBRÁZEK 7</b> SIRIUS RED DLE ŠTEINERA & THIOFLAVIN T DLE BURNSE. TENSKÉ STŘEVO S AMYLOIDEM... 61	
<b>OBRÁZEK 8</b> KČ DLE STOKESE. SLIZNICE TENKÉHO STŘEVA S DEPOZITY AMYLOIDU.....	61
<b>OBRÁZEK 9</b> SIRIUS RED DLE ŠTEINERA & THIOFLAVIN T DLE BURNSE. TENSKÉ STŘEVO S AMYLOIDEM... 61	
<b>OBRÁZEK 10</b> KČ DLE STOKESE. ARTERIE S DEPOZITY AMYLOIDU VE VAZIVOVÉM POUZDŘE LEDVINY. ....	62
<b>OBRÁZEK 11</b> SIRIUS RED DLE ŠTEINERA & THIOFLAVIN T DLE BURNSE. ARTERIE S DEPOZITY.....	62
<b>OBRÁZEK 12</b> KČ DLE STOKESE. GLOMERULY A CÉVY V KŮŘE LEDVINY S OBJEMNÝMI DEPOZITY .....	76
<b>OBRÁZEK 13</b> THIOFLAVIN T DLE BURNSE. DEPOZITA V LEDVINĚ A STĚNĚ ŽALUDKU.....	76
<b>OBRÁZEK 14</b> SIRIUS RED DLE ŠTEINERA. DEPOZITA V MYOKARDU A V KŮŘE LEDVINY.....	77
<b>OBRÁZEK 15</b> SIRIUS RED DLE ŠTEINERA. DROBNÁ DEPOZITA VE SLIZNICI TLUSTÉHO STŘEVA. ....	77
<b>OBRÁZEK 16</b> KČ DLE STOKESE. DEPOZITA V CÉVÁCH V TUNICA SUBMUCOSA.....	77

## SEZNAM SCHÉMÁT

<b>SCHÉMA 1</b> GRAFICKÉ VYOBRAZENÍ ZÁKLADNÍCH KROKŮ HISTOPATOLOGICKÉHO VYŠETŘENÍ. ....	41
<b>SCHÉMA 2</b> ZÁKLADNÍ KROKY PROCESU PŘEVEDENÍ TKÁŇE DO MATRICOVÉHO MÉDIA. ....	42
<b>SCHÉMA 3</b> ZÁKLADNÍ KROKY PROCESU HISTOLOGICKÉHO BARVENÍ.....	45

## SEZNAM TABULEK

<b>TABULKA 1</b> NEJČASTĚJŠÍ TYPY SYSTÉMOVÝCH AMYLOIDÓZ. ....	13
<b>TABULKA 2</b> ZNÁMÉ LIDSKÉ AMYLOIDOVÉ PROTEINY.....	22
<b>TABULKA 3</b> DALŠÍ FORMY HEREDITÁRNÍCH SYSTÉMOVÝCH AMYLOIDÓZ. ....	26
<b>TABULKA 4</b> SEZNAM POUŽÍVANÝCH ZAŘÍZENÍ.....	37
<b>TABULKA 5</b> SEZNAM POUŽÍVANÉHO SPOTŘEBNÍHO MATERIÁLU. ....	38
<b>TABULKA 6</b> SEZNAM POUŽÍVANÝCH CHEMIKÁLIÍ. ....	39
<b>TABULKA 7</b> DALŠÍ POUŽÍVANÉ REAGENCIE.....	40
<b>TABULKA 8</b> STANDARDNÍ PROGRAM AUTOTECHNIKONU. ....	44
<b>TABULKA 9</b> POSTUP DEPARAFINACE. ....	46
<b>TABULKA 10</b> POSTUP ZAVODNĚNÍ TKÁŇOVÝCH ŘEZŮ PŘED BARVENÍM. ....	46
<b>TABULKA 11</b> POSTUP ODVODNĚNÍ A PROJASNĚNÍ OBARVENÝCH ŘEZŮ. ....	46
<b>TABULKA 12</b> METODICKÝ POSTUP BARVENÍ KČ DLE HIGHMANA.....	50
<b>TABULKA 13</b> METODICKÝ POSTUP BARVENÍ KČ DLE STOKESE.....	51
<b>TABULKA 14</b> METODICKÝ POSTUP BARVENÍ SIRIUS RED DLE LLEWELLYNA. ....	54
<b>TABULKA 15</b> METODICKÝ POSTUP BARVENÍ SIRIUS RED DLE ŠTEINERA .....	55
<b>TABULKA 16</b> METODICKÝ POSTUP BARVENÍ THIOFLAVINEM T DLE VASSARA A CULLINGA.....	57
<b>TABULKA 17</b> VÝSLEDKY POROVNÁNÍ PARAMETRŮ BARVICÍCH METOD. ....	63
<b>TABULKA 18</b> PŘEHLED POČTU PROVEDENÝCH SCREENINGOVÝCH VYŠETŘENÍ.....	65
<b>TABULKA 19</b> ZÁKLADNÍ ÚDAJE O PACIENTECH S SA ZACHYCENÝCH SCREENINGOVÝM PROGRAMEM. ....	65
<b>TABULKA 20</b> SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK. ....	74



# 1 ÚVOD

---

Systémové amyloidózy tvoří komplexní a heterogenní skupinu závažných onemocnění, která jsou výsledkem konformační poruchy proteinů a jejichž společným znakem je ukládání patologických proteinových hmot (amyloidu) v extracelulárním prostoru tkání. Tato depozita jsou tvořena nerozpustnými agregáty patologických proteinů. Jejich ukládání, společně s přímým toxickým účinkem, představují dvě hlavní příčiny poškození mnohočetných orgánů. Přestože jsou systémové amyloidózy považovány za vzácná onemocnění, tvoří klinicky významnou skupinu chorob a setkáváme se s nimi zejména v oblasti nefrologie a kardiologie. Amyloidózy jsou však kvůli nespecifickým a heterogenním projevům často diagnostikovány v již pokročilém stádiu.

Diagnostika amyloidóz je založena na histopatologickém vyšetření tkáňových vzorků a přímé demonstraci přítomnosti amyloidových depozit. K průkazu amyloidu ve vzorcích tkáně je používána celá řada metod, založených jak na klasické parafinové histologii, dále imunohistochemie a imunofluorescenční techniky, ale také transmisní elektronová mikroskopie. Zejména v posledních letech se začínají uplatňovat také pokročilé proteomické metody, nicméně histopatologické vyšetření s použitím Kongo červeně zůstává zlatým standardem a rutinně nejvyžívanější technikou diagnostiky amyloidóz.

Protože stěna orgánů gastrointestinálního traktu je u systémových amyloidóz jednou z často postižených anatomických lokalit, jsou pacienti podstupující gastrokopické a kolonoskopické vyšetření vhodnou skupinou pro screeningová vyšetření. [1] [2] Screening slouží jako filtr, který pacienty roztrídí na dvě skupiny. První skupinou jsou ti, kteří zkoumaným onemocněním s největší pravděpodobností netrpí, druhou skupinou jsou pacienti, u kterých je na základě testu či vyšetření suspekce na to, že dané onemocnění u nich probíhá.

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat teoretickou studii, z dostupných histopatologických technik vybrat tu, která by se na screeningové vyšetření hodila nejvíce, zvolenou techniku následně zavést a ověřit její výtěžnost v praxi.

## 2 CÍL A ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

---

Celkovým účelem této diplomové práce (dále jen „DP“) bylo vytvořit, aplikovat a následně evaluovat screeningový program zaměřený na systémové amyloidózy. K jeho naplnění bylo třeba dosáhnout několika dílčích cílů:

- 1) Provést rešerši odborné literatury, zaměřenou na problematiku amyloidóz a obecných principů medicínského screeningu.
- 2) Popsat a s ohledem na screeningové zaměření porovnat metody histopatologické diagnostiky amyloidóz.
- 3) Provést vlastní screening a retrospektivně vyhodnotit jeho účelnost.

## 3 TEORETICKÝ ZÁKLAD PRÁCE

---

### 3.1 HISTORIE

#### 3.1.1 Stručný historický vývoj diagnostiky amyloidózy

V roce 1639 popsal Nicolaus Fontanus případ muže, který trpěl epistaxí, žloutenkou, ascitem a ložisky abscesu v játrech. Popsal také, že muž měl zvětšenou slezinu, vyplněnou „bílymi kameny“. Tento popis je pravděpodobně prvním záznamem tzv. ságové sleziny s objemnými ložisky amyloidu. Během 17. a 18. století bylo popsáno mnoho případů, které dobově neměly přesnou diagnózu, avšak z dnešního pohledu se pravděpodobně jednalo o amyloidózu. Thomas Bartholin ve své publikaci „Historiarum Anatomicarum Rariorum“ z roku 1654 popisuje případ ženy, jejíž slezina byla tak tuhá, že bylo obtížné ji rozříznout nožem a která při tom vydávala zvuk, jako kdyby řezal ztrouchnivělý trám. [3]

Termín amyloid poprvé použil německý botanik Matthias Schleiden při popisu škrobových látek v rostlinách. V medicíně tento termín zavedl Rudolph Virchow, který se snažil prokázat škrobovou povahu corpora amylacea pomocí reakce s jodem. Podobnou reakci poté provedl na orgánech zemřelých, kteří trpěli amyloidózou. Takto objevil depozita v glomerulech a také aferentních arteriolách ledvin. Virchowova jodová reakce představovala první molekulární interakci, identifikovanou jako vlastnost tkáně obsahující amyloidová depozita. Ačkoli bylo později prokázáno, že se Virchow v polysacharidové povaze popisovaných depozit mýlil, pojem amyloid se již zachoval. [4] [5] [6]

U pacientů Virchow dále popsal postižení gastrointestinálního traktu (dále jen „GIT“) a došel k závěru, že bledý vzhled postižených orgánů je způsoben nedostatečným krevním zásobením, které je zapříčiněno poškozením cévních stěn. [3] [5]

V roce 1852 vyslovil George Budd domněnku, že nadbytečná hmota v orgánech pacientů má charakter proteinů. Povaha depozit však nebyla přesvědčivě prokázána až do roku 1859, kdy díky vysokému obsahu dusíku jejich proteinový původ objasnili Carl Friedreich a August Kekule. Histologický průkaz amyloidových depozit byl pak výrazně posunut kupředu v roce 1875, kdy AndreÅ-Victor Cornil v Paříži, Richard Heschl ve Vídni a Rudolph Jürgens v Berlíně nezávisle na sobě demonstrovali metodu využívající k průkazu amyloidu anilinová barviva. Barvení methylovou violetí jasně prokázalo extracelulární povahu amyloidových depozit (dále jen „AD“). Přestože tyto metachromatické metody byly všeobecně přijaty jako efektivnější než Virchowův způsob detekce s použitím jodu a kyseliny sírové, Virchow sám tyto metody odmítal i deset let po jejich objevení. [3]

Zlomovým okamžikem v histologickém průkazu amyloidu, se stal rok 1922, kdy Hermann Bannhold zavedl do klinické praxe barvení pomocí Kongo červeně (dále jen „KČ“). To je až doposud zlatým standardem pro průkaz AD ve tkáních. V roce 1927 byl poprvé popsán charakteristický zelený dvojlom, který vykazují AD barvená KČ při pozorování v polarizovaném světle. [3]

K velkému pokroku v osvětlení amyloidóz došlo ve druhé polovině 20. století, kdy vývoj moderních metod umožnil jak hlubší zkoumání vlastností a strukturálního uspořádání amyloidových depozit, tak rozvoj klinických a diagnostických technik. [6]

Fibrilární struktura amyloidu byla potvrzena v roce 1959, kdy Cohen a Calkins pozorovali depozita v elektronovém mikroskopu a odhalili, že jejich základem jsou diskrétní fibrily. [3] Fibrilární ultrastruktura se pak stala jedním ze základních parametrů, které musí splňovat každý materiál který má být považován za amyloid. [6]

První protein, identifikovaný coby amyloidový prekurzor, byl lidský lehký imunoglobulinový řetězec. Ten byl extrahován z tkáně pacienta s klinickým stavem zvaným „primární amyloidóza“. První identifikovaný non-Ig amyloidový protein (dále jen „AP“) byl AA amyloid, izolovaný od Izraelského pacienta, který trpěl Familiární středozemní horečkou a „sekundární amyloidózou“. [6]

S využitím proteomických technik byla v posledních letech objevena takřka univerzální „amyloidová proteinová signatura“, která zahrnuje spektrum proteinů asociovaných s amyloidovými depozity. Mezi tyto proteiny patří mimo jiné sérový amyloidový protein (dále jen „SAP“), apolipoprotein E a apolipoprotein A-IV. Kromě dalších často nalézáných proteinových složek AD představují tyto konkrétní proteiny jakýsi „otisk prstu“, který by mohl být potenciálním nástrojem pro proteomickou diagnostiku amyloidóz. [7]

### **3.1.2 Z historie medicínského screeningu**

Medicínský screening v dnešním pojetí existuje zhruba šedesát let, a jeho bohatá historie z větší části stále čeká na podrobné zmapování. Snaha odhalit počínající onemocnění v jeho preklinické fázi, se stala jedním ze základních nástrojů moderní medicíny, a také zájmem orgánů ochrany veřejného zdraví. Největší rozvoj screeningových programů se odehrál v období po konci druhé světové války, kdy došlo k vzájemnému propojení mnohdy nově objevených diagnostických nástrojů s moderními terapeutickými postupy, a k zavádění racionálních kritérií, kladoucích důraz na správné nastavení parametrů screeningových programů. [8]

Nejstarší dostupné záznamy o prováděném screeningu pocházejí zřejmě z roku 1911, kdy Armáda Spojených států amerických začala rutinně provádět psychologické testování všech rekrutů. Cílem bylo vyloučit všechny uchazeče, kteří by narušovali jednotu a organizaci armády. I další z počátečních rozšířenějších screeningových programů byly spojeny s armádou. Mezi první a druhou světovou válkou bylo mezi vojáky zavedeno rutinní vyšetření na syfilis, které bylo ještě posíleno s objevem a rozšířením penicilinu po roce 1944. [8]

Jedním z prvních masových civilních screeningových programů bylo testování na diabetes mellitus, které probíhalo v letech 1946–1947 mezi obyvateli Oxfordu ve státě Massachusetts. Z tehdejších 4983 obyvatel jich bylo vyšetřeno cca 70 %. Dalším příkladem je gynekologický screening cervikálního karcinomu, který představili Papanicolaou a Traut v roce 1943. Cytologický Pap test se poté v průběhu čtyřicátých let masově rozšířil a zůstává důležitým screeningovým nástrojem dodnes. [8]

## 3.2 AMYLOID A AMYLOIDÓZA OBECNĚ

Amyloid tak, jak ho v obecné rovině chápeme dnes, je nerozpustná fibrilární proteinová hmota, uložená v extracelulárním prostoru orgánů a tkání jako důsledek celé řady funkčních a strukturálních změn, jejichž vyústěním je porucha přirozené konformace proteinů. Přítomnost amyloidu způsobuje klinický stav zvaný amyloidóza. [9] [10]

Amyloidóza je označení používané pro heterogenní skupinu onemocnění, dělících se do dvou hlavních skupin: 1. systémové a 2. lokalizované amyloidózy. Hlavní nástroj pro definování povahy onemocnění využívá vztah mezi místem sekrece amyloidového prekurzoru a místem jeho deponování. U systémové amyloidózy (dále jen "SA") je prekurzor uvolňován nejméně na jednom místě, poté transportován prostřednictvím krevního oběhu, a následně se ukládá na místě jiném. Naproti tomu typický proteinový prekurzor u lokalizovaných forem amyloidózy je zpravidla produkován přímo v místě vzniku depozita nebo v jeho těsné blízkosti. [9] [11]

Zatím je známo přes třicet proteinů, které dávají vzniknout amyloidu u lidí. Nové (zejména proteomické) techniky analýzy, využívající mj. hmotnostní spektrometrii však naznačují, že potenciál tvořit amyloid má mnohem více proteinů. [12] [13]

Hlavní složkou AD jsou amyloidové fibrily. Proteinové jednotky jsou ve fibrilách uspořádány v konformaci  $\beta$ -skládaného listu. Fibrily jsou stálé a rezistentní i k působení proteáz. [10] Každý typ amyloidózy je spojen s jedním určitým AP. Tento protein může být normální, tzv. „wild-type“, nebo (zejména v případě familiálních forem amyloidózy) mutantní. Kromě vlastních amyloidových fibril existují další typické komponenty depozit. [9] [11] [13]

Tabulka 1 ukazuje šest nejčastějších forem SA. Celá skupina je heterogenní v mnoha parametrech, mezi které se řadí místo produkce amyloidogenního proteinu, klinický obraz choroby, ale také plán terapeutického procesu. Je proto nezbytné, aby byl před zahájením terapie jednoznačně identifikován protein, který onemocnění vyvolává. Mezi terapeutické postupy patří, kromě farmakoterapie, například transplantace jater nebo kmenových buněk hematopoézy. [14]

**Tabulka 1** Nejčastější typy systémových amyloidóz. Zdroj: [14].

Typ	Zkratka	Prekurzor	Místo syntézy	Popis
<b>Amyloidóza z lehkých řetězců imunoglobulinů</b>	AL	Monoklonální lehké řetězce imunoglobulinů	Kostní dřeň, plazmatické buňky	Primární, ve spojení s mnohočetným myelomem (cca 10–15 % pacientů). Postižení srdce, ledvin, jater, GIT, periferních nervů atd.
<b>Reaktivní AA amyloidóza</b>	AA	Sérový amyloid A	Játra	V důsledku zvýšené hladiny SAA při chronických zánětech. Postižení ledvin, GIT, jater, sleziny, nervů.

<b>Senilní systémové amyloidózy</b>	SSA AATTRwt	Wild-type transthyretin	Játra > 90 %	Spojené s procesem stárnutí (převážně muži nad 65 let). Primárně postižení srdce a cév.
<b>Amyloidóza vycházející z mutantního transthyretinu</b>	ATTR	Více než 100 známých amyloidogenních mutací transthyretinu	Játra > 90 %	Vrozené. Postižení periferních nervů, srdce, očí atd.
<b>Amyloidóza vycházející z fibrinogenu</b>	AFib	Varianty $\alpha$ řetězce fibrinogenu	Játra	Vrozené. Primárně poškození ledvin.
<b>Apolipoprotein AI amyloidóza</b>	AApoAI	Varianty apolipoproteinu AI	Játra, GIT	Vrozené. Poškození srdce, jater, ledvin, kůže atd.

Nejčastějším typem amyloidózy v západních zemích je podle Britského National Amyloidosis Centre v současnosti AL amyloidóza, která představuje až 67 % všech případů. Dříve rozšířená AA amyloidóza dnes, díky pokročilejší terapii zánětlivých onemocnění, představuje ve vyspělých zemích pouze cca 6,8 % případů. Naopak na vzestupu je výskyt diagnostikovaných případů ATTRwt amyloidózy, která tvoří až 6,4 % z jejich celkového počtu, a je spojována s tzv. senilní systémovou amyloidózou. [13]

SA jsou často spojeny s postižením ledvin, které se obvykle nejprve manifestuje jako asymptomatická proteinurie, nebo později nefrotický syndrom. Někteří pacienti nemusí mít proteinurii prakticky vůbec. Heterogenní klinický obraz renálního poškození je dán faktem, že u některých pacientů, resp. u některých typů amyloidózy, je dominantní vaskulární postižení, zatímco u jiných jsou AD přítomna v glomerulech, nebo v peritubulárních oblastech dřeně. Časté je renální postižení u AL a AA amyloidózy, méně obvyklé u ATTR a některých dalších typů hereditárních amyloidóz. Postižení ledvin může být významné také u AFib, ALECT2, AApoAI, AApoAII a AApoAIV amyloidóz. [15]

Ačkoli nejčastěji postiženým orgánem u SA jsou ledviny, hlavní příčinou úmrtí pacientů je poškození srdce, které se vyskytuje až u 50 % pacientů s AL amyloidózou. [13]

Diagnostika SA je založena na vyšetření tkáňových biopsií. Její nedílnou součástí je nejen demonstrace přítomnosti depozit ve tkáni, ale také typizace AP. Typizace, tedy jednoznačné určení konkrétního proteinu tvořícího amyloidové fibrily, je zcela nezbytná s ohledem na rozdíly v prognóze a v terapii onemocnění. [12] Medián věku pacientů, kterým je nově diagnostikována SA, je 68 let. Muži představují 61,7 % případů a tvoří tak signifikantní většinu. [16]

V souvislosti se stárnutím, ale také s konkrétními onemocněními, jsou často přítomny specifické formy lokalizovaných depozit amyloidu. Dobře známa jsou ložiska A $\beta$ -amyloidu (spojená s Alzheimerovou chorobou) a AIAPP-amyloidu (přítomná v Langerhansových ostrůvcích u pacientů s diabetem II. typu). [11]

U některých degenerativních onemocnění, spojených mj. s procesem stárnutí, bylo prokázáno hromadění patologických amyloidových fibril. Mezi tato onemocnění patří například Alzheimerova choroba, Parkinsonova anebo Huntingtonova choroba. [17] Jmenovaná onemocnění jsou spojena se vznikem intracelulárních proteinových inkluzí fibrilární povahy, vykazujících jednu nebo více vlastností charakteristických pro amyloid. Nejvýznamnější z této skupiny jsou tzv. Tau proteiny, tvořící spolu s A $\beta$  amyloidem neurofilamentární klubíčka v cytoplazmě neuronů u pacientů s Alzheimerovou chorobou. Intracelulární formy amyloidu nicméně nejsou v současné klasifikaci a nomenklatuře amyloidóz zahrnuty. [10]

### **3.3 STRUKTURA AMYLOIDU**

#### **3.3.1 Nativní struktura proteinů**

Molekulární struktura proteinů se jak *in vivo*, tak *in vitro* neustále mění, rotuje a vibruje. To, co nazýváme strukturou proteinu, je pouze nejpravděpodobnější okamžitá konformace, založená na energetických vztazích mezi funkčními skupinami, vytvořená s ohledem na termodynamické zákony. Je neustále ovlivňována interakcemi s prostředím a dalšími molekulami v něm. Ty mohou vést ke změnám, sloužícím jako dílčí část spouštěcího mechanismu vzniku amyloidových fibrilárních struktur. [18]

#### **3.3.2 Mechanismy udržující proteostázu**

Aby sebe a proteom ochránily před poškozením, způsobeným v důsledku hromadění proteinů s patologickou konformací, disponují všechny buňky protektivními nástroji, umožňujícími produkci proteinů kontrolovat. Mezi tyto nástroje se řadí i molekulární chaperony, které jsou doslova všudypřítomné, produkovány ve všech subcelulárních kompartmentech, buňkách a tkáních. Představují skupinu vysoce specializovaných proteinů, které interagují mj. s nově syntetizovanými peptidy, aby vznikajícímu proteinu pomohly zaujmout přirozenou strukturální konformaci. Mají schopnost identifikovat proteiny s alterovanou strukturou a je-li to možné, tuto poruchu zvrátit. Mezi jejich další funkce patří asistence při skládání multimerních proteinových komplexů, nebo při transportu proteinů přes biologické membrány. [19]

Mezi molekulární chaperony se řadí např. proteiny tepelného šoku (Hsp – heat shock proteins). Ty jsou podle své molekulové hmotnosti rozděleny do skupin Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 a tzv. malé Hsp proteiny (sHsps – small heat shock proteins). Každá z těchto skupin obsahuje několik proteinů, které jsou produkovány v různých subcelulárních kompartmentech a v různých tkáních. [19]

Navzdory robustnosti a kapacitě chaperonového systému rozpoznat proteiny s alterovanou strukturou, a následně vyvolat reakci, která vede buď k jejich opravě nebo degradaci, chronická produkce patologických proteinů tuto kapacitu překračuje a vede k akumulaci porušených proteinových jednotek, které jsou s rostoucí koncentrací náchylnější k agregaci. [9] [19]

#### **3.3.3 Struktura amyloidových fibril**

Výbor pro Nomenklaturu Mezinárodní Společnosti pro Amyloid jej definuje jako extracelulární depozita proteinových fibril, mající charakteristický vzhled při použití elektronové mikroskopie, typickou rentgenovou difrakci, a dále afinitu ke KČ, s charakteristickým dvojlomem

a výskytem tzv. anomálních barev, je-li amyloid po obarvení KČ pozorován v polarizovaném světle. [4] [9] Strukturální definice pak dále uvádí typické sekundární uspořádání  $\beta$ -skládaného listu, které zaujímají proteinové podjednotky amyloidových fibril. [4]

Potenciální schopnost změnit své strukturální uspořádání a tvořit amyloid má za určitých podmínek většina proteinů. [20] Navzdory tomu známe pouze omezené množství proteinů, reálně tvořících amyloid *in vivo*. Důvody prozatím nejsou plně objasněny. [9] Výzkumy a klinická pozorování popsaly několik základních předpokladů, spojených se schopností proteinového prekursoru tvořit amyloid. Jsou jimi: 1. patologické a dlouhodobé zvýšení sérové koncentrace proteinu s tendencí agregovat; 2. vrozená modifikace v primární struktuře proteinu; 3. proteolytická remodelace proteinového prekursoru a 4. přirozená náchylnost proteinu (vycházející z primární struktury) získat za určitých okolností odlišnou konformaci. [4] [9]

Primární struktura proteinů, v kombinaci s podmínkami prostředí a interakcemi jeho dalších složek, mohou způsobit částečnou destabilizaci přirozené konformace proteinu a zvýšit jeho náchylnost k agregaci a následné tvorbě fibrilárních struktur. Tak vzniká tzv. agregační jádro, které může interagovat s dalšími prekursorovými jednotkami, a tím umožnit jejich připojení k tvořící se fibrile. [9] [18] K této konformační změně dochází typicky buď na začátku, nebo na konci životního cyklu proteinu. [21]

Navzdory tomu, že prekursorové proteiny nejsou evolučně ani strukturálně příbuzné, základní fibrilární složky amyloidu, tvořené různými stavebními komponentami, navíc pocházející z rozdílně lokalizovaných depozit, mají podobné strukturální vlastnosti u všech typů SA. Tato podobnost spočívá v sekundární struktuře AP, které vždy zaujímají typickou konformaci. Patogenetické pozadí vzniku jednotlivých typů SA (a klinické projevy) jsou přitom často velmi rozdílné. [4] [18] [20] [22]

Amyloidové fibrily se ve tkáních nacházejí ve formě extracelulárně uložených, nerozpustných, rigidních a nevětvicích se vláken o průměru cca 8–20 nm. Fibrily vykazují periodické pootáčení se podél dlouhé osy a mohou dosahovat délky až 100  $\mu\text{m}$ . Váží na sebe KČ a při pozorování v polarizovaném světle vykazují charakteristickou difrakci s přítomností specifických, tzv. anomálních barev. Pokud jsou vlákna extrahována z tkáně (v roztocích s nízkou iontovou silou a v destilované vodě se fibrily stávají více rozpustnými, tvoří ale spíše gelovitou suspenzi intaktních fibril než pravý roztok) a analyzována metodou rentgenové difrakce, vykazují obraz charakteristický pro konformaci  $\beta$ -skládaného listu. [4] [6] [20] [23] [24]

Celá struktura amyloidové fibrily je tedy tvořena mnoha kopiemi jediného proteinu, zaujímajícího konformaci  $\beta$ -skládaného listu, ačkoli jeho přirozená struktura je obvykle odlišná. [4] [18] Dle experimentálních zjištění je paralelní uspořádání  $\beta$ -listu častější, vyskytují se ale i fibrily s antiparalelním uspořádáním. [4] Základní kostra vodíkových vazeb mezi amyloidovými podjednotkami prochází fibrilou paralelně s její dlouhou osou. Tento typ tzv. supersekundární konformační struktury dává amyloidovým fibrilám jejich charakteristické vlastnosti. [24] [25]

Amyloidové fibrily jsou tvořeny několika podjednotkami. Během fibrilogeneze nejprve vznikají rozpustné amyloidové oligomery (dále jen „AO“), ze kterých se následně vytváří protofibrily. Samotné primární (zralé) fibrily jsou poté tvořeny několika protofibrilami, které jsou kolem sebe ovinuty. [4]



### 3.3.4 Oligomery a fibrilogeneze

Agregace AP je vysoce komplexní proces, během něhož vzniká řada různých forem výsledných multimerních struktur. Ty jsou od sebe navzájem morfologicky i funkčně odlišné. U mnoha z nich byly prokázány přímé toxické účinky, u dalších se předpokládají. Tyto vlastnosti jsou jednou ze základních složek patogeneze amyloidóz (viz dále). [26]

AO jsou rozpustné nemonomerní struktury, tvořící v mnoha ohledech značně heterogenní populaci. Vznikají buď jako intermediáty fibrilogeneze nebo jako vlastní finální produkty agregace AP. Velikostně se pohybují od dimerů po velké multimery, skládající se až z padesáti agregovaných molekul monomerů. Většinou tvoří populaci zhruba sférických útvarů, které se mohou dále spojovat a vytvářet vyšší strukturální celky. Mezi ty patří v první řadě protofibrily, jejichž spojováním vznikají vlastní zralé fibrily. [21] [26]

AO, které se vytvoří coby finální produkt agregace, vykazují strukturální odlišnosti od zralých fibril a nemají některé jejich typické vlastnosti. Byla u nich například zjištěna struktura  $\beta$ -skládaného listu v predominantně antiparalelním uspořádání polypeptidových vláken. Naproti tomu u zralých amyloidových fibril je toto uspořádání zpravidla paralelní. Hromadící se poznatky o struktuře rozpustných AO přináší údaje o vztahu jejich uspořádání a toxicity. Ukazuje se například, že vysoce toxické oligomery se pohybují v určitém velikostním rozmezí a zároveň je jejich povrch zvýšeně hydrofobní. Tato data by mohla posloužit jako výchozí bod pro další směřování výzkumu možné (snad i do značné míry univerzální) terapie SA. [26]

Studie využívající transmisní elektronové mikroskopie a mikroskopie atomárních sil ukázaly, že amyloidové fibrily sestávají ze dvou až šesti protofibril. Amyloidové protofibrily jsou podlouhlé lineární útvary složené z oligomerů, jinak ale postrádající složitější strukturu a periodicitu uspořádání, na rozdíl od zralých fibril. Jsou také tenčí a kratší, s délkou nejčastěji do 400 nm a průměrem v rozmezí 2–10 nm. Protofibrily jsou kolem sebe spirálovitě (nejčastěji levotočivě) obtočeny, čímž vytvářejí vyšší strukturu podobnou lanu. [4] [22] [26] Mezi zrajícími protofibrilami dochází během agregace k laterálním interakcím, které dávají vzniku šroubovicové struktuře fibril. Amyloidové fibrily tvořené z různých prekurzorových proteinů (nebo i fibrily tvořené ze stejných jednotek, ale za různých podmínek) mohou na této úrovni vykazovat odlišnosti ve strukturálním uspořádání. [6]

Dalším typem amyloidových agregátů jsou cirkulární struktury, které jsou složeny z několika oligomerních podjednotek. Jejich struktura je odlišná od amyloidových fibril a protofibril. Bližší detaily o jejich struktuře, mechanismu vzniku a případném podílu na patogenezi onemocnění, jsou předmětem dalšího výzkumu. [22] [27]

### 3.3.5 Další komponenty depozit

AD jsou v první řadě tvořena fibrilami, případně i dalšími typy amyloidových agregátů. Mimo to však ve své struktuře obsahují také nefibrilární molekuly dalších komponent. [28] Tyto sekundární komponenty představují rozmanitou skupinu látek, jejichž přesný význam v komplexní etiologii systémových amyloidóz není přesně objasněn. [6] [9]

S využitím proteomických technik byla v posledních letech zmapována takřka univerzální „amyloidová proteinová signatura“. Ta zahrnuje spektrum proteinů asociovaných s AD

a představujícími tak jakýsi „otisk prstu“ (amyloid fingerprint proteins), který by mohl být potenciálním diagnostickým nástrojem pro proteomické detekce amyloidóz. [7] [12]

Mezi tyto non-fibrilární složky AD patří zejména sérový amyloidový protein (dále jen „SAP“ – více viz Appendix I) apolipoprotein E a apolipoprotein A-IV. Dále jsou přítomny látky tvořící fyziologickou součást extracelulární matrix, jako jsou glykosaminoglykany, glykoproteiny (např. vitronektin, perlekan) a lipidy. [4] [6] [28]

Role těchto dalších složek AD není přesně známa, jejich přítomnost však pravděpodobně ovlivňuje kinetiku procesů agregace a fibrilogeneze. Ačkoli mají amyloidové fibrily v přítomnosti vhodných monomerních jednotek autopropagační vlastnosti a další komponenty nejsou pro fibrilogenezi nezbytné, předpokládá se, že tyto dílčí složky vytvářejí matrix, která pomáhá tvořící se fibrily stabilizovat. V *in vitro* experimentu bylo prokázáno, že SAP inhibuje proteolýzu amyloidových fibril pronázou, katepsinem G a elastázou neutrofilů. Rozdílné složení extracelulární matrix by také mohlo přispívat k jisté tkáňové specificitě některých typů SA. [6] [12] [24] [28]

### 3.4 OBECNÉ PRINCIPY PATOGENEZE AMYLOIDÓZ

SA tvoří různorodou skupinu závažných onemocnění, která jsou spojena s přeměnou přirozené struktury proteinů ve vysoce organizované fibrilární agregáty typických strukturálních a tinkčních vlastností. Stejně rozmanitá je i etiopatogeneze amyloidóz, která doposud nebyla detailně zmapována. [14] Ani přesný mechanismus vzniku amyloidu *in vivo* není zcela objasněn. Víme ale že různé typy amyloidu, navzdory rozdílnému původu, sdílejí shodnou základní strukturu. Jestliže trojrozměrná struktura determinuje vlastnosti proteinů, pak shodná struktura amyloidových agregátů naznačuje i shodný mechanismus jejich patologického účinku. [9] [17]

Výsledkem procesu formace AD je poškození buněk a tkání, vedoucí k orgánové disfunkci. Dřívější hypotézy o patogenezi amyloidóz předpokládaly, že poškození orgánů lze vysvětlit jako prostý důsledek hromadění amyloidových hmot ve tkáních, vedoucí k mechanické poruše jejich funkcí. Mechanický princip ale není jediným důvodem tkáňového poškození a ukazuje se, že primárním činitelem patologických procesů jsou spíše rozpustné AO. [14] Tato domněnka je podpořena faktem, že u některých pacientů s AL amyloidózou, u kterých se podaří potlačit patologický klon plazmatických buněk, dojde k rychlému zlepšení orgánové funkce (zejména myokardu), aniž by došlo ke znatelné resorpci depozit. [6] [29] [30]

Koncem 90. let minulého století se výzkum zaměřil na cytotoxický potenciál prekurzorů zralých fibril, na AO. Oligomery jsou od té doby považovány za hlavního činitele toxického působení amyloidu. [22] K orgánovému poškození přispívají zřejmě i monomerní amyloidové jednotky a samozřejmě také zralé fibrily, tvořící často objemná depozita. Účinek jednotlivých typů amyloidových agregátů může mít aditivní, případně i synergický efekt na poškození tkání. [30] Úloha cirkulárních oligomerních struktur v patogenezi onemocnění není prozatím známa. [27]

Experimentální studie ukázaly, že AO jsou cytotoxické a tento efekt je možné pozorovat u všech testovaných populací rozpustných oligomerů (včetně těch, které byly uměle připraveny z proteinů, které za běžných podmínek amyloid netvoří), nezávisle na jejich primární struktuře.

To naznačuje, že klíčovým prvkem jejich toxicity je obdobná sekundární strukturální konformace, a že společně s ní oligomery sdílí i obecný princip působení. [31]

Primárním místem toxického účinku rozpustných AO jsou biologické membrány. Jejich působením vzrůstá elektrická vodivost membrány a její permeabilita pro ionty. Tvorba transmembránových pórů však prokázána nebyla, ačkoli jejich vznik některé teorie předpokládaly. Zvýšení permeability membrán, ke kterému v důsledku působení oligomerů dochází, je zřejmě jednou z klíčových součástí mechanismu patogeneze, a uplatňuje se nejen při poškození tkání u SA, ale také u některých degenerativních onemocnění asociovaných s tvorbou a ukládáním tzv. intracelulárního amyloidu. Obdobné poškození membrán není vyvoláno působením zralých amyloidových fibril ani monomerních jednotek. Představuje zřejmě primární patogenní účinek rozpustných AO. [22] [31]

V souvislosti se zvýšením permeability buněčné membrány dochází k její depolarizaci a také k rozvratu iontové rovnováhy, zejména k rapidnímu zvýšení volného cytosolického vápníku. Pokud jsou buňky nejprve vystaveny působení tasparginu, který specificky blokuje uvolňování vápníku z endoplazmatického retikula, k takovému rapidnímu nárůstu volného vápníku nedochází. To poukazuje na schopnost oligomerů proniknout do nitra buňky, kde atakují také nitrobuněčné membránové struktury. [17] [22]

Poškozením biologických membrán, a v důsledku rozvratu iontové rovnováhy, může být narušeno široké spektrum buněčných funkcí a také transmembránových signalizačních drah. Dále může docházet ke zvýšené produkci reaktivních molekul spojených s oxidativním stresem a k mitochondriální disfunkci, která může zpětnově ještě podpořit rozšíření konformačních změn proteinů, protože mnohé molekulární chaperony potřebují pro svou funkci ATP. [17] [24] [31]

Mimo přímého toxického účinku se uplatňuje již zmíněný mechanický princip poruchy funkce tkání. Přítomnost AD narušuje fyziologickou morfologii a depozita ukládaná v cévních stěnách (a jejich bezprostředním okolí) způsobují poruchu transportu řady látek. Celý proces patogeneze amyloidózy je velmi komplexní a jeho klinickým vyústěním je porucha funkce (až selhání) nejrůznějších orgánů. Nejčastěji však dochází k manifestaci symptomů spojených s renální disfunkcí, nebo k projevům poškození myokardu. [24]

### **3.4.1 Tkáňová specifita**

Molekulární mechanismy, které vedou k orgánové specifitě některých typů amyloidózy, nejsou plně známy. Zdá se, že velkou roli zde hraje rozdílné složení extracelulární matrix v jednotlivých typech tkání. Interakce proteinů v extracelulárním prostoru jsou extrémně různorodé a zahrnují velkou skupinu různých typů reakcí od těch nízké afinitní (reakce s molekulárními chaperony), až po vysoce afinitní vazby se specifickými receptory. Různé orgány vykazují drobné rozdíly ve složení této matrix, a to je pravděpodobně jedním z mechanismů vedoucích k selektivní tkáňové afinitě depozit. Dalším součinitelem je pak zřejmě konkrétní primární struktura AP, která determinuje jeho interakční potenciál. Tento mechanismus je dobře patrný u hereditárních amyloidózy, kde různé mutace v jednom prekurzorovém proteinu často vyústí v ukládání amyloidu v různých orgánech. Protože při vzniku AP z jejich prekurzorů

se často uplatňují proteolytické mechanismy, je možné, že složení extracelulárních proteáz ve tkáni také hraje roli při specifickém uložení AD. [6] [30] [32]

### 3.5 NOMENKLATURA AMYLOIDÓZ

Potřeba soustavné a uniformní nomenklatury je dána snahou o efektivní komunikaci mezi jednotlivými odvětvími medicíny. Cílem je zajistit včasnou a správnou diagnostiku, umožňující použití vhodných terapeutických nástrojů. Jednoznačné a srozumitelné označení amyloidóz je nezbytné s ohledem na rozdíly v prognóze a terapeutickém plánu. [9] [10]

Starší literatura v sobě mísila mnoho různých označení, založených na klinických a histopatologických aspektech onemocnění. Původní systém dělení amyloidóz vycházel z dob, kdy jejich povaha nebyla přesně známa. Prohlubující se znalosti o biochemické povaze amyloidóz a jejich prekurzorů, učinily logickou a snadno pochopitelnou nomenklaturu naprosto nezbytnou. Když byla v sedmdesátých letech ozřejmena chemická rozmanitost AP, byl účastníky mezinárodního symposia pro amyloidózu, konaného v roce 1974 v Helsinkách, jmenován Výbor pro nomenklaturu. Od té doby se u příležitosti konání mezinárodních sympózií, a v návaznosti na nové objevy, vydávají doporučení pro používání nomenklatury AP a amyloidóz. Dnes jsou všechny typy amyloidu označovány podle jejich prekurzorového proteinu. Tento systém vytváří racionální a snadno pochopitelnou nomenklaturu, vhodnou pro stále se zvyšující počet známých amyloidogenních proteinů. [9] [10] [11] [23]

Nomenklatura amyloidu je založena na chemické povaze proteinu, tvořícího podstatu extracelulárních fibril. Na stejném principu by měla být založena i klasifikace klinická. AP je definován takto: protein se musí vyskytovat ve tkáňových depozitech a musí vykazovat specifický dvojlom s výskytem tzv. anomálních barev (zelená, žlutá nebo oranžová). Mutantní protein musí být také jednoznačně identifikován pomocí sekvenční analýzy. Není přitom dostatečné identifikovat mutaci v kódujícím genu, ale je nutné prokázat záměnu v aminokyselinové sekvenci vlastního AP. [23]

AP je značen písmenem A, následovaným zkratkou jeho prekurzoru. Pokud je například amyloid odvozen od lehkých řetězců imunoglobulinů, AP je označován AL a stav, který jeho přítomnost vyvolává, je označována AL amyloidóza. Pro označování amyloidu a amyloidózy je nutné používat celý název (např. „AL amyloid“ a „AL amyloidóza“), nikoli pouze zkratky, které označují jen specifický protein. [11] AP jsou někdy (zejména u hereditárních amyloidóz) také označovány mutací v jejich primární struktuře, která stav vyvolává (např. ATTRV30M, nebo ALysI56T). Tato nomenklatura byla převzata Světovou zdravotnickou organizací a je doporučována Výborem pro nomenklaturu, zřízeným při Světové společnosti pro amyloidózu (The Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis). [10] [23]

V současnosti je známo 31 lidských proteinových prekurzorů amyloidu (viz Tabulka 2). Dva z nich jsou iatrogenního původu a devět z nich bylo identifikováno i u zvířat. Byly také pozorovány intracelulární proteinové inkluze s vlastnostmi charakteristickými pro amyloid, ty však nejsou v současné nomenklatuře zahrnuty. [10] [23]

Ve starší literatuře jsou používána různá označení (často více pro jeden typ amyloidózy), založená převážně na klinických projevech onemocnění. Některá tato označení jsou přitom stále

používána. Příkladem může být ATTR amyloidóza, pro kterou známe názvy Familiární amyloidní polyneuropatie, Familiární amyloidní kardiomyopatie, nebo Leptomeningeální amyloidóza. Aby nedocházelo k omylům, je důrazně doporučeno používat nomenklaturu založenou na chemické povaze prekurzorového proteinu. Klinická klasifikace označující AL amyloidózu jako primární a AA amyloidózu jako sekundární, je silně obsoletní a neměla by být již vůbec používána. Označení Senilní systémová amyloidóza bylo používáno před tím, než bylo prokázáno že se jedná o onemocnění se specifickým amyloidovým prekurzorem, a ne pouze o srdeční onemocnění spojené se stárnutím. AP u Senilní systémové amyloidózy je odvozen od wild-type TTR a onemocnění by proto mělo být označováno jako „wild-type ATTR (ATTRwt) amyloidóza“. [10] [23]

**Tabulka 2** Znamé lidské amyloidové proteiny. Zdroj: [23].

Amyloidový protein	Prekurzorový protein	Systémové a/nebo lokalizované	Získané nebo dědičné	Cílové orgány
AL	Lehké řetězce imunoglobulinů	S, L	Z, D	Všechny orgány kromě CNS
AH	Těžké řetězce imunoglobulinů	S, L	Z	Všechny orgány kromě CNS
AA	Sérový amyloid A	S	Z	Všechny orgány kromě CNS
ATTR	Transthyretin, wild-type	S	Z	Hlavně srdce (převážně u mužů) a vazy
	Transthyretin, mutantní	S	D	PNS, srdce, oko, leptomeninx
Aβ2M	β2-Mikroglobulin	L	Z	Muskuloskeletální systém
	β2-Mikroglobulin, mutantní	S	D	PNS
AApoAI	Apolipoprotein A-I a jeho varianty	S	D	Srdce, játra, ledviny, PNS, varlata, hrtan, kůže
AApoAII	Apolipoprotein A-II a jeho varianty	S	D	Ledviny
AApoAIV	Apolipoprotein A-IV	S	Z	Dřeň ledvin a systémové postižení
AGel	Gelsolin a jeho varianty	S	D	PNS, rohovka
ALys	Lysozym a jeho varianty	S	D	Ledviny
ALECT2	Leukocytární chemotaktický faktor 2	S	Z	Primárně ledviny
AFib	Fibrinogen α a jeho varianty	S	D	Primárně ledviny
ACys	Cystatin C a jeho varianty	S	D	PNS, kůže
ABri	ABriPP a jeho varianty	S	D	CNS
ADan	ADanPP a jeho varianty	L	D	CNS
Aβ	Amyloid β, wild-type	L	Z	CNS
	Amyloid β, mutantní	L	D	CNS
APrP	Prionové proteiny, wild-type	L	Z	CJD, Fatální insomnie
	Prionové proteiny, mutantní	L	D	CJD, GSS syndrom, Fatální insomnie
ACal	(Pro)kalcitonin	L	Z	Nádory z C-buněk štítné žlázy
AIAPP	Amylin	L	Z	Langerhansovy ostrůvky
AANF	Atriální natriuretický faktor	L	Z	Srdeční síně
APro	Prolaktin	L	Z	Prolaktinom hypofýzy, postižení hypofýzy stárnutím
AIns	Inzulin	L	Z	Iatrogenní podáváním injekcí
ASPC	Plicní surfaktant	L	Z	Plíce
AGal7	Galektin 7	L	Z	Kůže
ACor	Corneodesmosin	L	Z	Zrohovatělé epitelie, vlasové folikuly
AMed	Lactadherin	L	Z	Postižení medie aorty s věkem
Aker	Keratoepithelin	L	Z	Rohovka
ALac	Laktoferin	L	Z	Rohovka
AOAAP	Odontogenic Ameloblast-Associated Protein	L	Z	Odontogenní tumory
ASem1	Semenogelin 1	L	Z	Vesicula seminalis
AEnf	Enfuvritid	L	Z	Lokalizovaná depozita v kůži Iatrogenní vznik při podávání antivirotika Enfuvritidu

## 3.6 ZÁKLADNÍ INFORMACE K VYBRANÝM TYPŮM AMYLOIDÓZ

### 3.6.1 AA amyloidóza – Sérový amyloid A

Systémová AA amyloidóza, někdy označovaná jako tzv. reaktivní, se vyvíjí na podkladě chronicky probíhajícího zánětlivého onemocnění. Odhaduje se, že celosvětově tvoří AA amyloidóza cca 45 % všech případů generalizovaných SA. Ukládání fibril AA amyloidu je důsledkem dlouhodobě zvýšené sérové koncentrace proteinu akutní fáze – sérového amyloidu A (SAA – viz Appendix I), který je produkován játry při zvýšené koncentraci prozánětlivých cytokinů. [9] [13]. Reaktivní AA amyloidóza je tedy potenciální komplikací jakéhokoli onemocnění, spojených s dlouhodobě zvýšenou produkcí reaktantů akutní fáze. Výčet takových onemocnění z řad chronických infekčních nebo autoimunitních zánětlivých stavů, je přitom téměř neomezený. Biopsická a post mortem vyšetření ukazují, že depozita AA amyloidu je možné nalézt u cca 3,6 – 5,8 % pacientů s chronickým zánětlivým onemocněním. [33]

Historicky byla celosvětovou hlavní příčinou vzniku AA amyloidózy skupina chronických infekčních onemocnění, jako například tuberkulóza, lepra a chronická osteomyelitida. Chronická infekční onemocnění nadále zůstávají hlavním indukčním faktorem vzniku AA amyloidózy v rozvojových zemích. Oproti tomu v rozvinutých (západních) zemích, kde moderní medicína potlačila chronické infekční choroby, se hlavní příčinou vzniku AA amyloidózy stala skupina chronických neinfekčních autoinflamatorní onemocnění (revmatoidní artritida, ankylozující spondylitida, atp.). [9] [18] AA amyloidóza se také může vyvinout u pacientů s chronickými onemocněními, jako např. familiární středomořská horečka, syndrom imunoglobulinemie D, Muckle-Wellsův syndrom, a vzácněji i u pacientů s neoplastickými stavy, např. hepatocelulární karcinom, renální karcinom, Castlemanova choroba, Hodgkinova choroba, nebo vlasatobuněčná leukemie. Systémová AA amyloidóza se může vyvinout jako závažná komplikace u drogově závislých jedinců. Už v 70. letech byly v USA popsány případy AA amyloidózy, která se rozvinula v důsledku chronických infekcí u dlouholetých intravenózních uživatelů drog. [9] [14] [15] [34]

Atypickou skupinou, která se zdá být ohrožena vznikem AA amyloidózy, jsou obézní pacienti (BMI nad 35 kg/m<sup>2</sup>). U nich byly prokázány zvýšené plazmatické koncentrace proteinů akutní fáze (mezi nimi i SAA) a prozánětlivých cytokinů (zejména interleukin 6, TNF- $\alpha$ , makrofágový zánětlivý protein 1 $\alpha$ ). Část těchto látek je produkována leukocyty prostupujícími tukovou tkáň, SAA je pak produkován samotnými adipocyty. Zdá se, že společně s jeho produkcí játry může vést jeho trvale zvýšená plazmatická koncentrace ke vzniku AA amyloidózy, a to bez účasti dalších zánětlivých stavů. U obézních pacientů s poruchou renálních funkcí, by měla být AA amyloidóza zvažována jako jedna z možných příčin, i když pacient netrpí žádným dalším chronickým zánětlivým onemocněním. [35] [36]

AA amyloid byl jeden z prvních AP u kterého bylo prokázáno, že jeho prekurzorem je strukturálně i funkčně normální plazmatický protein SAA. [6] Přesný mechanismus patogeneze není zcela znám, nicméně předpokládá se spoluúčast inkompletní proteolýzy, jejíž kapacita je dlouhodobou vysokou koncentrací SAA překročena. Během fyziologické degradace SAA dochází k jeho štěpení na malé peptidové fragmenty. Pokud je vlivem chronického zánětlivého onemocnění jeho hladina dlouhodobě zvýšená, může přesáhnout degradační kapacitu organismu

a vlivem inkompletní proteolýzy pak dochází k produkci amyloidogenních fragmentů. Následně dochází k jejich agregaci a ukládání ve tkáních (přesný mechanismus není popsán). [6] [9] [33]

Nejčastěji postiženými orgány u pacientů s AA amyloidózou, jsou ledviny. Cca 95 % pacientů s AA amyloidózou má v čase diagnózy klinicky prokazatelnou renální disfunkci a až u 50 % diagnostikovaných pacientů vede zhoršování renálních funkcí k nutnosti hemodialýzy. Téměř u všech pacientů je také postižena slezina, u třetiny pak nadledviny. Dalším často postiženým orgánem jsou játra a varlata. Zhruba 9 % pacientů vykazuje vlivem onemocnění hepatomegalii. Poškození srdce a nervů bývá u AA amyloidózy vzácnější, naopak poměrně časté je postižení GIT. [9] [18] [37] Ačkoli AA amyloidóza může mít prudký průběh, střední doba latence mezi vznikem zánětlivého onemocnění a klinicky prokazatelnou SA je téměř dvě desetiletí. Onemocnění se obvykle projeví proteinurií, následovanou progresivním renálním selháváním, často následovaným nefrotickým syndromem. [38]

Prognóza pacientů s AA amyloidózou závisí na stupni renálního poškození a na možnosti ovlivnit primární zánětlivé onemocnění. Pokud dojde k dlouhodobému snížení sérové hladiny SAA, amyloidová depozita mohou být postupně pomalu redukována a zároveň může dojít ke zlepšování renálních funkcí. Pokud nedojde ke snížení hladiny SAA, ukládání amyloidu vede až k terminálnímu stádiu renálního selhání. Pacientům s pokročilým stádiem poškození ledvin nemusí k obnovení renální funkce dostačovat ani kompletní suprese zánětlivého onemocnění. [9] [33] [38]

Diagnostika AA amyloidózy se opírá o histopatologické vyšetření tkáňového vzorku, tedy o průkaz a typizaci AD. Protože u pacientů s AA amyloidózou jsou predominantně postiženy ledviny, nejčastěji vyšetřovanými tkáňovými vzorky jsou renální biopsie. Dále se uplatňují biopsie podkožního tuku, biopsie rektální sliznice, nebo slinné žlázy. Endoskopické vzorky sliznice GIT (zejména biopsie z tlustého střeva a rekta) jsou vhodným materiálem pro screeningová vyšetření, zaměřená na detekci AA amyloidózy. [2] [9]

### **3.6.2 AL amyloidóza – Lehké řetězce imunoglobulinů**

AL amyloidóza je převážně systémové onemocnění (lokalizované formy představují asi 5–7 % případů), vyvolané ukládáním amyloidových fibril, které vycházejí z lehkých řetězců imunoglobulinů. Zdrojem prekurzoru je patologický klon plazmatických buněk, produkujících monoklonální lehké imunoglobulinové  $\kappa$  nebo  $\lambda$  řetězce. Může vzniknout také v asociaci s mnohočetným myelomem, Waldenströmovou makroglobulií, POEMS syndromem, lymfomy, nebo chronickou lymfocytární leukémií. AL amyloidóza je nejčastěji se vyskytujícím typem SA v západním světě. [9] [18] [39] [40]

U pacientů s AL amyloidózou je přítomen patologický klon plazmatických buněk, které produkují velké množství monoklonálních lehkých řetězců. Většina klonálních elementů je zpravidla lokalizována v kostní dřeni, ale podíl na celkové buněčnosti nebývá výrazný (max. 9 %) a 85 % pacientů s AL amyloidózou netrpí žádnými dalšími klinickými projevy spojenými s přítomností patologického klonu. Kromě zralých plazmatických buněk je amyloidogenní populace tvořena také méně diferencovanými dřevnými progenitorovými buňkami, a zralými B-lymfocyty. Klonální elementy se kromě periferního řečiště mohou nacházet například také ve slezině a lymfatických uzlinách. [9] [39] [41]



Z hlediska klinických projevů je AL amyloidóza heterogenní onemocnění a ukládání AD může nastat takřka v jakémkoli orgánu kromě mozku. Mezi typické projevy (objevující se ale pouze u 15–20 % pacientů) patří například makroglosie, nebo periorbitální purpura. Nejčastěji postiženým orgánem jsou u pacientů s AL amyloidózou ledviny (cca 70 % pacientů). V době stanovení diagnózy trpí nefrotickým syndromem zhruba polovina pacientů, ale terminálního stadia renálního selhání dosáhne jen asi 20 % pacientů. Větší dopad na přežívání má kardiální poškození (cca 50 % pacientů umírá na srdeční selhání), které je v době stanovení diagnózy přítomno u cca dvou třetin pacientů. U přibližně 25 % pacientů se vyvíjí amyloidová hepatopatie. Někdy může vést masivní depozice amyloidových hmot k spontánní ruptuře jater a tento stav je pak často fatální. Poškození periferních nervů a měkkých tkání je přítomno u cca 25 % pacientů. Důsledky mohou mj. zahrnovat syndrom karpálního tunelu (často oboustranný), posturální hypotenzi, poruchy erekce, nebo gastrointestinální potíže. Mechanismus tkáňové specificity není znám, předpokládá se však role primární struktury lehkých AL řetězců. [9] [13] [18] [38] [39]

Přesný mechanismus orgánové toxicity a tkáňového poškození není, stejně jako u ostatních typů amyloidóz, zcela objasněn. Byl ale popsán přímý toxický účinek AL oligomerů na kardiomyocyty a právě rozpustné AO jsou tedy zřejmě hlavním činitelem poškození srdce. Tato teorie je navíc podpořena faktem, že u pacientů s hematologickou odpovědí na chemoterapeutickou léčbu (tedy s poklesem produkce prekurzorů vlivem potlačení patologického buněčného klonu), dochází ke zlepšení srdeční funkce, i když resorpce depozit není detekovatelná. [9] [14] [29]

Odhaduje se, že pouze malá část monoklonálních lehkých řetězců je schopna podlehnout agregaci a tvořit amyloid *in vivo*. Schopnost konkrétní frakce lehkých řetězců tvořit amyloidové fibrily je zřejmě přímo závislá na jejich specifických strukturálních vlastnostech. Kromě vlastní primární struktury a posttranslačních modifikací, se na zvyšování potenciálu tvořit amyloid zřejmě podílí také částečná proteolýza prekurzorových proteinů. V AD byly identifikovány především N-terminální části molekuly – převážně variabilní domény, případně i fragmenty konstantních domén. Izotyp amyloidogenních lehkých řetězců je ve většině případů (asi 75 %)  $\lambda$ . [6] [9] [33] [39]

Diagnostika AL amyloidózy je založena na histopatologickém vyšetření, zahrnující průkaz přítomnosti AD a typizaci prekurzorového proteinu, v případě AL amyloidózy tedy lehkých  $\lambda$ , nebo  $\kappa$  řetězců imunoglobulinů. [9]

### 3.6.3 Hereditární amyloidózy

Hereditární amyloidózy jsou skupinou převážně systémových, autosomálně dominantních onemocnění. Obvykle mají za následek progresivní postižení vícečetných orgánů, ale společným jmenovatelem je často poškození ledvin. Ačkoli jednotlivé typy jsou poměrně vzácné, někdy navíc geograficky lokalizované, společně tvoří významný podíl z celkového množství amyloidóz a při diagnostice (typizaci) je třeba na ně myslet. [9] [14] [38]

Všechny typy hereditárních amyloidóz jsou způsobeny mutantními prekurzorovými proteiny a není znám případ, kdy by se na tvorbě AD podílel i normální (wild-type) protein. Je popsána celá řada proteinů, které se objevují v amyloidogenních mutantních formách, a jsou také známy vícečetné amyloidogenní mutace jednoho proteinu. Fenotyp a orgánové poškození pak mohou

být značně rozdílné v závislosti na konkrétní mutaci. Zajímavostí je, že ačkoli celkový klinický obraz jednotlivých typů hereditárních amyloidóz může být rozdílný, ledviny jsou poškozeny téměř ve všech případech. Histologický obraz se však velmi liší a pohybuje se od selektivního postižení (až úplného vyplnění) glomerulů, přes depozita uložená ve dřeni, až po takřka výhradně vaskulární poškození. [9] [18] [42]

Nejznámější a nejrozšířenější formou hereditárního typu amyloidózy je ATTR amyloidóza, vycházející z mutantní varianty transportního proteinu transthyretinu. Mezi další proteiny u kterých známe amyloidogenní mutantní varianty, spojené se vznikem systémových amyloidóz, řadíme například apolipoprotein A-I, fibrinogen A $\alpha$ , lysozym, apolipoprotein A-II, gelsolin a cystatin C. [9] [18] [38]

**Tabulka 3** Další formy hereditárních systémových amyloidóz. Zdroj: [18].

<b>Prekurzorový protein</b>	<b>První klinický popis</b>	<b>Poprvé biochemicky charakterizováno</b>	<b>Místo prvního popisu</b>
<b>Apo-AI</b>	1969	1988	USA
<b>Fibrinogen A<math>\alpha</math></b>	1975	1993	USA
<b>Lysozym</b>	1982	1993	UK
<b>Apo-AII</b>	1973	2001	USA
<b>Gelsolin</b>	1969	1990	Finsko
<b>Cystatin C</b>	1972	1986	Island

Mezi vrozené formy SA se řadí také relativně nedávno objevená ALECT2 amyloidóza (viz dále), vycházející z leukocytárního chemotaktického faktoru 2 (LECT2). U tohoto typu však nebyly prozatím zjištěny dědičné mutace ve smyslu familiárního charakteru onemocnění, jako je tomu u hereditárních amyloidóz. [18] [38]

Kromě přirozené strukturální nestability mutantních variant proteinů hraje v patogenezi těchto onemocnění zřejmě dílčí roli také inkompletní proteolýza. Vyplývá to ze zjištění že amyloidové proteiny, inkorporované v depozitech, jsou obvykle kratší, než by odpovídalo genové předloze. [18]

Správnou histopatologickou diagnostiku hereditárních amyloidóz ztěžují faktory, mezi které můžeme zařadit variabilitu v lokalizaci depozit, a bohužel také jistou inkonzistenci v průkazu pomocí imunofluorescenčních (dále jen „IF“) a imunohistochemických (dále jen „IH“) metod. Ta vychází ze sekvenční variability vyvolávajícího proteinu, kdy protilátky nemusí být schopny detekovat mutantní variantu. Cenným nástrojem diagnostiky jsou molekulárně genetické techniky, které umožňují určit konkrétní mutaci v genu AP. Tato informace je důležitá pro volbu terapeutického plánu, protože různé mutantní varianty jednoho proteinu mohou postihovat různé orgány a mohou mít různou prognózu. Zejména ve specializovaných centrech se významnými staly také proteomické techniky, které jsou schopné detekovat mutantní varianty proteinů na základě knihoven spekter známých i předpokládaných amyloidogenních mutací. [9] [12] [41]

### 3.6.3.1 ATTR amyloidóza – Transthyretin

ATTR amyloidóza je nejčastěji se vyskytujícím onemocněním ze skupiny hereditárních SA. Jedná se o onemocnění, které se projevuje tvorbou depozit ve vícečetných orgánech a stěnách cév. Více než sto známých mutací způsobuje amyloidogenní změny ve struktuře transthyretinu (pozn. dřívější označení = prealbumin) a klinické projevy u jednotlivých typů mohou být značně rozdílné. Nejčastěji identifikované mutace jsou Val30Met, Leu58His, Thr60Ala, Ser77Tyr, Ile84Ser a Val122Ile. Mnoho z ostatních známých mutací bylo identifikováno pouze u jednotlivců nebo konkrétních rodin. Hlavními klinickými projevy ATTR amyloidózy jsou neuropatie periferního nervstva a kardiomyopatie. [9] [18] [43]

ATTR amyloidóza se může vyvinout i u jedinců s normální molekulární strukturou transthyretinu. Takový stav, kdy fibrilogeneze vychází z normálního transthyretinu, pak označujeme jako tzv. wild-type ATTR (ATTRwt) amyloidózu. Ačkoli se jedná o systémové onemocnění, které postihuje mnohočetné vnitřní orgány, klinicky nejvýznamnější je amyloidová neuropatie (často oboustranný syndrom karpálního tunelu) a kardiomyopatie. Depozita ATTRwt amyloidu se objevují až u 30 % populace (převážně mužů) během osmé dekády života. [9] [13] [43]

Diagnostika ATTR amyloidózy kromě histopatologické hodnocení tkáňových řezů zahrnuje také sekvenční analýzu aminokyselinového řetězce proteinu, a určení mutace v kódujícím genu. [9] [18]

Prognóza pacientů s ATTR amyloidózou se liší v závislosti na tom, které orgány jsou onemocněním nejvíce postiženy. AD se mohou objevovat takřka ve všech orgánech, většinou je ale patrné predominantní poškození jednoho orgánu, nebo orgánového systému. Jednotlivé mutantní varianty transthyretinu se v lokalizaci depozit zdají orgánově (tkáňově) specifické, a tak zatímco varianta Val30Met způsobuje primárně neurologické postižení, varianty Thr60Ala a Val122Ile mají za následek poškození myokardu. Vzhledem k těmto okolnostem je velmi obtížné odhadovat klinický vývoj onemocnění a jeho prognózu. [9] [18] [43]

### 3.6.3.2 AApoAI amyloidóza – Apolipoprotein A-I

Je známo cca 15 amyloidogenních mutantních variant apolipoproteinu A-I. Zatímco mutace v N-terminální části molekuly jsou spojeny především s postižením ledvin a jater, mutace v C-terminální části molekuly způsobují subepiteliální postižení kůže a hrtanu, a dále kardiomyopatii s následným srdečním selháním. U všech typů AApoAI amyloidózy se předpokládá účast proteolytických pochodů na patogenezi onemocnění, protože v AD se vyskytují výhradně proteinová rezidua. [9] [18]

### 3.6.3.3 AApoAII amyloidóza – Apolipoprotein A-II

Depozita u AApoAII amyloidózy nejsou, na rozdíl od většiny ostatních typů amyloidóz, tvořena proteinovým reziduem, ale kompletní molekulou apolipoproteinu A-II, ke které je navíc připojeno dalších jednadvacet aminokyselin. V současnosti je známo celkem pět amyloidogenních mutací, všechny lokalizované ve stop kodonu kódujícího genu. Onemocnění se obvykle projevuje ve třetí až čtvrté dekádě života renální insuficiencí s pomalou progresí. [9] [18]

#### 3.6.3.4 ACys amyloidóza – Cystatin C

ACys amyloidóza je systémové onemocnění, vyskytující se převážně na Islandu a postihující tvorbou depozit vícečetné vnitřní orgány. Amyloidogenní mutací je jednobodová záměna Leu68Gln a v patogenezi se předpokládá spoluúčast proteolytické modifikace AP. Onemocnění se projevuje jako cerebrální amyloidová angiopatie. Důsledkem jsou opakující se intrakraniální hemoragie, které končí smrtí. [9] [18]

#### 3.6.3.5 AFib amyloidóza – Fibrinogen A $\alpha$

AFib amyloidóza je asociována s devíti známými amyloidogenními mutacemi v molekule fibrinogenu A $\alpha$  (nejčastěji se vyskytuje mutace Glu526Val). Tři známé varianty obsahují jednobodové delece, které způsobují posun transkripčního rámce. Diagnostika AFib amyloidózy pomocí IF a IH technik proto nemusí být možná. Pro toto onemocnění jsou typická glomerulární amyloidová depozita vedoucí k renálnímu selhání. [9] [18]

#### 3.6.3.6 AGel amyloidóza – Gelsolin

AGel amyloidóza je onemocnění, které způsobují dvě známé mutace v kódujícím genu pro protein gelsolin. Mutace Asp187Asn, vyskytující se hlavně ve Finsku, způsobuje periferní neuropatii spojenou s ochrnutím obličejového svalstva, a dále korneální dystrofii, vyžadující transplantaci rohovky. Druhá známá mutace (Asp187Tyr) má obdobné klinické projevy. Kromě poškození rohovky jsou důsledkem onemocnění také depozita ve vnitřních orgánech. Postiženy jsou zejména srdce a ledviny, ale AD se mohou vyskytovat i v dalších tkáních. Progrese onemocnění je obvykle pomalá, a proto jen minimálně ohrožuje život postižených pacientů. [9] [18]

#### 3.6.3.7 ALys amyloidóza – Lysozym

ALys amyloidóza je hereditární onemocnění způsobované šesti známými amyloidogenními mutacemi lysozymu. Klinicky je heterogenní, mezi hlavní postižené orgány řadíme GIT, játra a ledviny. Amyloidová hepatopatie může vést ke spontánní ruptuře jater, renální postižení se projevuje nefropatií s poškozením jak glomerulů, tak intersticia. [9] [18] [44]

### 3.6.4 **Další typy systémových amyloidóz**

#### 3.6.4.1 ALECT2 amyloidóza – Leukocytární chemotaktický faktor 2

ALECT2 amyloidóza byla poprvé diagnostikována v roce 2008 u čtyřiapadesátiletého pacienta s progredující renální insuficiencí. Jedná se o systémové onemocnění, které se zdá být predominantně nefropatické, ale byla popsána depozita i v játrech a jiných vnitřních orgánech. Depozita se také ukládají ve stěnách cév. Vyskytuje se zejména u starších osob a s významnými etnickými rozdíly – nejčastěji postiženými pacienty jsou jedinci hispánského původu. Patogeneze ALECT2 amyloidózy není objasněna a zároveň prozatím nebyla objevena ani amyloidogenní mutace. Předpokládá se, že jedním z vyvolávajících faktorů je zvýšená produkce LECT2 játry. [9] [18] [45]

### 3.6.4.2 A $\beta$ 2M amyloidóza – $\beta$ 2-mikroglobulin

A $\beta$ 2M se vyvíjí jako závažná komplikace u pacientů s chronickou poruchou renálních funkcí a v asociaci s dlouhodobou hemodialyzační léčbou. Patogeneze onemocnění není zcela známa, nicméně klíčovým faktorem se zdá být retence a zvýšená plazmatická koncentrace  $\beta$ 2-mikroglobulinu. Zřejmě ale existují další dílčí faktory, jako například limitovaná proteolýza a glykace molekul  $\beta$ 2-mikroglobulinu. [46] [47]

Jedná o systémové onemocnění, ale klinické manifestace jsou obvykle spojeny s ukládáním depozit v muskuloskeletálním systému. Typické příznaky A $\beta$ 2M amyloidózy jsou úzce spojeny s predominantním poškozením kloubních synoviálních membrán. Dalším projevem bývá syndrom karpálního tunelu. Bolest se prohlubuje v noci a během hemodialýzy. Ve vzácných případech se může u pacientů s dlouhodobou dialyzační léčbou vyvinout i postižení dalších orgánů (srdce, GIT a plíce). [46] [47]

Výsledky studií ukazují, že první klinické příznaky A $\beta$ 2M amyloidózy se objevují 5–7 let po zahájení léčby, nicméně histologicky detekovatelná depozita se začínají tvořit u cca 21 % pacientů již po dvou letech léčby. Po čtyřech letech jsou depozita přítomna již u třetiny pacientů. [46] S narůstající délkou dialyzační léčby se zvyšuje procento pacientů s prokazatelnou A $\beta$ 2M amyloidózou. AD jsou pak přítomna prakticky u všech pacientů dialyzovaných po dobu patnácti let. [47]

Pro diagnostiku A $\beta$ 2M amyloidózy se provádí histologické vyšetření materiálu získaného synoviální biopsií, nebo během chirurgického výkonu. [46] [47]

## 3.7 POSTIŽENÍ GIT U SYSTÉMOVÝCH AMYLOIDÓZ

Postižení GIT je u SA běžné, ale jeho projevy jsou obvykle velice nespecifické a mohou připomínat řadu jiných onemocnění, což znesnadňuje diagnostiku. Symptomy spojené s postižením GIT jsou subjektivně popisovány až u 60 % pacientů, post mortem vyšetření však ukazují, že téměř u všech pacientů se SA (zejména s AA a AL amyloidózou) jsou přítomna AD v GIT. Makroskopické léze na sliznici, které je možné zachytit během endoskopického výkonu, jsou nejčastěji granulární vzhled stěny (s uzly o průměru 1–3 mm), slizniční eroze, ulcerace a fragilita. [1] [48]

Klinické projevy postižení GIT zahrnují celou řadu symptomů, které jsou závislé na místě uložení depozit a jejich rozsahu. Právě nespecifičnost projevů a relativně raritní výskyt způsobují, že správná diagnóza často přichází se značným zpožděním. Mezi projevy patří makroglosie, dysfagie, nauzea, abdominální bolesti, hemorrhagie (může být způsobena difúzní infiltrací stěny, krvácením izolovaných lézí, nebo jako důsledek vaskulárního poškození), zácpa, průjmy a malabsorpce. U pacientů, u kterých dochází vlivem poškození nervových pletení (zejména u ATTR amyloidózy) k poruše střevní motility, může docházet k poruchám reabsorpce žluči a látek lipidové povahy. To může mít za následek steatoreu. Průjmy a malnutrice jsou u pacientů s SA poměrně časté a negativně ovlivňují kvalitu a délku jejich života. [1] [37] [48] [49]

Systémové amyloidózy postihují každou část GIT od úst po anus. Postihují také asociované orgány jako jsou játra a pankreas. Nejčastěji postiženými částmi jsou tenké a tlusté střevo. [1] [48]

Postižení v oblasti úst může mít celou řadu projevů od bolesti zubů, parestzie, fraktury kostí, vznik nodulárních lézí sliznice, bolesti jazyka a dále např. makroglosii. Ta se objevuje u 20–50 % pacientů s AL amyloidózou a způsobuje poruchy řeči a příjmu potravy, v závažných případech může jazyk tvořit mechanickou překážku dýchání a vést až k nutnosti tracheostomie. Dále můžeme mezi projevy zařadit xerostomii (způsobenou postižením slinných žláz), nebo tvorbu vřidků. [37] [48]

Dochází-li u pacientů k ukládání amyloidu v oblasti jícnu, jsou pozorovány nespecifické projevy dysfagie, které jsou způsobeny poruchou motility a/nebo poruchou funkce např. dolního jícnového svěrače. Může také docházet ke gastroezofageálnímu refluxu. [37] [48]

Postižení žaludku je u pacientů se SA poměrně časté, ale obvykle bez klinických projevů. Ty se objevují až při rozsáhlejších poškozeních. Symptomy jsou značně variabilní, od bolesti v oblasti epigastria přes gastroparézu a hematemezu, až po tvorbu amyloidových tumorů či melenu. [37] [48]

V tenkém a tlustém střevě dochází k ukládání amyloidu v nervových pleteních, ve stěně cév, ve svalových vrstvách i ve slizničním vazivu. Následky mohou být rozmanité a patří k nim průjmy (které mohou být život ohrožující), zácpa, obstrukce pasáže, malabsorpce a krvácení. Mohou se také vyvinout změny, podobné obrazu chronických zánětlivých onemocnění střev. [48] Na druhé straně mohou chronická zánětlivá onemocnění střev zapříčinit rozvoj systémové AA amyloidózy. Častěji je tomu tak u Crohnovy choroby (hlavně u mužů, a to v poměru 2,7:1), která je oproti ulcerózní kolitidě spojena s vyššími hladinami SAA. Od klinického rozvoje zánětlivého onemocnění střev, k vyvinutí amyloidózy, dojde obvykle za cca 15 let. [1] [37] [48]

Ačkoli játra jsou u pacientů se SA postižena ukládáním amyloidu poměrně často, klinické příznaky bývají pouze mírné, případně téměř žádné. Nejčastěji je zastoupena hepatomegalie a zvýšené plazmatické koncentrace aminotransferáz. Hyperbilirubinemie se vyskytuje poměrně vzácně (jen asi u 5 % pacientů s postižením jater) a je prognosticky nepříznivá. Depozice amyloidu v játrech obvykle začíná periportálně v Disseho prostoru, a je následována atrofií hepatocytů. Vzácněji dochází k ukládání centrolobulárně, a mohou se také projevit následky vaskulárního poškození, způsobeného ukládáním amyloidu ve stěně cév. Pokud AD blokuje jaterní sinusy, dochází k rozvoji portální hypertenze. [37]

GIT je poměrně dobře dostupným místem pro odběr vzorku tkáně, a tak jsou sliznice GIT pro diagnostiku amyloidóz velmi vhodné místo odběru, navíc zajišťující dobrou senzitivitu vyšetření (89–94 % rektum, 73–91 % colon, 86–100 % tenké střevo, 86–95 % žaludek). Výhodnější se jeví pouze biopsie podkožního tuku, která je ale cíleným chirurgickým výkonem. [16] [48]

Bioptické vzorky stěny GIT by pro zajištění maximální výtěžnosti vyšetření měly zastihnout slizniční vrstvy a podslizniční vazivo s cévami. Ačkoli jsou symptomy postižení GIT nespecifické, je jistá spojitost mezi histologickým obrazem uložení depozit a klinickými projevy. U AL amyloidózy je ukládání amyloidu nejčastější v lamina muscularis mucosae, tunica

submucosa a tunica muscularis externa. Tento obraz je spojen se symptomy, mezi které patří zácpa či chronická intestinální pseudoobstrukce, může se projevit i malabsorpce. U AA amyloidózy dochází častěji k ukládání v podobě granulárních depozit v lamina propria mucosae a dále také ve stěnách cév, přítomných v tunica submucosa. Typickými projevy jsou průjmy a malabsorpce. U obou typů navíc může docházet k poruchám, které zapříčiňuje vaskulární poškození způsobené ukládání AD ve stěně cév a její bezprostřední blízkosti. [16] [49]

## **3.8 DIAGNOSTIKA SYSTÉMOVÝCH AMYLOIDÓZ**

### **3.8.1 Diagnostika**

Stanovení správné a úplné diagnózy je klíčovým bodem péče o pacienta. Obvykle představuje výsledek spolupráce celé řady medicínských pracovníků, lékařů i nelékařského personálu. SA jsou širokou skupinou onemocnění, navíc s nescifickými klinickými projevy. Existuje celá řada symptomů, které jsou suspektní z pohledu možného poškození organismu pacienta ukládáním amyloidu. Patří mezi ně přítomnost proteinurie nebo renální insuficience bez dalších zjevných příčin, hepatomegalie, ortostatická hypotenze, srdeční poškození bez jiné příčiny, splenomegalie a další. [42] Diagnóza SA je nicméně obvykle stanovena poměrně dlouho po klinické manifestaci, (právě s ohledem na nescifickost projevů), díky čemuž mohou dlouho unikat pozornosti a vzbuzovat dojem jiných onemocnění. [1]

Diagnostika SA je založena na vyšetření tkáňových biopsií a její nedílnou součástí je nejen demonstrace přítomnosti amyloidových hmot, ale také typizace AP. Přesné a jednoznačné určení proteinu, který je podkladem AD, je zcela zásadní s ohledem na rozdíly mezi terapeutickými postupy u jednotlivých typů amyloidóz. Léčba se pohybuje od chemoterapie u AL amyloidózy až k transplantaci jater u některých hereditárních typů. [12] [40] [50] Diagnostika a typizace SA často spadá do praxe nefropatologů. Primárně proto, že ledviny jsou nejčastěji postiženým orgánem u SA, dále pak z toho důvodu, že nefropatolog má zpravidla zkušenosti s interpretací preparátů v polarizační mikroskopii a také s použitím IF a elektronmikroskopických metod. [42]

### **3.8.2 Průkaz amyloidu**

Ve světelné mikroskopii mají AD, obarvená KČ, červenou (případně červenorůžovou) barvu. Barvení KČ nadále zůstává zlatým standardem pro průkaz přítomnosti amyloidu ve tkáni. Drobná depozita, navíc ve velmi tenkých řezech, však mohou poskytovat tak malý substrát pro navázání barviva, že při pozorování klasickou světelnou mikroskopii nemusí být patrná. Mikroskopie ve světlém poli však není sama o sobě diagnostická. Aby bylo možné potvrdit přítomnost amyloidu ve tkáni, musí být preparáty prohlédnuty pomocí polarizační mikroskopie. Teprve přítomnost typické dichroické difrakce a tzv. anomálních barev (zejména jablečně zelené, dále žluté a oranžové) je považován za důkaz přítomnosti amyloidu. Hlavně pro detekci malých depozit je také vhodné využít fluorescenční vlastnosti KČ. Dalšími faktory, ovlivňujícími možnosti a spolehlivost hodnocení, jsou správné vyhotovení preparátu (dostatečná fixace tkáně, správně provedená barvicí technika) a také vlastnosti mikroskopu. Preparáty pro diagnostiku amyloidu je také doporučeno odečítat v potměném prostředí, a po dostatečné aklimatizaci očí na světelné podmínky mikroskopu. [42]

K detekci amyloidu ve tkáni je možné použít další histologická barviva, zejména Sirius red F3B a fluorescenční barvivo Thioflavin T. Každá z metod má své pozitivní i negativní aspekty, a v diagnostické praxi je výhodné používat jejich kombinaci, ačkoli diagnostickým nástrojem zůstává KČ. Nová fluorescenční barviva, jako například polymerní pFTAA (pentameric formyl thiophene acetic acid), však představují značný potenciál například v časně diagnostice amyloidóz, protože jsou schopna zachytit i drobnější depozita s lepší senzitivitou a specificitou. [2] [13] [25]

### 3.8.3 Biopsie pro průkaz amyloidu

Biopsie klinicky postiženého orgánu je pro maximální výtěžnost diagnostiky amyloidóz ideální, avšak například biopsie jater nebo ledvin jsou rizikové invazivní výkony, spojené nejen s diskomfortem, ale také s celou řadou možných komplikací. Proto je při podezření na SA často přistupováno k méně invazivním výkonům, mezi které patří biopsie abdominálního podkožního tuku, biopsie malých slinných žláz, nebo endoskopické biopsie GIT. Pokud jsou výsledky těchto vyšetření negativní ale klinické podezření na amyloidózu trvá, nebo pokud je třeba zhodnotit poškození konkrétních orgánů, je nutné přistoupit k cílené biopsii (nejčastěji jsou prováděny punkční biopsie ledvin a jater, případně endomyokardiální biopsie), které mají prakticky 100% senzitivitu. [1] [2]

Klasická místa pro necílený odběr tkáňových vzorků určených k diagnostice SA, jsou rektální sliznice a podkožní tuk (nejčastěji z abdominální oblasti). Biopsie podkožního tuku se v případě podezření na amyloidózu stala jedním z nejčastěji prováděných výkonů. Tato jen málo invazivní metoda umožňuje ověřit přítomnost AD v těle pacienta, nicméně nevypovídá o stupni, ani o charakteristikách poškození orgánů. Spolehlivost necílených biopsií však není úplná, protože ne všechny typy amyloidóz vykazují shodné vzorce distribuce depozit do tkáni. Například AL $\kappa$  amyloidóza (vycházející z  $\kappa$  frakce lehkých řetězců) může vytvářet depozita takřka výlučně v ledvinách. Pokud je histopatologická detekce prováděna pouze na bioptickém vzorku podkožního tuku nebo sliznice GIT, existuje riziko falešně negativního výsledku vyšetření. Konečným diagnostickým nástrojem při klinickém podezření na amyloidózu jsou proto biopsie právě toho orgánu, který je amyloidózou pravděpodobně zasažen. [2] [13] [50]

V případě biopsie ze střeva by tkáňové vzorky, ve kterých má proběhnout hodnocení přítomnosti AD, měly obsahovat nejen slizniční vrstvu stěny GIT, ale zastřižena by měla být také tunica submucosa (včetně vaskularizace). Diagnostický potenciál správně odebraného vzorku střevní sliznice je poměrně vysoký (75–94 %). Riziko falešně negativního výsledku je vyšší v případě bioptického vzorku, odebraného pouze z povrchových vrstev sliznice. [2] [13] [16]

Neopomenutelným fenoménem při histopatologické diagnostice amyloidóz je tzv. sampling error, který je zapříčiněn nerovnoměrným rozložením depozit v těle pacienta. Podstata tkáňové specificity amyloidóz, která navíc může být značně variabilní i v rámci skupiny pacientů s identickou diagnostickou jednotkou, není ani dnes uspokojivě objasněna. Problematika sampling erroru je při odběru vzorku ze sliznice GIT (alespoň z pohledu nejčastěji se vyskytujících typů SA) nejpodstatnější u AATR amyloidózy, kde jsou depozita nejméně zastoupena v tunica mucosa. Sampling error může být příčinou falešně negativního výsledku vyšetření. [16] Aby se eliminoval vliv sampling erroru, a také protože depozita amyloidu mají ve tkáni často velmi fokální charakter, je vhodné zhotovit a vyhodnotit více tkáňových řezů



z jednoho vzorku. Prokrajováním také patolog získává informace, alespoň částečné, o prostorovém uspořádání depozit ve tkáni. Tato praxe může napomoci zachytit méně objemná depozita a zpřesnit tak diagnostiku. [2] [42]

### 3.8.4 Další techniky průkazu amyloidu

K průkazu amyloidových depozit ve tkáni je možné využít také skutečnost, že kromě vlastních fibril obsahují další komponenty, zejména pak SAP. IH průkaz SAP může pomoci detekovat AD, určit jejich rozsah a lokalizaci, sám o sobě však není diagnostický. SAP scintigrafie umožňuje posoudit celkovou nálož amyloidu v postižených orgánech, resp. v celém těle pacienta. Radioaktivně značený SAP je pacientovi podán intravenózně a při následném scintigrafickém vyšetření umožňuje zhodnotit rozložení amyloidu v orgánech a tkáních. Při opakovaném provedení umožňuje posoudit efektivitu terapeutických postupů a případně prokázat regresi depozit. Tato metoda je nicméně v současnosti dostupná pouze v několika málo specializovaných centrech na světě. [1] [2]

Další technikou využívanou v diagnostice amyloidóz, je transmisní elektronová mikroskopie. Ta má své uplatnění například v nefropatologii, kde umožňuje posoudit nejen ultrastrukturu depozit, ale například také jejich vztah k bazálním membránám glomerulů. [2]

### 3.8.5 Typizace

Přístup k diagnostice a typizaci SA se za posledních několik desetiletí dramaticky proměnil. Od nespecifických histologických průkazů AD a jejich anatomického rozmístění, přes využití IH, až po proteomické a molekulárně genetické techniky, rozvíjející se zejména v posledních letech. Právě proteomické metody se staly zlatým standardem typizování amyloidu. Pro vysoké nároky na technické i personální zdroje však prozatím nedošlo k jejich výraznému rozšíření. Rutinním standardem tak zůstávají hlavně IF a dále IH metody. Ty navíc fungují spolehlivěji v limitovaném množství materiálu s často velmi drobnými fokálními depozity, jaký představují např. renální punkční bioptické vzorky. [2] [50]

IH typizace amyloidu byla na formol-parafinových tkáňových řezech používána a vylepšována přes dvě desetiletí. Byly ale publikovány studie, které naznačovaly nespolehlivost této metody, a z nutnosti odstranit její nedostatky byly vyvinuty další techniky určení konkrétního typu amyloidového proteinu. Ty zahrnují například imunoelektronmikroskopické preparáty, a hlavně proteomické metody využívající hmotnostní spektrometrie a sekvenování aminokyselin. [40]

IH a IF vyšetření, prováděná na parafinových (resp. zmražených) řezech, jsou nejběžnější rutinní nástroj typizace amyloidu ve tkáni. Jedná se o validní metody, schopné ve většině případů spolehlivě identifikovat AP, a to i přes nesnadnou interpretaci, která vyžaduje značné diagnostické zkušenosti hodnotícího patologa. Při testování schopnosti IH metod identifikovat amyloidový protein bylo dosaženo až 94% úspěšnosti. Pokud jsou tedy IH vyšetření prováděna ve specializovaných centrech se zkušeným personálem, poskytují vysoce účinnou, a navíc dostupnou metodu typizace amyloidu. Přesto by měl mít diagnostikující patolog na paměti limitace, vycházející zejména z mutantních forem proteinů, a v případě AL amyloidózy také z nespecifické reakce protilátek se sérovými proteiny obsaženými ve tkáni. [40] [42]

Jedním z faktorů, které znesnadňují IH a IF typizaci, zejména u AL amyloidózy, představuje nespecifické pozadí. To se uplatňuje zejména v parafinových řezech, kde dojde během fixace k jakémusi uzamknutí plazmatických proteinů ve tkáni. Toto pozadí se dá redukovat použitím nativních zmrazených řezů. IF metody prováděné na nativních tkáňových řezech jsou tak klíčovým nástrojem rutinní histopatologické typizace amyloidového proteinu. [40] [42]

### 3.8.6 Proteomika

Protože amyloidózy jsou skupinou onemocnění spojených s poruchou proteinů, bylo použití proteomických nástrojů pochopitelným vývojem. První aplikace proteomických metod, využívajících hmotnostní spektrometrii, se v diagnostice amyloidóz objevily po roce 2000. Od té doby rychle získaly na významu a zejména ve specializovaných referenčních centrech se staly zlatým standardem pro identifikaci AP. Rozrůstající se knihovny známých, ale i teoretických hmotnostních spekter navíc umožňují určit proteiny i na základě předpokládaných amyloidogenních mutací. Je důležité podotknout, že proteomické metody poskytují informace o složení proteinů ve tkáni, nikoli o jejich konformaci a vzájemných vztazích. Naproti tomu je s využitím těchto metod možné určit přítomnost amyloidových depozit na základě průkazu dalších, s amyloidem asociovaných proteinů (amyloid fingerprint proteins), jako jsou apolipoprotein E, apolipoprotein A-IV, SAP, a další. [12] [41]

Techniky zpracování vzorku pro MS analýzu zajistí, že v analyzované tkáni dojde ke zvýšení poměrného zastoupení studovaných AP, které se stanou svým obsahem ve tkáni dominantní složkou. Oblasti s obsahem AD jsou vybrány po obarvení KČ a následně mikrodisekcí extrahovány z tkáňového řezu (typicky se používají 10  $\mu\text{m}$  parafinové řezy). Pro vyříznutí oblastí s vysokým podílem amyloidu se používají například techniky laserové mikrodisekce, nebo laserové záchytové mikrodisekce. Tkáň je následně analyzována tandemovými MS/MS technikami. [15] [41]

Přes značný potenciál proteomických technik stále existují jistá omezení jejich aplikace. Pro úspěšnou analýzu je třeba zajistit dostatečné množství amyloidových hmot přítomných ve tkáňovém vzorku, a to ideálně ve formě objemnějších depozit. Pokud se zaměříme například na punkční biopsie ledvin, ve kterých probíhá diagnostika SA poměrně často, není tuto podmínku vždy možné splnit. Pro úspěšnou MS analýzu byla již použita depozita vyplňující pouze jediný glomerulus (cca 60 000  $\mu\text{m}^2$ ), získaná z 10  $\mu\text{m}$  řezu. Často se však stává, že ve tkáni jsou přítomná pouze drobná fokální depozita, nacházející se nejen v glomerulech, ale také intersticiální tkáni nebo v cévních stěnách. Tato ložiska jsou příliš drobná pro úspěšnou mikrodisekci, bez které není proteomická identifikace amyloidu možná. [41]

Díky vysokým nárokům na vybavení a také na odborný personál, se proteomické metody rozšířily prozatím pouze do velkých referenčních center, kde je možné využít jejich velký potenciál při identifikaci nejen běžněji se vyskytující, ale tak vzácných nebo zcela nových AP. Větší uplatnění se prozatím nalézá v oblasti výzkumu, kde proteomika umožňuje blíže objasnit molekulární mechanismy při vzniku amyloidu a poškození tkání. Předmětem výzkumu jsou například posttranslační modifikace prekurzorových proteinů, které mohou zvyšovat jejich amyloidogenní potenciál a usnadňovat agregaci. [12]

### 3.9 ZDRAVOTNICKÝ SCREENING

Screening můžeme definovat jako proces identifikace předpokládaného, prozatím nerozpoznaného onemocnění provedením testu, vyšetření, nebo aplikací procedury, kterou je možné provést rychle a levně na velkém množství jedinců. Screeningové vyšetření roztrídí prozatím asymptomatické pacienty na skupinu těch, kteří pravděpodobně trpí hledaným onemocněním, a na skupinu pravděpodobně zdravých jedinců. Screeningové vyšetření není zamýšleno být diagnostickým nástrojem. Jedinci s pozitivním výsledkem screeningového testu musí podstoupit další vyšetření, které potvrdí nebo vyvrátí diagnózu. Naproti tomu pátrání po přidružených (případně sekundárních) chorobách u lidí, kteří již trpí nějakou poruchou či onemocněním, je definováno jako case-finding. [8] [51] [52] [53]

Zdravotnický screening, na který poté navazuje diagnostické testování, tvoří velmi silný nástroj péče o veřejné zdraví. Historicky se jedná o poměrně starý koncept, nicméně efektivního využití mohlo být dosaženo až po splnění základních požadavků – dostupnost jednoduché a funkční screeningové metody, možnost efektivní terapie onemocnění a široká dostupnost zdravotnické péče. S postupným vývojem, umožňujícím lépe zhodnotit specifické rizikové faktory a efektivněji testovat specifické skupiny obyvatel, se hranice mezi screeningem a cíleným testem lehce stírá. I nadále by však tyto dva nástroje měly zůstat ve vzájemném vztahu, kdy screening je cílen na širokou populaci a specifické testy na již předvybrané skupiny. [8] [51]

Screeningové metody slouží jako filtr, který umožňuje analyzovat velké množství vzorků v krátkém čase. Principem je nastavení takových kritérií, která vyberou vzorky určené k dalšímu konfirmačnímu testování. Vybrání vhodných screeningových metod tedy představuje způsob, jak vhodně dimenzovat využití zdrojů v laboratoři. Ideální pro screeningový program jsou rychlé, spolehlivé a nízkonákladové metody, často představované kvalitativními testy s jednoduchým výstupem typu ano/ne. Naproti tomu diagnostické testy jsou vytvořeny tak, aby daly jednoznačnou odpověď na otázku, zda pacient trpí určitým konkrétním onemocněním. Tyto testy jsou obvykle komplexnější a nákladnější, a vyžadují sofistikované analytické metody a jejich vyhodnocení. [51] [52] [54]

Zhodnocení a pochopení významu screeningových programů pro zdraví jednotlivců, ale zejména testované subpopulace, je komplexní problematikou. Data o dopadu screeningu se pohybují od jednoduchých statistických údajů, ukazujících dramatické snížení četnosti výskytu syfilis po zavedení screeningu, až po dlouhodobé sledování úmrtnosti na karcinom děložního čípku u gynekologického screeningu. Dalším parametrem vyhodnocování screeningových metod jsou kritéria produktivity, která zahrnují například čas nutný na analýzu, její cenu a zátěž technických i personálních zdrojů laboratoře. [8] [54]

Screeningové programy je třeba hodnotit také z etického hlediska. Toto zhodnocení má za cíl zajistit, že benefity vyplývající z výsledků testů jsou vyšší než případné negativní dopady na pacienta. Má pozitivní výsledek screeningového testu potenciál pozitivně ovlivnit délku a kvalitu pacientova života? Je možné medicínsky intervenovat tak, že u pacientů se včasným záchytem je možné předejít plnému rozvoji onemocnění a klinické manifestaci symptomů? Některé screeningové programy, zaměřené na identifikování závažných onemocnění (nebo riziko jejich vzniku), také současně odhalí mírné formy onemocnění. To může v některých případech vést k medicínsky nepodloženému psychickému zatěžování pacientů. Příkladem takového testu

je screeningové vyšetřování prostatického specifického antigenu. To v některých případech vede k diagnostice rakoviny prostaty, která ale např. u pacientů v pozdním věku s velkou pravděpodobností neovlivní jejich přežití, ani jeho kvalitu. Sdělení takového zjištění pacientovi, případně snaha o léčbu, by mohla mít za následek pouze bezúčelné poškození pacientova psychického i fyzického stavu. [52] [53]

Vyhodnocení spolehlivosti metody je dalším důležitým aspektem při zavádění screeningových programů. Histopatologické vyšetřovací techniky ale svou povahou patří k metodám, u kterých není možné s jistotou určit tzv. skutečnou hodnotu. Tento fakt znesnadňuje použití vypočtených parametrů, které umožňují zhodnotit senzitivitu a specificitu screeningového vyšetření. Mezi validační metody používané ke zhodnocení kvalitativního screeningového vyšetření, u kterého není možné jednoduše určit vztah k tzv. skutečné hodnotě, se používá její porovnání se zlatým standardem – tedy metodou, která je pro danou dané vyšetření považována za referenční. Vhodné je také mezilaboratorní porovnání metody, ověřující její reprodukovatelnost a robustnost (i za mírně odlišných podmínek v jiné laboratoři). [54]

## 4 ÚVOD EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

### 4.1 POUŽÍVANÁ ZAŘÍZENÍ, SPOTŘEBNÍ MATERIÁL A CHEMICKÉ LÁTKY

Zpracovávání vzorků, které popisuje tato DP, probíhalo v rámci standardního chodu Pracoviště klinické a transplantační patologie IKEM. Během procesu zpracování byla využívána zařízení, spotřební materiál a chemické látky uvedené v následujících tabulkách.

#### 4.1.1 Zařízení

Tabulka 4 Seznam používaných zařízení.

Typ zařízení	Název zařízení	Výrobce zařízení	Katalogové číslo
<b>Chladicí zařízení</b>	Tissue Cool Plate COP 30	Medite GmbH Wollenweberstraße 12 D-31303 Burgdorf www.medite.de	02-1030-00
<b>Lineární tkáňový automat – autotechnikon</b>	Tissue Processing Center TPC 15 Duo	Medite GmbH Wollenweberstraße 12 D-31303 Burgdorf www.medite.de	04-1540-01
<b>Mikrotom</b>	pfm Slide 4003 E	pfm medical ag Wankelstraße 60 50996 Köln www.pfmmedical.com	040001
<b>Montovací automat</b>	Glass Coverslipper RCM 7000	Medite GmbH Wollenweberstraße 12 D-31303 Burgdorf www.medite.de	----
<b>Napínací stolek</b>	Stretching Table OTS 40	Medite GmbH Wollenweberstraße 12 D-31303 Burgdorf www.medite.de	01-4002-00
<b>Tiskárna na kazety</b>	AutoWrite Cassette Printer	Sakura Finetek Europe B.V. Flemingweg 10A 2408 AV Alphen aan den Rijn www.sakura.eu	8030
<b>Tiskárna na podložní skla</b>	AutoWrite Glass Slide Printer	Sakura Finetek Europe B.V. Flemingweg 10A 2408 AV Alphen aan den Rijn www.sakura.eu	8031
<b>Vodní lázeň</b>	Tissue Floatation Bath TFB 55	Medite GmbH Wollenweberstraße 12 D-31303 Burgdorf www.medite.de	01-5500-01
<b>Vyhřívavý inkubátor (termostat)</b>	Universal Oven	Memmert GmbH + Co. KG Aeussere Rittersbacher Strasse 38 D-91126 Schwabach www.memmert.com	----

<b>Zalévací stanice</b>	TES Valida®	Medite GmbH	02-7725-00
	Modular Paraffin	Wollenweberstraße 12	02-7760-00
	Embedding Center	D-31303 Burgdorf	02-7741-00
		www.medite.de	

#### 4.1.2 Spotřební materiál

Tabulka 5 Seznam používaného spotřebního materiálu.

<b>Druh spotřebního materiálu</b>	<b>Název</b>	<b>Dodavatel</b>	<b>Katalogové číslo</b>
<b>Kazety na vzorky</b>	Kazeta STANDARD oranžová	bamed s.r.o. Litvínovice 32 370 01 Litvínovice <a href="http://www.bamed.cz">http://www.bamed.cz</a>	3006
<b>Krycí skla</b>	Obdélníková krycí skla	bamed s.r.o. Litvínovice 32 370 01 Litvínovice <a href="http://www.bamed.cz">http://www.bamed.cz</a>	BD 2440
<b>Mikrotomové žiletky</b>	Feather R35	bamed s.r.o. Litvínovice 32 370 01 Litvínovice <a href="http://www.bamed.cz">http://www.bamed.cz</a>	JP-BR35
<b>Montovací médium</b>	Pertex	bamed s.r.o. Litvínovice 32 370 01 Litvínovice <a href="http://www.bamed.cz">http://www.bamed.cz</a>	HI-00801
<b>Parafín pro prosycení tkání</b>	Histowax 56-58 °C	bamed s.r.o. Litvínovice 32 370 01 Litvínovice <a href="http://www.bamed.cz">http://www.bamed.cz</a>	HI-00403
<b>Parafín pro zalévání</b>	BaWax 54-56 °C	bamed s.r.o. Litvínovice 32 370 01 Litvínovice <a href="http://www.bamed.cz">http://www.bamed.cz</a>	B01108-03
<b>Podložní skla</b>	Podložní skla Knittel, matovaná, nezabroušená	bamed s.r.o. Litvínovice 32 370 01 Litvínovice <a href="http://www.bamed.cz">http://www.bamed.cz</a>	VA31110002FKB
<b>Víčka</b>	Víčka pro kazety STANDARD (plast)	bamed s.r.o. Litvínovice 32 370 01 Litvínovice <a href="http://www.bamed.cz">http://www.bamed.cz</a>	DK-0124
<b>Zalévací formy</b>	Nerezové zalévací formy	bamed s.r.o. Litvínovice 32 370 01 Litvínovice <a href="http://www.bamed.cz">http://www.bamed.cz</a>	242405

### 4.1.3 Chemikálie

Tabulka 6 Seznam používaných chemikálií.

<b>Chemikálie</b>	<b>Registrační číslo CAS</b>	<b>Výrobce/distributor</b>	<b>Katalogové číslo</b>
<b>Direct Red 28 Kongo červeň</b>	573-58-0	Sigma-Aldrich spol. s.r.o. Na Hřebenech II 1718/10 140 00 Praha 4 www.sigmaaldrich.com	C6767-25G
<b>Direct Red 80 Sirius red F3B</b>	2610-10-8	Sigma-Aldrich spol. s.r.o. Na Hřebenech II 1718/10 140 00 Praha 4 www.sigmaaldrich.com	365548-25G
<b>Ethanol absolutní</b>	64-17-5	Ing. Petr Švec PENTA s.r.o. Radiová 1122/1 102 00 Praha 10 www.pentachemicals.eu	71250-11000
<b>Ethanol absolutní p.a.</b>	64-17-5	Ing. Petr Švec PENTA s.r.o. Radiová 1122/1 102 00 Praha 10 www.pentachemicals.eu	71250-11000
<b>Ethanol denaturovaný 1 % lékařského benzínu</b>	64-17-5	Ing. Petr Švec PENTA s.r.o. Radiová 1122/1 102 00 Praha 10 www.pentachemicals.eu	71530-20010
<b>Fenol</b>	108-95-2	Ing. Petr Švec PENTA s.r.o. Radiová 1122/1 102 00 Praha 10 www.pentachemicals.eu	13780-30750
<b>Formaldehyd (36- 38% roztok)</b>	50-00-0	Ing. Petr Švec PENTA s.r.o. Radiová 1122/1 102 00 Praha 10 www.pentachemicals.eu	14150-20010
<b>Glycerol</b>	56-81-5	Ing. Petr Švec PENTA s.r.o. Radiová 1122/1 102 00 Praha 10 www.pentachemicals.eu	14550-11000
<b>Hydroxid draselný</b>	1310-58-3	Ing. Petr Švec PENTA s.r.o. Radiová 1122/1 102 00 Praha 10 www.pentachemicals.eu	15520-31000
<b>Hydroxid sodný</b>	1310-73-2	Ing. Petr Švec PENTA s.r.o. Radiová 1122/1 102 00 Praha 10 www.pentachemicals.eu	15740-31000

<b>Chlorid sodný</b>	7647-14-5	Ing. Petr Švec PENTA s.r.o. Radiová 1122/1 102 00 Praha 10 www.pentachemicals.eu	16610-30250
<b>Isopropylalkohol</b>	67-63-0	Ing. Petr Švec PENTA s.r.o. Radiová 1122/1 102 00 Praha 10 www.pentachemicals.eu	17500-20005
<b>Kyselina chlorovodíková 35%</b>	7647-01-0	Ing. Petr Švec PENTA s.r.o. Radiová 1122/1 102 00 Praha 10 www.pentachemicals.eu	19360-11000
<b>Kyselina octová ledová</b>	64-19-7	Ing. Petr Švec PENTA s.r.o. Radiová 1122/1 102 00 Praha 10 www.pentachemicals.eu	19990-11000
<b>Thioflavin T</b>	2390-54-7	Sigma-Aldrich spol. s.r.o Na Hřebenech II 1718/10 140 00 Praha 4 www.sigmaaldrich.com	T3516-25G
<b>Xylen (směs izomerů)</b>	1330-20-7	Ing. Petr Švec PENTA s.r.o. Radiová 1122/1 102 00 Praha 10 www.pentachemicals.eu	28440-20010

#### 4.1.4 Další reagenty

Tabulka 7 Další používané reagenty.

Název	Poznámka
<b>Mayerův hematoxylin</b>	Roztok připravován přímo v laboratoři dle návodu popsaného na str. 175-176 v publikaci Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques, 7th Edition [25]
<b>Weigertův železitý hematoxylin</b>	Roztok připravován přímo v laboratoři dle návodu popsaného na str. 180 v publikaci Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques, 7th Edition [25]



## 4.2 METODIKA ZPRACOVÁNÍ BIOLOGICKÝCH VZORKŮ

### 4.2.1 Odběr a transport biologického materiálu

Histopatologická diagnostika na základě vyšetření tkáňových biopsií je u SA považována za zlatý standard. Vzorky sliznice GIT jsou pro histopatologickou analýzu získávány v naprosté většině případů během endoskopického vyšetření.

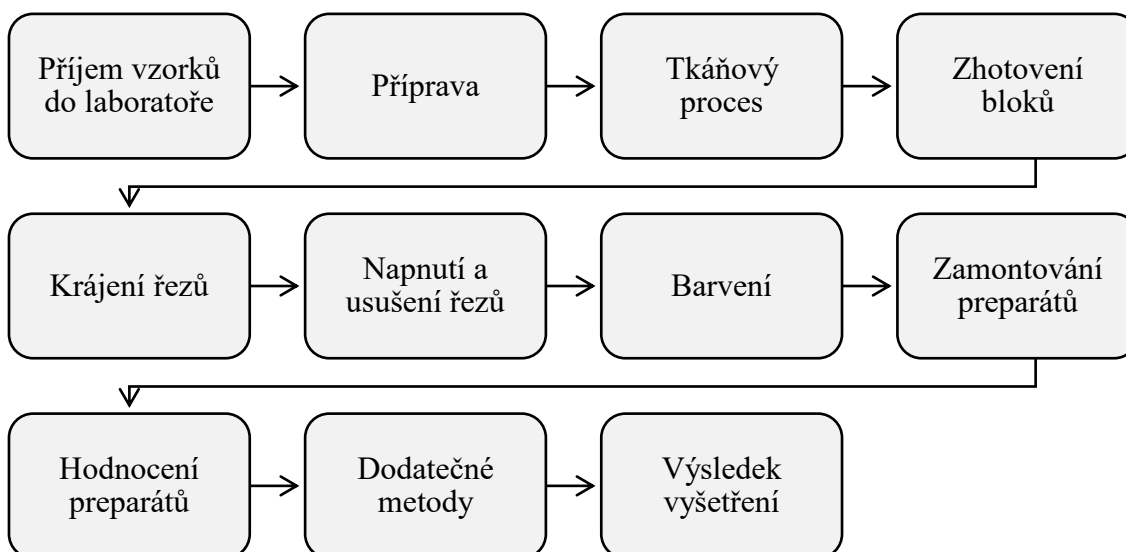
Klasické endoskopické biopsie jsou odebírány bioptickými kleštěmi, které se zavádí pracovním (bioptickým) kanálem endoskopu během gastroscopie, kolonoskopie či dalších výkonů. Existuje několik typů bioptických kleští, které se od sebe liší zejména průměrem. Pro dobrou výtěžnost diagnostiky SA je nezbytné, aby odebírané vzorky obsahovaly nejen povrchové vrstvy sliznice, ale také podslizniční vazivo s cévami. Vhodný je odběr vícečetných biopsií. Další variantou je tzv. snášení polypoidních lézí endoskopickou kličkou. Při tomto typu výkonu dochází k termickému poškození, které je při mikroskopickém hodnocení patrné (viz dále).

Všechny bioptické vzorky zpracovávají v rámci experimentální části této DP byly odebírány na Oddělení hepatologických a gastroenterologických metod Kliniky hepatogastroenterologie IKEM. Vzorky byly po odběru vkládány do speciálních transportních nádob předplněných formaldehydem a týž den transportovány ke zpracování na Pracoviště klinické a transplantační patologie IKEM.

### 4.2.2 Histopatologické vyšetření tkáňového vzorku

Od okamžiku získání biologického materiálu procházela tkáň komplexním procesem histologického zpracování, na jehož konci je vyhotovení trvalých, fixovaných a barvených preparátů, které patologovi umožňují mikroskopickou diagnostiku. Cesta tkáňových vzorků laboratoří se dá rozfázovat do celé řady na sebe navazujících dílčích kroků, které znázorňuje Schéma 1. Vybrané kritické kroky budou popsány dále.

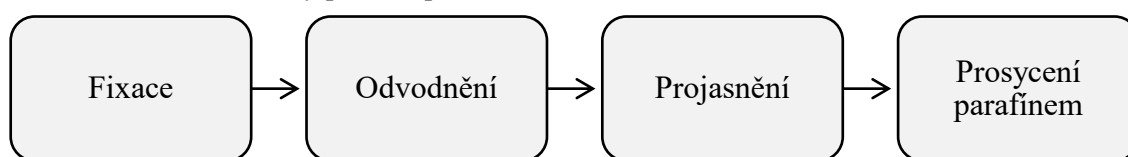
**Schéma 1** Grafické vyobrazení základních kroků histopatologického vyšetření.



#### 4.2.2.1 Proces převedení tkáňového vzorku do matricového média

Tkáň byla vystavena působení celé řady chemických látek, jejichž účelem je připravit vzorek pro zalití do média, které tvoří pevnou matici, umožňující krájet 3–5  $\mu\text{m}$  silné tkáňové řezy. Tento proces přípravy tkáně je možné rozdělit do čtyř základních kroků (viz Schéma 2). Jsou jimi fixace, odvodnění tkáně, tzv. projasnění a konečně prosycení tkáně matricovým médiem (nejčastěji parafinem). Všechny kroky byly zajišťovány automatizovaným systémem, tzv. autotechnikonem, který dle předem definovaného programu (viz Tabulka 8) přenášel tkáňové vzorky mezi jednotlivými lázněmi. Kvalitativní charakteristiky výsledných preparátů, zejména zachování mikroskopické morfologie a barvitelnosti tkáně, jsou výsledkem optimálního nastavení všech dílčích kroků zpracování (volba chemických látek, délka expozice, fyzikální podmínky atp.). [25]

**Schéma 2** Základní kroky procesu převedení tkáně do matricového média.



#### **Fixace**

Stěžejním cílem zpracování tkáňového vzorku pro histopatologickou diagnostiku, je zachytit trvalý a neměnný obraz mikroarchitektury tkáně v takovém stavu, v jakém se nacházela v okamžiku vyjmutí vzorku z těla pacienta. Pro úspěšné histologické zpracování je důkladná fixace zcela klíčová. Historický koncept fixace biologických vzorků za účelem studování jejich struktury a vlastností vedl k tomu, že během let bylo představeno široké spektrum fixačních technik. Ačkoli každá z nich má své výhody, zcela ideální fixační médium nebylo do dnešního dne popsáno. [25]

Fixativa zabraňují okamžitému i dlouhodobému poškození mikroarchitektury tkáně tím, že zastavují katabolické enzymatické procesy, čímž umožňují zachování struktury buněčných i extracelulárních makromolekul. Zabraňují také destrukci tkáně působením mikroorganismů. Aby bylo možné vizualizovat, a následně mikroskopicky hodnotit morfologické vlastnosti tkáně, je nezbytné uchovat vztahy nejen mezi buňkami, ale všemi intra a extracelulárními komponentami. Mnoho složek tkáně je přirozeně rozpustných ve vodě, případně v dalších látkách používaných při histologickém zpracování. Vytvoření intermolekulárních vazeb působením fixativa zabraňuje ztrátám těchto solubilních komponent. Popsané vlastnosti jsou nezbytné jak pro okamžité zpracování tkáňového vzorku za účelem diagnostiky, ale také pro dlouhodobé uchovávání vzorků, které jsou archivovány po řadu let a dokonalá fixace tkáně umožňuje opětovnou analýzu, často s využitím nových diagnostických metod. Stále se rozšiřující oblast působnosti molekulárně genetických a proteomických technik také klade důraz na to, aby používaná fixativa umožnila extrakci a analýzu makromolekul (bez rozsáhlejších chemických modifikací) z již zpracovaných tkáňových vzorků. [25] [55] [56]

Fixačních techniky mohou být fyzikální (zahřívání, využití mikrovlnného záření, mrazové vysoušení) nebo chemické. Fyzikální techniky fixace nejsou rutinně využívány. Chemická fixativa je možné rozdělit do dvou skupin: 1. koagulační fixativa, která pracují na principu odnětí molekul vody (ethanol, Carnoyova tekutina, Methacarn, atp.) a 2. tzv. „cross-linking“ fixativa

(formaldehyd, glutaraldehyd, atp.), která vytváří intra a intermolekulární vazby mezi tkáňovými komponentami. [25] [55]

Bezesporu nejpoužívanějším fixativem je 4% vodný roztok formaldehydu. Formaldehyd, objevený v roce 1859, je bezbarvý plyn charakteristického zápachu, který tvoří cca 37% vodný roztok. Aktivní složkou fixačního roztoku je methandiol, který je hydratovanou formou formaldehydu. Obě chemická individua jsou ve vhodném roztoku přítomna v rovnovážném stavu (významně ve prospěch methandiolu). Methandiol vytváří methylenové můstky mezi celou řadou reaktivních skupin postranních řetězců proteinů, i jiných typů makromolekul. Sekundární a terciární struktura proteinů není formaldehydovou fixací narušena. [55]

Doba potřebná pro dokonalou fixaci tkáně je primárně závislá na rozměrech vzorku a koncentraci fixativa. Je možné ji ovlivnit úpravou fyzikálních podmínek (změna teploty, tlaku, kontinuální míchání). Doba fixace je například možné zkrátit zvýšením teploty prostředí. Zvýšení teploty má za následek urychlení chemických reakcí a také lepší pronikání fixační tekutiny tkání. Teplota by neměla překročit 45 °C, kdy již dochází ke ztrátě antigenních vlastností některých tkáňových komponent. Přílišné zahřívání tkáně během fixace může mít za následek sníženou výtěžnost IH technik. Pro optimální fixaci by objem fixační tekutiny měl alespoň desetinásobně převyšovat objem tkáňového vzorku. [25] [55] Během zpracování tkáňových vzorků, které popisuje tato DP, byl jako chemické fixativum používán pufrovaný roztok formaldehydu připravovaný dle návodu na str. 86 v publikaci Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques, 7th Edition. [25]

## **Odvodnění**

Odvodnění tkáně je prvním krokem následujícím po fixaci. Jeho cílem je odstranit přirozené vodné prostředí a spolu s ním také roztok fixačního média. Odvodnění tkáně by mělo probíhat pozvolna, aby vlivem vysokého gradientu nedošlo k poškození buněčných membrán. Příliš rychlé odvodnění navíc může způsobit objemovou kontrakci tkáně a její křehkost. Z tohoto důvodu jsou obvykle používány odvodňovací řady se stoupající koncentrací odvodňovacího média. Nejčastěji používanou látkou v procesu odvodnění tkáně je ethanol (obvykle ve formě denaturovaného alkoholu), který představuje rychle působící odvodňovací médium, dobře mísitelné nejen s vodou, ale i řadou organických rozpouštědel. Dalšími alternativami jsou např. methanol, aceton a isopropylalkohol. Výhodou isopropylalkoholu je, že nezpůsobuje nežádoucí tvrdnutí tkáně. [25] [56] [57] Jako odvodňovací médium byl při zpracování vzorků používán ethanol denaturovaný 1 % lékařského benzínu (koncentrace 70 a 96 %), a následně koncentrovaný isopropylalkohol.

## **Projasnění**

Tzv. projasňující látky představují přechodové prostředí mezi odvodňujícím médiem a látkou rozpouštějící matici – parafín. Po úplném odstranění odvodňující látky se tkáň stává částečně průsvitnou, odtud název. Projasňující látky musí rychle penetrovat tkáň, efektivně odstranit odvodňovací médium, nepoškozovat tkáň a musí být rychle nahrazeny rozpuštěným parafínem. Nejčastěji používanou projasňující látkou je xylen – bezbarvá kapalina charakteristického nasládlého zápachu, velmi dobře mísitelná s ethanolem i isopropylalkoholem a efektivně rozpouštějící parafín. [25] [56] [57] Projasňující látkou, používanou při zpracování vzorků které jsou předmětem této DP, byl xylen.

## Prosycení parafínem

Parafínový vosk je nejrozšířenějším matricovým médiem v běžných histologických laboratořích. Jeho vlastnosti jsou dány zejména teplotou tání, která se pohybuje v rozmezí cca 50–65 °C a určuje tvrdost parafínu. Ta má zásadní vliv na techniku mikrotomového krájení tkáňových řezů. Vhodný typ parafínu je nutné experimentálně vybrat pro konkrétní potřeby laboratoře. Parafínový vosk prostupuje tkání v tekutém stavu a nahrazuje projasňující látku. Po zchladnutí tuhne a tvoří pevnou matici, která tkáň konzervuje a umožňuje zhotovovat řezy o požadované tloušťce. [25] Pro prosycení biotických vzorků byl používán komerčně dodávaný parafín pro histologii Histowax. Pro zalévání do bloků byl používán komerčně dodávaný parafín pro histologii BaWax.

**Tabulka 8** Standardní program autotechnikonu.

# lázně	Obsah lázně	Teplota	Vakuum	Čas v hodinách
1	Formaldehyd 4%	30 °C	Ano	1,5
2	Ethanol 70%	38 °C	Ano	1
3	Ethanol 96%	38 °C	Ano	1
4	Ethanol 96%	38 °C	Ano	1
5	Ethanol 96%	38 °C	Ano	1
6	Isopropylalkohol	38 °C	Ano	1
7	Isopropylalkohol	38 °C	Ano	1
8	Xylen	38 °C	Ano	1
9	Xylen	38 °C	Ano	1
10	Xylen	38 °C	Ano	1
11	Parafín	60 °C	Ano	1
12	Parafín	60 °C	Ano	2
13	Parafín	60 °C	Ano	2

### 4.2.2.2 Faktory ovlivňující rychlost a kvalitu dílčích kroků tkáňového procesu

#### Míchání

Kontinuální míchání zajišťuje neustálé proudění chemického média kolem vzorku. To zvyšuje efektivitu látkové výměny mezi tkání a prostředím. Efektivní míchání může zkrátit celkovou dobu tkáňového zpracování až o 30 %. [25]

#### Zvýšená teplota prostředí

Zvýšení teploty lázní usnadňuje prostup chemických látek tkání a zvyšuje tak efektivitu všech dílčích kroků. [25]

#### Vakuum

Použití vakuovaných nádob zvyšuje efektivitu a rychlost, kterou (zejména těkavé) chemické látky prostupují tkání. [25]

#### 4.2.2.3 Zhotovení tkáňových řezů

Po prosycení parafinem je tkáň zalita do tzv. parafinového bloku, po jejichž zchlazení (na chladicí desce nastavené na cca -10 °C) je možné přistoupit k samotnému krájení. Tloušťka tkáňových řezů se v rutinní histopatologické diagnostice pohybuje nejčastěji v rozmezí 2–5 µm. Takto tenké řezy je možné zhotovit s pomocí mikrotomu. Dobře zvládnutá technika krájení umožňuje produkci tzv. sériových řezů, které (zejména u drobných vzorků) umožňují mikroskopické hodnocení většího počtu řezů bez nežádoucích ztrát biologického materiálu. Po ukrojení jsou tkáňové řezy přeneseny na hladinu vyhřívané vodní lázně (teplota lázně asi 40 °C). Zde dochází k jejich napnutí, selekci a následnému upevnění vybraných řezů na podložní sklo, které je poté přes noc umístěno do vyhřívaného inkubátoru (54 °C pro klasická histologická barvení a 37 °C pro IH), kde dojde k přilnutí tkáně na povrch skla a řezy jsou připraveny pro histologické barvení a/nebo IH detekci. [25]

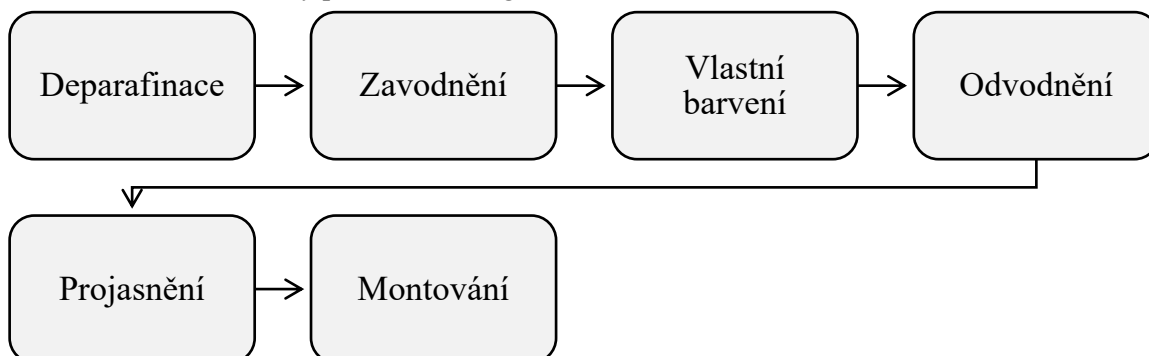
#### 4.2.2.4 Histologická barvení

Histologická barvení jsou jedním z klíčových nástrojů, který umožňuje histopatologickou diagnostiku tak, jak ji známe. Představují soubor metodických postupů, které jsou prováděny s cílem zviditelnit určité tkáňové komponenty pro mikroskopické hodnocení. Jednotlivé barvicí techniky byly vyvinuty s cílem znázornit nejrůznější extra i intracelulární komponenty tkáně. Tím umožňují patologovi hodnotit morfologii, přítomnost patogenních struktur a také posoudit vzájemné vztahy buněk a dalších tkáňových složek. [58]

První histologické barvicí techniky využívaly běžně se vyskytující barviva přírodního původu, mezi které můžeme zařadit safranin nebo indigo. Obrovský rozvoj barvicích technik přišel v devatenáctém století, kdy byla syntetizována široká paleta nových barviv. Ta často vznikala pro použití v textilním průmyslu, ale značná část z nich si později našla své místo v histologii. Mnoho z těchto barviv, přírodních i syntetických, je dodnes používáno v celé řadě barvicích technik. I přes nové diagnostické nástroje (mezi které můžeme zařadit nejen IH a IF techniky, ale také proteomiku a molekulární genetiku) histologická barvení nadále zůstávají nedílnou součástí rutinní histopatologické diagnostiky i výzkumu. [58] [59]

Proces histologického barvení tzv. formol-parafinových tkáňových řezů, je možné rozdělit do několika základních kroků, které ukazuje Schéma 3

**Schéma 3** Základní kroky procesu histologického barvení.



## Deparafinace

Deparafinace je proces odstranění parafrinové matrice z již ukrojených a na podložním skle upevněných řezů. Provádí se ponořením připravovaných preparátů do lázně s xylenem. Postup deparafinace zpracovávaných vzorků je uveden v Tabulce 9.

**Tabulka 9** Postup deparafinace.

Obsah lázně	Délka expozice
Xylen	5 min
Xylen	5 min
Xylen	5 min

## Zavodnění

Cílem zavodnění je odstranit z tkáně xylen a postupně ho nahradit vodou. Pro zavodnění se používá několik lázní s klesající koncentrací ethanolu. Probíhalo dle postupu v Tabulce 10.

**Tabulka 10** Postup zavodnění tkáňových řezů před barvením.

Obsah lázně	Délka expozice
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 80%	2 min
Ethanol 70%	2 min

## Vlastní barvení

Barvení je možné provádět buď ručně, nebo využít automatizované barvicí procesory, které dle definovaného programu preparáty obarví. Barvicí techniky pro průkaz amyloidu byly prováděny ručně dle postupů uvedených dále.

## Odvodnění a projasnění

Většina rutinně používaných montovacích médií je rozpustná v xylenu a jeho analogích. Aby bylo možné tkáň opětovně převést do xylenu, je odvodněna několika lázněmi se stoupající koncentrací ethanolu. Mezistupeň tvoří projasňující lázeň, jejímž účelem je odstranit z tkáně zbytky vody a zvýšit živost barev preparátu. Jako projasňující médium byl používán tzv. karbol-xylen, tedy 25% roztok fenolu v xylenu. Poté byla skla s obarvenými řezy umístěna do zásobníku montovacího automatu (tkáň neustále ponořená v xylenu).

**Tabulka 11** Postup odvodnění a projasnění obarvených řezů.

Obsah lázně	Délka expozice
Ethanol 80%	Oplach
Ethanol 96%	Oplach
Ethanol 96%	Oplach
Karbol-xylen	5 min
Xylen	Oplach
Xylen	Oplach

## **Montování**

Jako montování se označuje proces dokončení trvalých histologických preparátů. Je realizován aplikací montovacího média a upevněním krycího skla, které je po zaschnutí neoddělitelně spojeno s podložním sklem a preparát je připraven pro hodnocení. Preparáty byly montovány automatem s použitím komerčně dodávaného montovacího média Pertex.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST I:

### VÝBĚR VHODNÉ SCREENINGOVÉ TECHNIKY

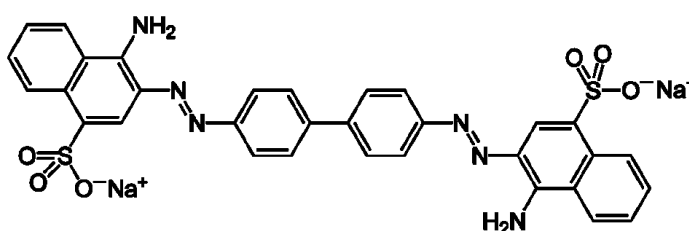
---

#### 5.1 POUŽITÁ BARVIVA A METODICKÉ POSTUPY BARVÍCÍCH TECHNIK

##### 5.1.1 Kongo červen

KČ (Direct red 28) je symetrické sulfonované azobarvivo s lineární molekulou, obsahující hydrofobní centrum s bifenylovou skupinou. Molekulový sumární vzorec:  $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$  [25].

Obrázek 1 Struktura molekuly KČ. Zdroj: [60].



KČ syntetizoval v roce 1883 mladý německý chemik Paul Böttiger, pracující pro společnost zabývající se výrobou textilních barviv. Jím syntetizované barvivo bylo společností přehlíženo, a proto se 14. února 1884 neúspěšně pokusil získat patent pod vlastním jménem. Práva na patent nakonec prodal společnosti Aktiengesellschaft für Anilinfarbenfabrikation, která začala barvivo prodávat v roce 1885, pod názvem „Congo red“. Podobně jako u dalších textilních barviv bylo brzy po objevu KČ testováno její případné využití v histologii. Poprvé byla pro barvení tkání použita v roce 1886, ale až roku 1922 byla objevena afinita k amyloidu. V roce 1927 byl poprvé popsán charakteristický dichroický dvojlom, tedy jev, který po obarvení KČ vykazuje AD v polarizovaném světle. Tento zlomový bod odstartoval celosvětové rozšíření KČ v diagnostice amyloidózy. [9] [61]

KČ se na amyloidové fibrily váže díky jejich strukturálnímu uspořádání. Lineární molekuly barviva se interkalačně včlení mezi jednotlivé vrstvy proteinových podjednotek  $\beta$ -skládaného listu. Vazba KČ nicméně není zcela specifická, a kromě AD mohou být slabě obarveny i další struktury (např. myokard, kolagen, fibrinogen, hyalin). Mikroskopie ve světlém poli nicméně není diagnostická a nespecificky obarvené struktury nevykazují charakteristické znaky při pozorování v polarizovaném světle. Pro diagnostiku SA jsou využívány také fluorescenční vlastnosti KČ, které umožňují detekovat i méně objemná depozita. Více než sto let po svém objevu má KČ stále zásadní význam při detekci amyloidu. Barvení histologických preparátů s využitím KČ je stále zlatým standardem při diagnostice amyloidózy. [25] [61] [62] [63]

Molekulární interakce mezi KČ a amyloidovými fibrilami byla v minulosti klinicky využívána k průkazu a kvantifikaci amyloidu v těle pacienta také jiným způsobem. Pacientovi bylo intravenózně podáno známé množství KČ a po definované časové prodlevě byla stanovena její koncentrace v plazmě. Rozdíl mezi očekávanou a naměřenou hladinou (koncentrací) pak určoval přítomnost a případně odhad množství amyloidu. Podle dostupných pramenů byla tato metoda využívána až do sedmdesátých let minulého století. [6] [9] [61]



Nařízení Komise EU 2017/776, kterým se pro účely přizpůsobení vědeckotechnickému pokroku mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, zařazuje KČ do klasifikačních kategorií Carc. 1B a Repr. 2 (H350, H361d). Při použití tohoto barviva by mělo být dbáno na bezpečnostní opatření a používání osobních ochranných pomůcek. [64]

### 5.1.1.1 Kongo červeně – metoda dle Highmana

#### **Příprava roztoků**

Barvicí roztok: 0,5 g KČ rozpustit ve 100 ml 50% ethanolu.

Diferenciační roztok: 100 ml 80% ethanolu + 1 ml 1% KOH.

#### **Tkáňový vzorek**

Vhodné jsou formol-parafínové řezy o tloušťce 5 µm.

#### **Postup barvení**

**Tabulka 12** Metodický postup barvení KČ dle Highmana.

#	KROK	ČAS
1	deparafinace	
2	destilovaná voda	oplach
3	barvicí roztok	30 min
4	destilovaná voda	oplach
5	diferenciační roztok	oplach
6	destilovaná voda	oplach
7	tekoucí kohoutková voda	5 min
8	Mayerův hematoxylin	5 min
9	tekoucí kohoutková voda	10 min
10	odvodnit	
11	zamontovat	

#### **Výsledky barvení**

Jádra – modře

Amyloid – červeně

Erytrocyty – oranžově

#### **Poznámka**

Metoda převzata ze zdroje [25]

Barvicí technika by vždy měla být prováděna s použitím známé pozitivní kontroly.

### 5.1.1.2 Kongo červeně – metoda dle Stokesese

#### **Příprava roztoku**

Barvicí roztok: 0,5 g KOH rozpustit v 50 ml destilované vody + přidat 200 ml absolutního alkoholu. Přidávat KČ až do vytvoření nasyceného roztoku (cca 3 g). Připravit den před použitím, roztok je stabilní tři měsíce.

#### **Tkáňový vzorek**

Vhodné jsou formol-parafínové řezy o tloušťce 5 µm.

#### **Postup barvení**

**Tabulka 13** Metodický postup barvení KČ dle Stokesese.

#	KROK	ČAS
1	deparafinace do 70% ethanolu	
2	barvicí roztok	40 min
3	destilovaná voda	oplach
4	tekoucí kohoutková voda	5 min
5	Mayerův hematoxylin	5 min
6	tekoucí kohoutková voda	10 min
7	odvodnit	
8	zamontovat	

#### **Výsledky barvení**

Jádra – modře

Amyloid – červeně

Erytrocyty – oranžově

#### **Poznámka**

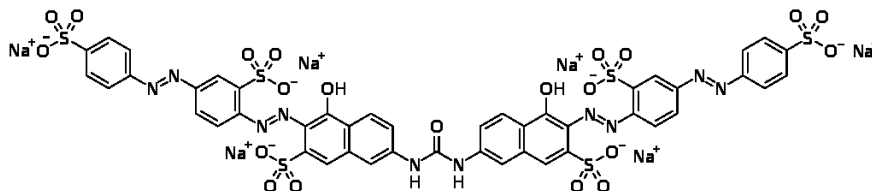
Metoda převzata ze zdroje [25]

Barvicí technika by vždy měla být prováděna s použitím známé pozitivní kontroly.

### 5.1.2 Sirius red F3B

Sirius red F3B (Direct red 80) je polyazové barvivo, k jehož představení došlov roce 1924. Syntetizováno bylo pro použití v textilním barvířství, jako barvivo pro biologii se používá od roku 1964. Molekulový sumární vzorec:  $C_{45}H_{26}N_{10}Na_6O_{21}S_6$ . [25] [63] [65] V české literatuře se používá označení Saturnová červeně.

**Obrázek 2** Struktura molekuly barviva Sirius red F3B. Zdroj: [66].

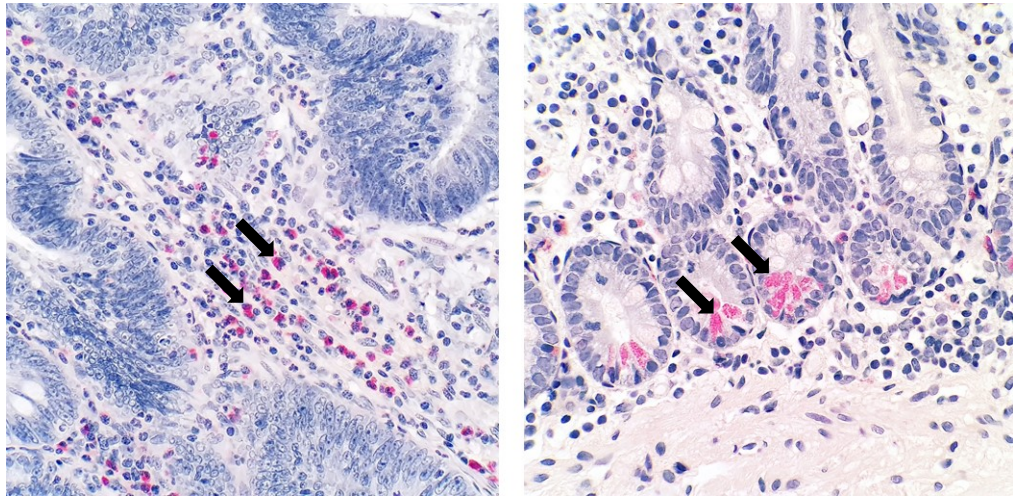


V histopatologii má Sirius red F3B dvě hlavní oblasti použití. Především je součástí celé řady metod sloužících k vizualizaci kolagenních struktur, dále pak slouží k průkazu AD. Tkáňové komponenty, barvené tímto barvivem, vykazují při pozorování v polarizovaném světle charakteristický dvojlom. Kolagenní vlákna mají v závislosti na své tloušťce oranžovožlutý (silnější vlákna), až žlutozelený (slabší vlákna) dvojlom, amyloidová depozita vykazují dvojlom zelený. [25] [65]

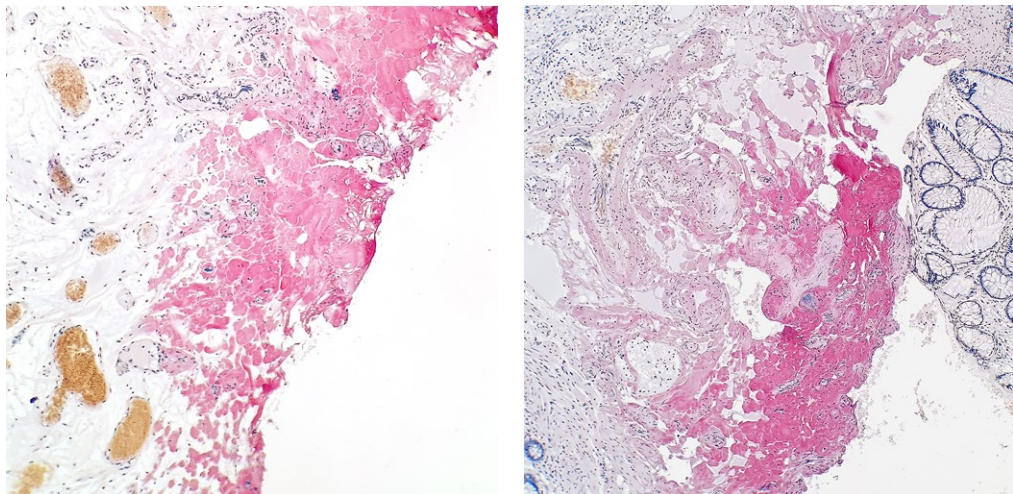
Při použití správného metodického postupu je ve výsledném preparátu amyloid obarven fuchsiově až červeně, v ostrém kontrastu s pozadím, které je šedomodré. Tento vysoký kontrast (ve srovnání s KČ) je výhodný při detekci fokálních depozit a pro screeningové použití. Nevýhodou je absence fluorescenčních vlastností. Ačkoli je barvitelnost amyloidu pomocí tohoto barviva známa již od roku 1965, je stále spíše doplňkovým barvením. [25] [63] [65]

Sirius red F3B má při technikách k průkazu amyloidu neselektivní afinitu také k cytoplazmatickým granulím eosinofilních granulocytů, žírných buněk a Panethových buněk (Obrázek 3). Jmenované elementy je možné považovat za přirozeně se vyskytující kontrolu správně provedeného histologického barvení. Falešnou pozitivitou (v pravém smyslu) je pak afinita ke tkáni, která byla termicky poškozena například při endoskopickém odběru polypózních afekcí sliznice GIT (Obrázek 4). Na tuto známou falešnou pozitivitu je třeba brát zřetel, a při hodnocení preparátů zohlednit také odběrovou techniku. [63] [65]

**Obrázek 3** Nespecifická vazba barviva Sirius red F3B na cytoplazmatická granula eosinofilních granulocytů (vlevo), žírných buněk a Panethových buněk (vpravo). 400x.



**Obrázek 4** Falešná pozitivita při použití barviva Sirius red F3B. Obarveny jsou úseky tkáně, které byly termicky poškozeny při endoskopickém odběru. 200x.



Při syntéze tohoto barviva nejsou používány karcinogenní látky (např. benzidin), a ani jeho degradace není spojena s uvolňováním toxických produktů. Tyto vlastnosti přispívají k jeho rozšířenému použití v řadě oborů (textilní barvířství, papírenství, kosmetika, biologie). Díky rostoucímu tlaku na minimalizaci použití toxických látek v laboratořích se oblast jeho použití bude zřejmě nadále rozšiřovat. [65]

### 5.1.2.1 Sirius red – metoda dle Llewellyna

#### **Příprava roztoku**

Barvicí roztok: 0,5 g Sirius red F3B rozpustit v 45 ml destilované vody. Přidat 50 ml absolutního alkoholu a 1 ml 1% hydroxidu sodného. Za důkladného míchání postupně přidávat 20% roztok chloridu sodného (cca 4 ml), dokud se nezačne tvořit jemná sraženina (lze pozorovat proti světlu). Nechat stát přes noc a zfiltrovat.

#### **Tkáňový vzorek**

Vhodné jsou formol-parafínové řezy o tloušťce 3–4  $\mu\text{m}$ .

#### **Postup barvení**

**Tabulka 14** Metodický postup barvení Sirius red dle Llewellyna.

#	KROK	ČAS
1	deparafinace	
2	destilovaná voda	oplach
3	Mayerův hematoxylin	10 min
4	tekoucí kohoutková voda	10 min
5	70% ethanol	oplach
6	barvicí roztok	1 hod
7	tekoucí kohoutková voda	10 min
8	odvodnit	
9	zamontovat	

#### **Výsledky barvení**

Jádra – modře až šedomodře

Amyloid – fuchsiově až karmínově červeně

#### **Poznámka**

Metoda převzata ze zdroje [25]

Barvicí technika by vždy měla být prováděna s použitím známé pozitivní kontroly.

### 5.1.2.2 Sirius red – metoda dle Šteinerja

#### **Příprava roztoků**

Zásobní roztok barviva: 2 g Sirius red F3B rozpustit ve 100 ml destilované vody.

Pracovní roztok barviva: 80 ml zásobního roztoku + 20 ml glycerolu.

#### **Tkáňový vzorek**

Vhodné jsou formol-parafínové řezy o tloušťce 3–4  $\mu\text{m}$ .

#### **Postup barvení**

**Tabulka 15** Metodický postup barvení Sirius red dle Šteinerja.

#	KROK	ČAS
1	deparafinace do 70% ethanolu	
2	Weigertův železitý hematoxylin	10 min
3	tekoucí kohoutková voda	10 min
4	destilovaná voda	oplach
5	pracovní roztok barviva	2 hod při 37 °C
6	destilovaná voda	oplach
7	odvodnit	
8	zamontovat	

#### **Výsledky barvení**

Jádra – modře až šedomodře

Amyloid – fuchsiově až karmínově červeně

#### **Poznámka**

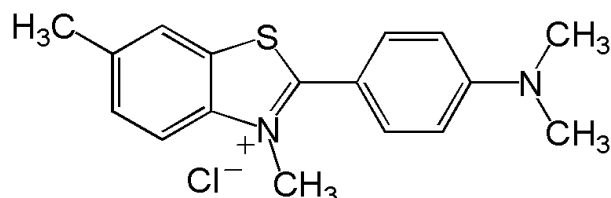
Data pro provedení metody čerpány ze zdroje [67]. Metoda byla modifikována a validována oproti KČ.

Barvicí technika by vždy měla být prováděna s použitím známé pozitivní kontroly.

### 5.1.3 Thioflavin T

Thioflavin T je fluorescenční benzothiazolové barvivo, které bylo v roce 1959 představeno jako potenciální nástroj pro fluorescenční detekci amyloidu v histologických preparátech. Thioflavin T, selektivně vázaný v amyloidových depozitech, vykazuje dramatický nárůst fluorescenční aktivity oproti volnému a nespecificky vázanému barvivu. Molekulový sumární vzorec:  $C_{17}H_{19}ClN_2S$ . [9] [68]

**Obrázek 5** Struktura molekuly barviva Thioflavin T. Zdroj: [69].



Další výzkumy (zejména na přelomu osmdesátých a devadesátých let) ukázaly, že na amyloid vázané barvivo vykazuje významný posun jak v excitačním (z 385 na 450 nm), tak i emisním (z 445 na 482 nm) maximu. Tato specifická vlastnost je podmíněna navázáním Thioflavinu T na proteiny s konformací  $\beta$ -skládaného listu a je identická pro všechny typy amyloidových fibril. Panuje všeobecný názor, že nárůst fluorescenční aktivity vázaného Thioflavinu T je způsoben imobilizací molekulárních substruktur, které v roztoku volně rotují díky jednoduché uhlíkové vazbě. [70]

Nevýhodou Thioflavinu T je skutečnost, že oproti KČ a Siriu red F3B nejsou histologické preparáty stálé. Zejména pokud jsou skladovány na světle, časem blednou (mohou být opětovně obarveny, pokud je třeba). Naopak výhodou Thioflavin T je snadné a relativně předvídatelné provedení barvicí techniky. V přítomnosti amyloidu vydává Thioflavin T jasnou žlutozelenou fluorescenci, která umožňuje odhalení i drobných fokálních depozit. Od doby svého objevu se Thioflavin T stal celosvětově rozšířeným nástrojem nejen pro histopatologickou diagnostiku, ale zejména pro experimentální činnost, zaměřenou na zkoumání formace a vlastností amyloidových fibril. [9] [68] [70]

Vazba Thioflavinu T není pro amyloid zcela specifická a v omezené míře může dojít k navázání barviva na další tkáňové komponenty (např. kolagen, fibrin, keratin, Panethovy buňky, zymogenová granula a juxtaglomerulární aparát). Tuto nespecifickou vazbu je možné omezit provedením barvicí techniky při nízkém pH. Nespecificky vázané barvivo by navíc, ve srovnání s vazbou na amyloid, nemělo vydávat srovnatelně intenzivní fluorescenci. Přesto je jeho použitelnost ve tkáních s vysokým obsahem kolagenu limitovaná. [9] [63] [70]



### 5.1.3.1 Thioflavin T – metoda dle Vassara a Cullinga

#### **Příprava roztoků**

1% vodný roztok Thioflavinu T.

1% vodný roztok kyseliny octové.

#### **Tkáňový vzorek**

Vhodné jsou formol-parafínové řezy o tloušťce 3–4  $\mu\text{m}$ .

#### **Postup barvení**

**Tabulka 16** Metodický postup barvení Thioflavinem T dle Vassara a Cullinga.

#	KROK	ČAS
1	deparafinace	
2	destilovaná voda	oplach
3	Mayerův hematoxylin	2 min
4	tekoucí kohoutková voda	10 min
5	roztok Thioflavinu T	3 min
6	destilovaná voda	oplach
7	1% kyselina octová	20 min
8	tekoucí kohoutková voda	oplach
9	odvodnit	
10	zamontovat	

#### **Výsledky barvení**

V závislosti na nastavení a konfiguraci fluorescenčního mikroskopu vykazuje amyloid (a v menší míře také elastická vlákna a některé další struktury) stříbřitě modrou nebo žlutou až žlutozelenou fluorescenci.

#### **Poznámka**

Metoda převzata ze zdroje [25]

Barvicí technika by vždy měla být prováděna s použitím známé pozitivní kontroly.

### 5.1.3.2 Thioflavin T při pH 1,5 – metoda dle Burnse

#### **Příprava roztoků**

0,5% roztok Thioflavinu T v 0,1 M HCl, připravený vždy čerstvý.

1% vodný roztok kyseliny octové.

#### **Tkáňový vzorek**

Vhodné jsou formol-parafínové řezy o tloušťce 3–4  $\mu\text{m}$ .

#### **Postup barvení**

Barvení využívá stejný metodický postup jako předchozí technika. Kyselé pH zvyšuje selektivitu barvení zvýhodněním vazby Thioflavinu T na amyloid, oproti neselektivní vazbě na struktury pozadí.

#### **Výsledky barvení**

Viz předchozí technika, barvení je více specifické.

#### **Poznámka**

Metoda převzata ze zdroje [25]

Barvicí technika by vždy měla být prováděna s použitím známé pozitivní kontroly.

## **5.2 HODNOCENÍ BARVÍCÍCH TECHNIK**

S ohledem na fakta uvedená v kap. 3.9 (Zdravotnický screening), tedy že hodnocení biopsií ve screeningovém režimu nemá za cíl stanovit konečnou diagnózu ale jednoduše a efektivně filtrovat vzorky na pozitivní a negativní, byly uvedené barvicí techniky hodnoceny v několika vybraných parametrech. Hodnocení většiny parametrů bylo prováděno při konzultacích s doc. MUDr. Evou Honsovou, Ph.D. a dalšími lékařskými i nelékařskými zdravotníky z Pracoviště klinické a transplantační patologie IKEM. Bylo také provedeno přímé mikroskopické porovnání výsledků jednotlivých barvicích metod. Pro jednoduchost závěrečného vyhodnocení byly metodám u zkoumaných parametrů přidělovány pouze dvě hodnoty: „vyhovující“ a „nevyhovující“. Parametry byly vybrány tak, aby komplexně pokrývaly jak laboratorní část vyšetření, tak vlastní mikroskopické hodnocení preparátů a jejich stabilitu.

### **5.2.1 Hodnocené parametry**

#### **Vlastní provedení metody**

Zohledňuje přípravu zásobních a pracovních roztoků, složitost provedení barvicí techniky a možnost průběžné kontroly barvení. Dále zahrnuje nutnost diferencování apod.

#### **Stabilita reagensů**

Vyjadřuje schopnost barvicích roztoků uchovat si optimální vlastnosti v průběhu času, případně zohledňuje nutnost připravit vždy čerstvé. U alkoholických roztoků byl v hodnocení zahrnut jejich odpar.

#### **Opakovatelnost**

Opakovatelností je myšlena schopnost metody reprodukovat shodný výsledek vyšetření (včetně intenzity zbarvení) u vzorků, které byly zpracovány v jedné sérii. Byla posuzována zhotovením pěti preparátů z jednoho bloku (tkáňového vzorku) se známou pozitivní kontrolou. Všechny preparáty byly zhotoveny naráz, s využitím identického barvicího roztoku a za shodných podmínek.

#### **Reprodukovatelnost**

Popisuje schopnost metody reprodukovat shodný výsledek vyšetření (včetně obdobné intenzity zbarvení) u vzorků, které byly zpracovány za mírně odlišných podmínek, s využitím jiného barvicího roztoku (připraveného identickým způsobem) a s delšími časovými rozestupy. Reprodukovatelnost byla posuzována zhotovením pěti preparátů z jednoho bloku (tkáňového vzorku) se známou pozitivní kontrolou. Preparáty byly zhotovovány postupně (v průběhu pěti týdnů) a následně společně hodnoceny.

#### **Kontrast pozitivní/negativní**

Tato charakteristika vyjadřuje barevný kontrast mezi obarvenými AD a neobarvenou okolní tkání.

### Náročnost hodnocení

Složená charakteristika zahrnující v sobě výše popsany, jednoduše pozorovatelný barevný kontrast a také případnou nutnost použití fluorescenčního mikroskopu.

### Schopnost zachytit drobná depozita

Hodnotí schopnost barvicí metody dostatečně jednoznačně prokázat přítomnost drobných fokálních depozit. Je vyjádřena možností použít polarizační, případně fluorescenční mikroskopie ke zvýšení citlivosti.

### Falešná pozitivita

Zohledňuje nespecifickou vazbu barviva na neamyloidové struktury, a tedy míru rizika falešně pozitivního výsledku vyšetření.

### Falešná negativita

Vyjadřuje míru rizika falešně negativního výsledku vyšetření v případě, že AD nejsou barvicí metodou zachycena. Do jisté míry vypovídá o robustnosti metody při drobných změnách podmínek.

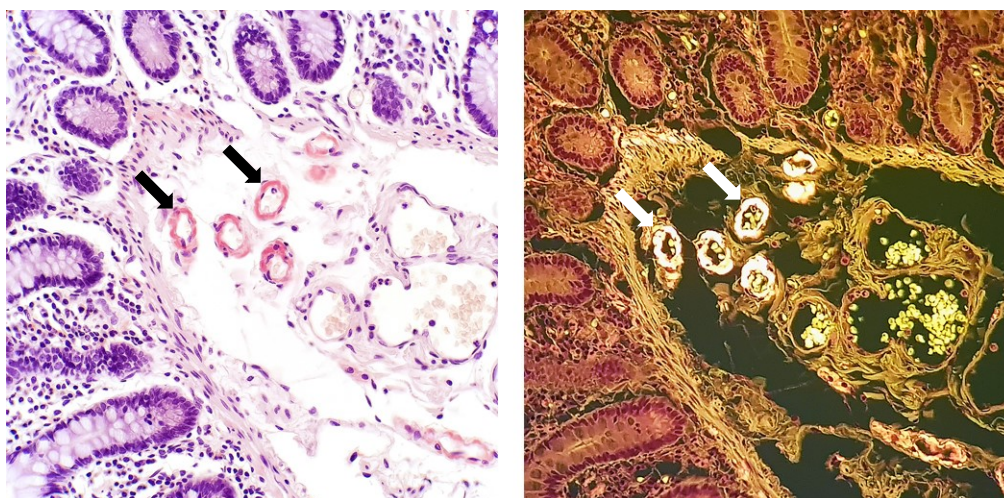
### Stálost preparátů

Stálostí je myšlena možnost již hotové preparáty archivovat, po čase je vyhledat a opětovně mikroskopicky hodnotit se stejným výsledkem.

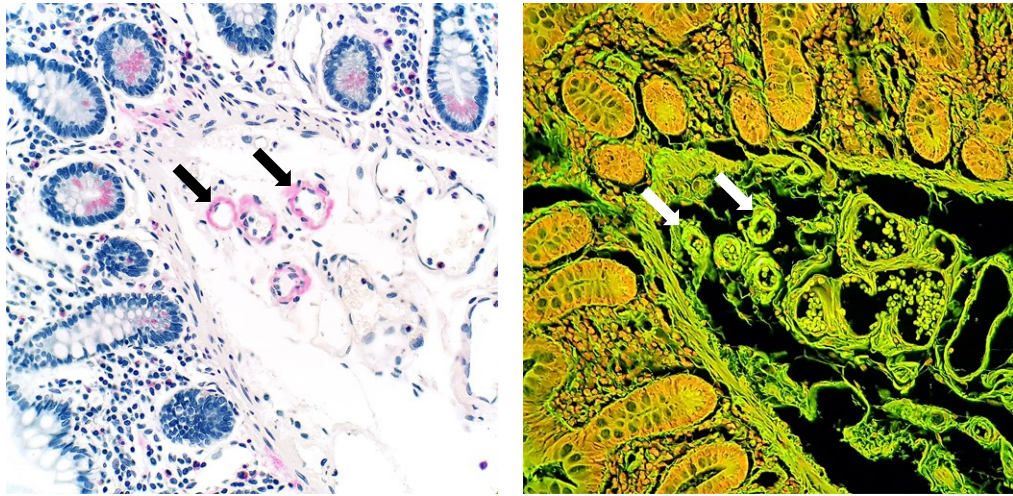
## 5.2.2 Přímé mikroskopické porovnání

Přímé mikroskopické porovnání barvicích metod bylo provedeno zhotovením preparátů ze sériových řezů, ukrojených z bloků se známými pozitivními kontrolami. Vyhotovené preparáty pak byly mikroskopicky hodnoceny s ohledem na zamýšlené použití ve screeningovém režimu. Nebyla tedy hodnocena vlastní diagnostická váha metod, ale spíše schopnost rychle a jednoduše odhalit přítomnost depozit ve vzorku.

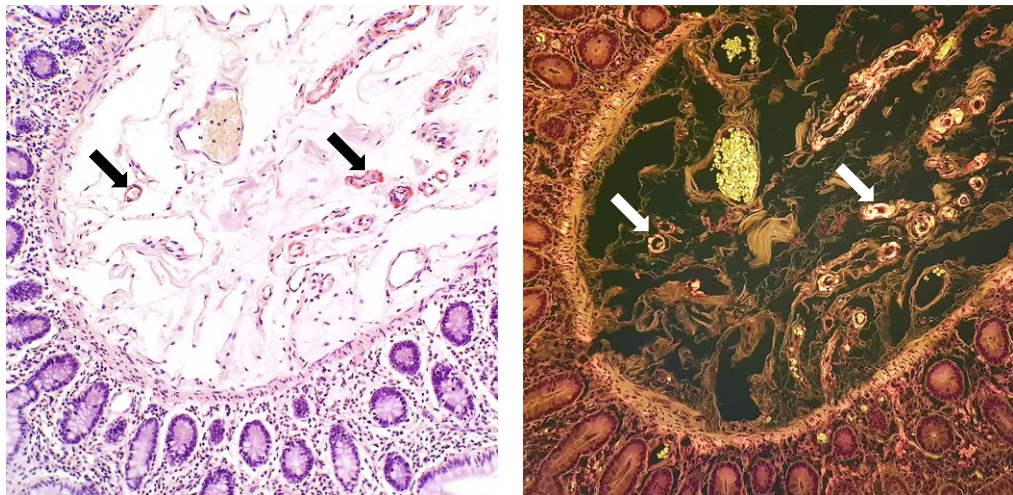
**Obrázek 6** KČ dle Stokesa. Vlevo klasická světelná mikroskopie, vpravo fluorescenční. Sliznice tenkého střeva s depozity amyloidu. 400x.



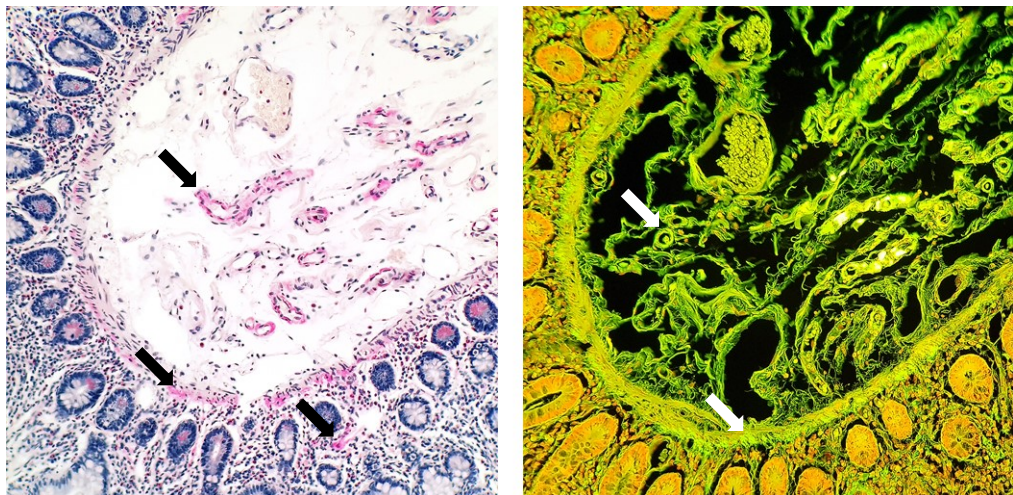
**Obrázek 7** Vlevo Sirius red dle Šteinerja. Vpravo Thioflavin T dle Burnse (fluorescenční mikroskopie). Sliznice tenkého střeva s depozity amyloidu. 400x.



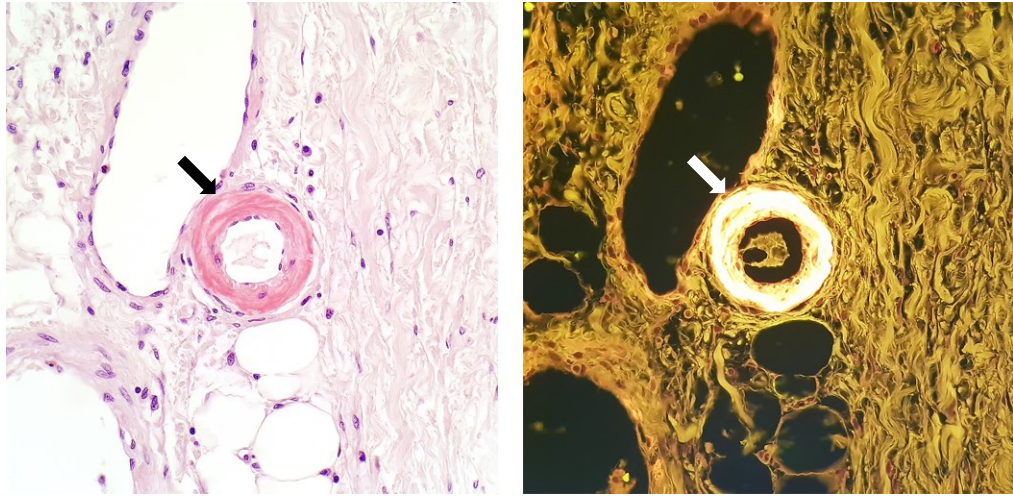
**Obrázek 8** KČ dle Stokesa. Vlevo klasická světelná mikroskopie, vpravo fluorescenční. Sliznice tenkého střeva s depozity amyloidu. 400x.



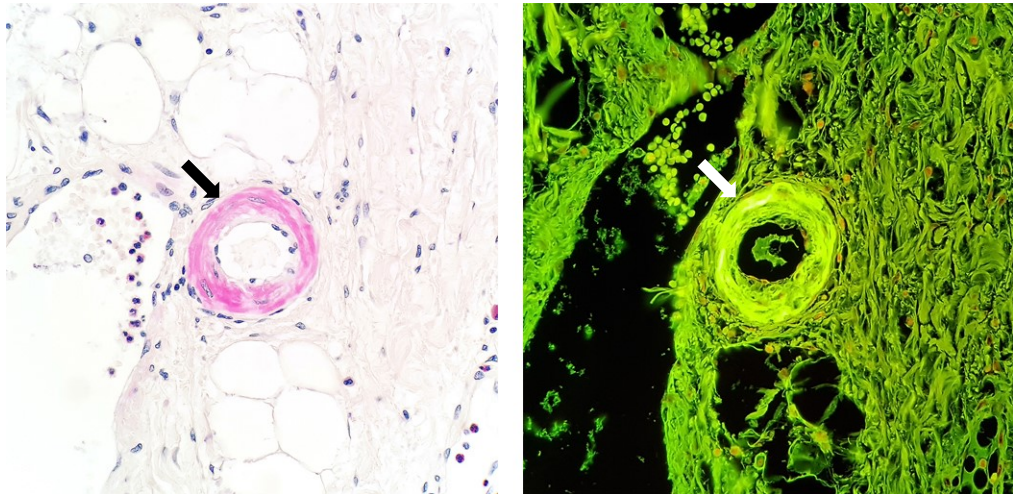
**Obrázek 9** Vlevo Sirius red dle Šteinerja. Vpravo Thioflavin T dle Burnse (fluorescenční mikroskopie). Sliznice tenkého střeva s depozity amyloidu. 400x.



**Obrázek 10** KČ dle Stokesa. Vlevo klasická světelná mikroskopie, vpravo fluorescenční. Arterie s depozity amyloidu ve vazivovém pouzdře ledviny. 400x.



**Obrázek 11** Vlevo Sirius red dle Šteinera. Vpravo Thioflavin T dle Burnse (fluorescenční mikroskopie). Arterie s depozity amyloidu ve vazivovém pouzdře ledviny. 400x.





## **7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST II: VLASTNÍ SCREENINGOVÝ PROGRAM**

---

V první části experimentální studie byly porovnány dostupné barvicí techniky používané k průkazu amyloidových hmot ve tkáni. Na základě výsledků porovnání byla jako vhodná screeningová technika zvolena metoda Sirius red F3B dle Šteinera.

Druhá část experimentální studie spočívala v provádění screeningových vyšetření u všech endoskopických bioptických vzorků GIT, které byly v průběhu roku 2017 zpracovány na Pracovišti klinické a transplantační patologie IKEM.

Bioptické vzorky z jícnu, žaludku, tenkého střeva, tlustého střeva a rekta pocházely od různorodé skupiny pacientů, kteří absolvovali endoskopické vyšetření z nejrůznějších indikací. Hodnocení vyhotovených histologických preparátů prováděli dvouatestovaní patologové.

Odběr bioptických tkáňových vzorků a metodický popis techniky histopatologického zpracování viz kapitoly 4 a 5.



## 8 VÝSLEDKY EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI II

V rámci screeningového programu bylo histopatologicky vyšetřeno celkem 4285 vzorků od 2572 pacientů. U celkem deseti vzorků od pěti pacientů byla v endoskopických biopsiích GIT zachycena AD a u čtyř pacientů byla provedena typizace amyloidózy. U jednoho pacienta byla IH neprůkazná a pro stanovení přesné diagnózy bylo doporučeno odběr opakovat a pro vyšetření poskytnout nefixovaný materiál. Relativní četnost pozitivního záchytu v provedeném screeningovém programu je tedy cca 1/500 vyšetřených pacientů.

Diagnóza AL $\lambda$  amyloidózy byla u jednoho z pacientů stanovena již dříve z renální biopsie. Tato informace však v době záchytu AD ve střevní sliznici nebyla dostupná a screeningové vyšetření tedy správně prokázalo jejich přítomnost. U čtyř pacientů se jednalo o náhodný záchyt, který posléze vedl ke stanovení diagnózy a zavedení vhodné terapie. Podrobná data o počtech pacientů a pozitivních/negativních vzorků v Tabulkách 18 a 19.

**Tabulka 18** Přehled počtu provedených screeningových vyšetření.

Vyšetření	Pacientů celkem	Pacientů pozitivních	Vzorků celkem	Vzorků pozitivních
Gastroskopie	1008	Podrobná data v Tabulce 19	1698	5
Kolonoskopie	1564	Podrobná data v Tabulce 19	2587	5
<b>Celkem</b>	<b>2572</b>	<b>5</b>	<b>4285</b>	<b>10</b>

**Tabulka 19** Základní údaje o pacientech s SA zachycených screeningovým programem.

Číslo pacienta	Pohlaví	Věk v čase diagnózy	Lokalizace odběru	Počet pozitivních vzorků z celkového počtu vyšetřených	Typ amyloidózy
1	Žena	52	Jícen	0/1	AL $\lambda$ amyloidóza
			Žaludek	1/1	
			Tenké střevo	1/1	
2	Žena	55	Jícen	1/1	AA amyloidóza
			Žaludek	1/1	
3	Žena	77	Tlusté střevo	2/3	Neurčeno
			Rektosigma	0/1	
4	Muž	44	Tlusté střevo	2/2	AA amyloidóza
5	Muž	62	Jícen	0/1	AL $\lambda$ amyloidóza
			Tenké střevo	1/1	
			Tlusté střevo	1/1	

## 9 DISKUSE

---

Amyloidózy byly a jsou předmětem mnoha vědeckých výzkumů již od dob Rudolpha Virchowa. Jejich povaha byla dlouhou dobu zahalena tajemstvím a teprve technologický pokrok druhé poloviny dvacátého století přispěl díky novým poznatkům k jejich pochopení. Věda však na zodpovězené otázky reaguje položením nových, často mnohem složitějších, a tak ani dnes neznáme plný rozsah a všechny zákonitosti podmiňující rozvoj a multifaktoriální mechanismus působení SA.

Přes komplexnost a heterogenitu mají amyloidózy společný znak, kterým je ukládání proteinových depozit ve tkáních. Tato depozita mohou být histopatologicky detekována a patologie tak tvoří ústřední prvek diagnostiky. Dá se předpokládat, že s dalším technologickým rozvojem budou stále častěji uplatňovány nejen techniky molekulární patologie, ale také vysoce efektivní proteomické metody. Ty jsou dnes dostupné především ve velkých referenčních centrech, ale s výhledem na nadcházející desetiletí se dá předpokládat jejich zvyšující se zastoupení v rutinní diagnostice.

Cílem této DP bylo sestavit panel dostupných histologických technik používaných k průkazu AD ve tkáních. Vybrané techniky zhodnotit s ohledem na možnost jejich použití ve screeningovém režimu a zvolit z nich tu, která svými parametry nejlépe vyhovuje. Ve druhé experimentální části pak na Pracovišti klinické a transplantační patologie IKEM probíhala vlastní screeningová studie, do které byly zahrnuty všechny bioptické tkáňové vzorky GIT, zpracovávané v průběhu roku 2017.

Pacienti, kteří podstupovali endoskopické vyšetření GIT, tvořili heterogenní skupinu a klinické indikace pro bioptický výkon tvořily široké spektrum. Část z nich byla zaměřená na odhalení výskytu patologických novotvarů sliznice. Další skupinou byly dyspeptické obtíže různého charakteru, nebo podezření na bakteriální či virové infekce. V neposlední řadě tvořili část pacienti s chronickými zánětlivými onemocněními GIT. Onemocnění ze skupiny IBD (Inflammatory bowel disease) mohou být příčinou vzniku systémové AA amyloidózy, a jsou tedy v tomto ohledu rizikový, faktorem. Gastrointestinální postižení se u SA projevuje značně nespecificky, a proto by amyloidózy měly být zvažovány i u pacientů s dyspeptickými obtížemi bez další zjevné příčiny. Screeningový program se v případě těchto pacientů, spadajících do některé z rizikových skupin, stává spíše cíleným case-findingem. [1] [37] [48]

Výsledky první experimentální části ukázaly, že nejvhodnější screeningovou technikou je parafinová histologie, využívající k detekci amyloidu barvivo Sirius red F3B v metodice dle Šteinerja. Nevýhodou této techniky je falešná pozitivita u termicky poškozené tkáně. Vzhledem k tomu, že je tato falešná pozitivita dobře známa a v preparátech se projevuje jako lehce identifikovatelné plošné červené oblasti, nepředstavuje diagnostické nebezpečí. Výhodami jsou naopak snadné provedení, dobrá stabilita roztoků, poměrně snadné mikroskopické hodnocení a schopnost dobře zviditelnit i drobná depozita. Technicky náročnější použití fluorescenční a/nebo polarizační mikroskopie je vhodné pro potvrzení diagnózy, Sirius red F3B však nejlépe splňuje požadavky na diskutovaný screeningový program.

V rámci druhé experimentální části této DP bylo vyšetřeno celkem 4285 vzorků (z toho 10 pozitivních) od 2572 pacientů (z toho 5 pozitivních). Biopsie s obsahem AD pocházely od 0,19 % pacientů a představovaly 0,23 % všech vzorků. Ačkoli u jednoho pacienta již byla diagnóza amyloidózy stanovena dříve, tato informace nebyla v době screeningového vyšetření známa. I přesto, že se zdánlivě jedná o nízký záchyt, je třeba brát v úvahu fakt, že amyloidózy jsou považovány za raritní onemocnění. Četnost jejich výskytu v populaci není známa, nicméně obecně se řadí mezi vzácné choroby. Jedná se navíc o závažná onemocnění, která přímo ovlivňují kvalitu a délku života pacienta. Amyloidová kardiomyopatie a nefropatie jsou hlavními dvěma příčinami úmrtí pacientů se SA. Za poslední dvě desetiletí došlo díky intenzivnímu výzkumu k pokroku na poli terapeutického managementu SA, a zejména v případě časně diagnózy se tak prognóza pacientů poměrně významně zlepšila. Stále se však jedná o potenciálně fatální stavy a jejich časná diagnóza představuje klíčový prvek efektivní terapie. [13] Z tohoto pohledu hodnotíme screeningový program jako úspěšný, neboť díky jeho výsledkům mohla být u několika pacientů zahájena adekvátní terapie, což velmi pravděpodobně pozitivně ovlivní délku a kvalitu jejich života.

Odborná literatura nepopisuje obdobný screeningový program, výsledky tedy není možné hodnotit v kontextu dobře srovnatelných studií. Co porovnat lze, je lokalizace zachycených depozit. Publikované studie [16] [49] uvádí, že nejčastěji jsou AD zachycena, pokud je součástí tkáňového vzorku tunica submucosa, která je hojně vaskularizovaná a umožňuje tak zachytit depozita ve stěně a blízkosti cév. Tyto závěry potvrzují i mikroskopické nálezy, které popisuje tato DP. Nejčastějším místem výskytu AD byly právě cévní stěny v tunica submucosa. Výskyt depozit v lamina propria mucosae a lamina muscularis mucosae byl méně častý a depozita byla obvykle fokálního charakteru. Přítomnost tunica submucosa ve vyšetřovaném vzorku snižuje riziko sampling erroru a zvyšuje senzitivitu vyšetření.

Cíle, které byly v úvodu stanoveny, se podařilo naplnit. Z dostupné odborné literatury byl sestaven up-to-date přehled základních informací o SA, mezi histopatologickými technikami byla experimentálně vybrána ta, která se nejvíce hodí pro screeningové použití a následně bylo otestováno 4285 vzorků od 2572 pacientů. Přesto existují způsoby, jak tuto práci rozšířit a doplnit. V první řadě se nabízí vyhodnotit screeningový program po delším časovém úseku, tedy zahrnující širší soubor pacientů. U pacientů s AA amyloidózou by pak bylo možné zpracovat přehled primárních zánětlivých onemocnění, které její vznik podmiňují. Při větším počtu pacientů by také bylo možné dát do souvislosti některá demografická data.

## 10 ZÁVĚR

---

Závěrem, který po vypracování všech dílčích prvků DP vyplynul je, že bylo dosaženo stanovených cílů. Výsledky mají navíc pro screeningem zachycené pacienty reálný klinický význam, protože umožnily zahájení odpovídající terapie.

## 11 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ

---

- [1] SATTIANAYAGAM, Prayman T., et al. Systemic amyloidosis and the gastrointestinal tract. *Nature Reviews Gastroenterology*. 2009, 6(10), 608-617. DOI: 10.1038/nrgastro.2009.147. ISSN 1759-5045.
- [2] MOLLEE, P., et al. How to diagnose amyloidosis. *Internal Medicine Journal*. 2014, 44(1), 7-17. DOI: 10.1111/imj.12288. ISSN 14440903.
- [3] KYLE, Robert. Amyloidosis: a convoluted story. *British Journal of Haematology*. 2001, 114(3), 529-538. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2001.02999.x. ISSN 0007-1048.
- [4] FÄNDRICH, M. On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007, 64(16), 2066-2078. DOI: 10.1007/s00018-007-7110-2. ISSN 1420-682x.
- [5] SIPE, Jean D. a Alan S. COHEN. Review: History of the Amyloid Fibril. *Journal of Structural Biology*. 2000, 130(2-3), 88-98. DOI: 10.1006/jsbi.2000.4221. ISSN 10478477.
- [6] BUXBAUM, Joel N. a Reinhold P. LINKE. A Molecular History of the Amyloidoses. *Journal of Molecular Biology*. 2012, 421(2-3), 142-159. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.01.024. ISSN 00222836.
- [7] OBICI, Laura, et al. Expanding the spectrum of systemic amyloid diseases: a new hint from the kidney. *Kidney International*. 2016, 90(3), 479-481. DOI: 10.1016/j.kint.2016.05.029. ISSN 00852538.
- [8] MORABIA, Alfredo. History of medical screening: from concepts to action. *Postgraduate Medical Journal*. 2004, 80(946), 463-469. DOI: 10.1136/pgmj.2003.018226. ISSN 0032-5473.
- [9] PICKEN, Maria M., et al. *Amyloid and related disorders: surgical pathology and clinical correlations*. 2012. New York: Humana Press, 2012. ISBN 978-160-7613-886.
- [10] SIPE, Jean D., et al. Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*. 2010, 17(3-4), 101-104. DOI: 10.3109/13506129.2010.526812.
- [11] WESTERMARK, Peter, et al. A primer of amyloid nomenclature. *Amyloid*. 2007, 14(3), 179-183. DOI: 10.1080/13506120701460923.
- [12] LAVATELLI, Francesca, et al. Systemic amyloidoses and proteomics: The state of the art. *EuPA Open Proteomics*. 2016, 11, 4-10. DOI: 10.1016/j.euprot.2016.02.003. ISSN 22129685.
- [13] WECHALEKAR, Ashutosh D., et al. Systemic amyloidosis. *The Lancet*. 2016, 387(10038), 2641-2654. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)01274-X. ISSN 01406736.
- [14] MERLINI, Giampaolo, et al. Amyloidosis: Pathogenesis and New Therapeutic Options. *Journal of Clinical Oncology*. 2011, 29(14), 1924-1933. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.2271. ISSN 0732-183x.
- [15] MAŁYSZKO, Jolanta, et al. Amyloidosis: A cancer-derived paraproteinemia and kidney involvement. *Advances in Medical Sciences*. 2017, 62(1), 31-38. DOI: 10.1016/j.advms.2016.06.004. ISSN 18961126.

- [16] FREUDENTHALER, Sophie, et al. Amyloid in biopsies of the gastrointestinal tract—a retrospective observational study on 542 patients. *Virchows Archiv*. 2016, 468(5), 569-577. DOI: 10.1007/s00428-016-1916-y. ISSN 0945-6317.
- [17] GLABE, Charles G. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiology of Aging*. 2006, 27(4), 570-575. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.04.017.
- [18] GERTZ, Morie A a S RAJKUMAR. *Amyloidosis: diagnosis and treatment*. New York: Humana Press, 2010, 238 p. Contemporary hematology. ISBN 16-076-1631-9.
- [19] VOISINE, Cindy, at al. Chaperone networks: Tipping the balance in protein folding diseases. *Neurobiology of Disease*. 2010, 40(1), 12-20. DOI: 10.1016/j.nbd.2010.05.007. ISSN 09699961.
- [20] TOYAMA, Brandon H. a Jonathan S. WEISSMAN. Amyloid Structure: Conformational Diversity and Consequences. TOYAMA, Brandon H. a Jonathan S. WEISSMAN. *Annual Review of Biochemistry*. 2011, 80(1), 557-585. DOI: 10.1146/annurev-biochem-090908-120656.
- [21] GLABE, C. G. a R. KAYED. Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis. *Neurology*. 2005, 66(1, Supplement 1), S74-S78. DOI: 10.1212/01.wnl.0000192103.24796.42.
- [22] SALAHUDDIN, Parveen, et al. Structure of amyloid oligomers and their mechanisms of toxicities: Targeting amyloid oligomers using novel therapeutic approaches. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016, 114, 41-58. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.02.065. ISSN 02235234.
- [23] SIPE, Jean D., et al. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid*. 2014, 21(4), 221-224. DOI: 10.3109/13506129.2014.964858. ISSN 1350-6129.
- [24] WESTERMARK, Peter. The pathogenesis of amyloidosis: understanding general principles. *Am J Pathol*. 1998, 152(5), 1125 - 1127.
- [25] SUVARNA, Kim S., et al. *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. 7th ed. Oxford: Churchill Livingstone Elsevier, 2013, 637 p. ISBN 978-070-2042-263.
- [26] BREYDO, Leonid a Vladimir N. UVERSKY. Structural, morphological, and functional diversity of amyloid oligomers. *FEBS Letters*. 2015, 589(19PartA), 2640-2648. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.07.013. ISSN 00145793.
- [27] KAYED, Rakez, et al. Annular Protofibrils Are a Structurally and Functionally Distinct Type of Amyloid Oligomer. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, 284(7), 4230-4237. DOI: 10.1074/jbc.M808591200. ISSN 0021-9258.
- [28] WINTER, Martin, et al. MALDI-Mass Spectrometry Imaging Identifies Vitronectin as a Common Constituent of Amyloid Deposits. *Journal of Histochemistry*. 2015, 63(10), 772-779. DOI: 10.1369/0022155415595264. ISSN 0022-1554.
- [29] RONGLIH, Liao, et al. Infusion of Light Chains From Patients With Cardiac Amyloidosis Causes Diastolic Dysfunction in Isolated Mouse Hearts. *Circulation*. 2001, 104(14), 1594 - 1597.

- [30] KISILEVSKY, Robert, et al. Historical and Current Concepts of Fibrillogenesis and In vivo Amyloidogenesis: Implications of Amyloid Tissue Targeting. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2016, 3, -. DOI: 10.3389/fmolb.2016.00017. ISSN 2296-889x.
- [31] KAYED, Rakez, et al. Permeabilization of Lipid Bilayers Is a Common Conformation-dependent Activity of Soluble Amyloid Oligomers in Protein Misfolding Diseases. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279(45), 46363-46366. DOI: 10.1074/jbc.C400260200. ISSN 0021-9258.
- [32] SEKIJIMA, Yoshiki, et al. The Biological and Chemical Basis for Tissue-Selective Amyloid Disease. *Cell*. 2005, 121(1), 73-85. DOI: 10.1016/j.cell.2005.01.018. ISSN 00928674.
- [33] BUXBAUM, Joel N. The systemic amyloidoses. BUXBAUM, Joel N. *Curr Opin Rheumatol*. 2004, 16(1), 67 - 75.
- [34] CONNOLLY, J.O., et al. Renal amyloidosis in intravenous drug users. *QJM*. 2006, 99(11), 737-742. DOI: 10.1093/qjmed/hcl092. ISSN 1460-2725.
- [35] STANKOVIC STOJANOVIC, Katia, et al. AA amyloidosis is an emerging cause of nephropathy in obese patients. *European Journal of Internal Medicine*. 2017, 39, e18-e20. DOI: 10.1016/j.ejim.2017.02.004. ISSN 09536205.
- [36] POITOU, C., et al. Serum amyloid A: production by human white adipocyte and regulation by obesity and nutrition. *Diabetologia*. 2005, 48(3), 519-528. DOI: 10.1007/s00125-004-1654-6. ISSN 0012-186x.
- [37] EBERT, Ellen C. a Michael NAGAR. Gastrointestinal Manifestations of Amyloidosis. *The American Journal of Gastroenterology*. 2008, 103(3), 776-787. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01669.x. ISSN 00029270.
- [38] LACHMANN, H a P HAWKINS. Systemic amyloidosis. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006, 6(2), 214-220. DOI: 10.1016/j.coph.2005.10.005. ISSN 14714892.
- [39] DISPENZIERI, Angela, et al. What do I need to know about immunoglobulin light chain (AL) amyloidosis?. *Blood Reviews*. 2012, 26(4), 137-154. DOI: 10.1016/j.blre.2012.03.001. ISSN 0268960x.
- [40] SCHÖNLAND, S. O., et al. Immunohistochemistry in the classification of systemic forms of amyloidosis: a systematic investigation of 117 patients. *Blood*. 2012, 119(2), 488-493. DOI: 10.1182/blood-2011-06-358507. ISSN 0006-4971.
- [41] PICKEN, Maria M. Proteomics and mass spectrometry in the diagnosis of renal amyloidosis. *Clinical Kidney Journal*. 2015, 8(6), 665-672. DOI: 10.1093/ckj/sfv087. ISSN 2048-8505.
- [42] PICKEN, Maria M. Amyloidosis-where are we now and where are we heading?. *Arch Pathol Lab Med*. 2010, 134(4), 545-51. DOI: 10.1043/1543-2165-134.4.545. ISSN 1543-2165.
- [43] SEMIGRAN, Marc J. Transthyretin Amyloidosis: A “Zebra” of Many Stripes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016, 68(2), 173-175. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.05.020. ISSN 07351097.
- [44] SATTIANAYAGAM, P. T., et al. Hereditary lysozyme amyloidosis - phenotypic heterogeneity and the role of solid organ transplantation. *Journal of Internal Medicine*. 2012, 272(1), 36-44. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2011.02470.x. ISSN 09546820.

- [45] BENSON, Merrill D. LECT2 amyloidosis. *Kidney International*. 2010, 77(9), 757-759. DOI: 10.1038/ki.2010.18. ISSN 0085-2538.
- [46] DRÜEKE, T. B. Beta2-microglobulin and amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2000, 15(Suppl. 1), 17 - 24.
- [47] FLOEGE, Jürgen a Markus KETTELER. Beta2-Microglobulin-derived amyloidosis: An update. *Kidney International*. 2001, 59(s78), 164-171. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2001.59780164.x.
- [48] FRIEDMAN, Sonia a Henry D. JANOWITZ. SYSTEMIC AMYLOIDOSIS AND THE GASTROINTESTINAL TRACT. *Gastroenterology Clinics of North America*. 1998, 27(3), 595-614. DOI: 10.1016/S0889-8553(05)70022-4. ISSN 08898553.
- [49] HOKAMA, Akira, et al. Endoscopic and histopathological features of gastrointestinal amyloidosis. *World Journal of Gastrointestinal Endoscopy*. 2011, 3(8), 157-. DOI: 10.4253/wjge.v3.i8.157. ISSN 1948-5190.
- [50] FERNANDEZ DE LARREA, C., et al. A practical approach to the diagnosis of systemic amyloidoses. *Blood*. 2015, 125(14), 2239-2244. DOI: 10.1182/blood-2014-11-609883. ISSN 0006-4971.
- [51] EVANS, Mark I., et al. Principles of Screening. *Seminars in Perinatology*. 2005, 29(6), 364-366. DOI: 10.1053/j.semperi.2005.12.002. ISSN 01460005.
- [52] GRIMES, David A a Kenneth F SCHULZ. Uses and abuses of screening tests. *The Lancet*. 2002, 359(9309), 881-884. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)07948-5. ISSN 01406736.
- [53] DELATYCKI, Martin B. The ethics of screening for disease. *Pathology*. 2012, 44(2), 63-68. DOI: 10.1097/PAT.0b013e32834e8496. ISSN 00313025.
- [54] DAI, Susie Y., et al. Cost of speed: A practical approach to evaluate a screening method from a Bayesian perspective. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2016, 30(vol. 156), 273-279. DOI: 10.1016/j.chemolab.2016.05.019. ISSN 01697439.
- [55] HOWAT, William J. a Beverley A. WILSON. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*. 2014, 70(1), 12-19. DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.01.022. ISSN 10462023.
- [56] GRIZZLE, WE. Special symposium: fixation and tissue processing models. *Biotechnic & Histochemistry*. 2009, 84(5), 185-193. DOI: 10.3109/10520290903039052. ISSN 1052-0295.
- [57] HEWITSON, Tim D. a Ian A. DARBY. *Histology protocols*. New York, N.Y.: Humana Press, 2010. Springer protocols, v. 611. ISBN 978-1-60327-344-2.
- [58] TITFORD, Michael. Progress in the Development of Microscopical Techniques for Diagnostic Pathology. *Journal of Histotechnology*. 2013, 32(1), 9-19. DOI: 10.1179/his.2009.32.1.9. ISSN 0147-8885.
- [59] ALTURKISTANI, Hani A., et al. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global Journal of Health Science*. 2015, 8(3), 72-79. DOI: 10.5539/gjhs.v8n3p72. ISSN 1916-9744.
- [60] MILLS, Ben. Congo red 2D skeletal. In: *Wikimedia Commons* [online]. 2006 [cit. 2018-03-22]. Dostupné z: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Congo-red-2D-skeletal.png>



- [61] STEENSMA, David P. "Congo" red: Out of Africa?. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2001, 125(2), 250-2. DOI: 10.1043/0003-9985(2001)125<0250:CR>2.0.CO;2.
- [62] KHURANA, Ritu, et al. Is Congo Red an Amyloid-specific Dye?. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, 276(25), 22715-22721. DOI: 10.1074/jbc.M011499200. ISSN 0021-9258.
- [63] FERNANDEZ-FLORES, A. A review of amyloid staining: methods and artifacts. *Biotechnic & Histochemistry*. 2010, 86(5), 293-301. DOI: 10.3109/10520291003784493. ISSN 1052-0295.
- [64] Nařízení Komise (EU) 2017/776, kterým se pro účely přizpůsobení vědeckotechnickému pokroku mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí. *EUR-Lex* [online]. Document 02008R1272-20170601. 2017 [cit. 2018-03-03]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:02008R1272-20170601&qid=1520086447769>
- [65] DAPSON, RW, et al. Certification procedures for sirius red F3B (CI 35780, Direct red 80). *Biotechnic*. 2011, 86(3), 133-139. DOI: 10.3109/10520295.2011.570277. ISSN 1052-0295.
- [66] "EDGAR181", Edgar. Sirius Red F3B. In: *Wikimedia Commons* [online]. 2018 [cit. 2018-03-22]. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sirius\\_Red\\_F\\_3B.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sirius_Red_F_3B.svg)
- [67] ŠTEINER, Ivo. The prevalence of isolated atrial amyloid. *The Journal of Pathology*. 1987, 153(4), 395-398. DOI: 10.1002/path.1711530413. ISSN 0022-3417.
- [68] KHURANA, Ritu, et al. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*. 2005, 151(3), 229-238. DOI: 10.1016/j.jsb.2005.06.006. ISSN 10478477.
- [69] "EDGAR181", Edgar. Thioflavin T. In: *Wikimedia Commons* [online]. 2007 [cit. 2018-03-22]. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thioflavin\\_T.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thioflavin_T.png)
- [70] BIANCALANA, Matthew a Shohei KOIDE. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2010, 1804(7), 1405-1412. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.04.001. ISSN 15709639.
- [71] SCHALLER, Johann. Human blood plasma proteins: structure and function. Hoboken, NJ: John Wiley, 2008, 526 p. ISBN 978-047-0016-749.
- GREENWALD, Jason a Roland RIEK. Biology of Amyloid: Structure, Function, and Regulation. *Structure*. 2010, 18(10), 1244-1260. DOI: 10.1016/j.str.2010.08.009.
- PICKEN, Maria M. New insights into systemic amyloidosis: the importance of diagnosis of specific type. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2007, 16(3), 196-203. DOI: 10.1097/MNH.0b013e3280bdc0db. ISSN 1062-4821.
- WESTERMARK, Gunilla T., et al. Staining methods for identification of amyloid in tissue. *Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates*. Elsevier, 1999, (309), 3-25. *Methods in Enzymology*. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)09003-5. ISBN 9780121822101.

## 12 SEZNAM ZKRATEK

---

Tabulka 20 Seznam použitých zkratk.

Zkratka	Význam
AD	Amyloidová depozita
AO	Amyloidové oligomery
AP	Amyloidový protein
DP	Diplomová práce
GIT	Gastrointestinální trakt
IF	Imunofluorescence
IH	Imunohistochemie
KČ	Kongo červeň
MS	Hmotnostní spektrometrie
SA	Systemová amyloidóza
SAA	Sérový amyloid A
SAP	Sérový amyloidový protein

## 13 APPENDIX I – SAA, SAP

---

### SAA

Sérový amyloid A (Serum amyloid A, SAA) je rodina apolipoproteinů asociovaných s HDL frakcí. [71] Pro SAA existují čtyři různé geny lokalizované na chromozomu 11. [18] SAA je primárně syntetizován v játrech v několika izoformách. Produkce je řízena prozánětlivými cytokiny. [9] [18] Biologický poločas v krvi je přibližně 1 h. [71] Izoformy SAA1 a SAA2 jsou jedny z hlavních reaktantů akutní fáze, přičemž jejich koncentrace v krvi může během 24 h stoupnout až tisícinásobně. [18] [71] SAA je proteinovým prekurzorem pro amyloidový protein A (AA amyloid). [9] [71]

Přesná funkce SAA není zcela známa, ale předpokládá se, že působí jako chemotaxin a že hraje úlohu při metabolismu lipidů. Tuto teorii podporuje i fakt, že depozita AA amyloidu jsou nejprve lokalizována v orgánech, podílejících se na metabolismu lipidů a cholesterolu (játra, ledviny a slezina). [9]

Normální SAA je syntetizován jako protein o délce 104 aminokyselin a posléze je kompletně degradován monocyto-makrofágovým systémem. U pacientů s AA amyloidózou dochází k poruše degradačního procesu a z SAA proteinu je na jeho C-terminálním konci pouze odštěpena malá část (amyloidový protein v depozitech má délku 66-76 aminokyselin), umožňující zbytku molekuly nabýt charakteristickou konformaci  $\beta$ -skládaného listu. Tyto fragmenty následně polymerizují a po vazbě s dalšími komponentami vytváří extracelulární AA amyloidová depozita. [9]

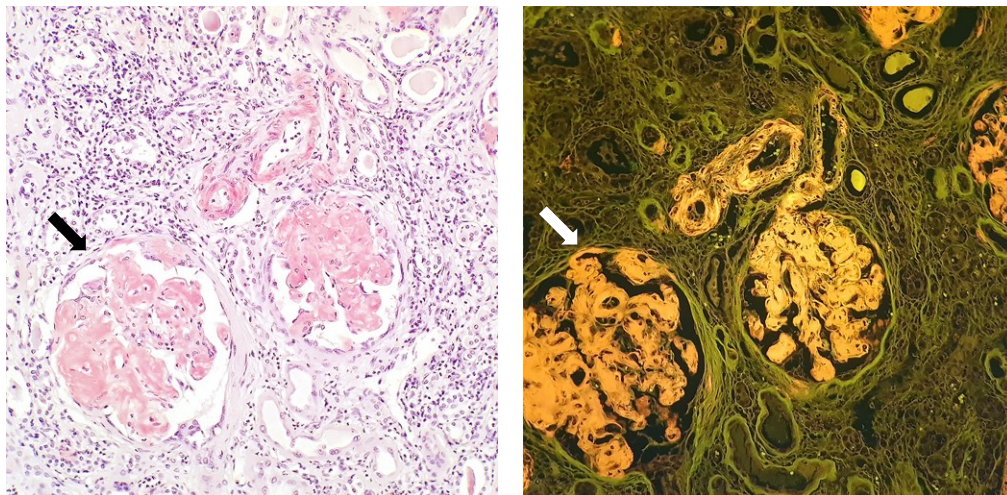
### SAP

Sérový amyloidový protein (Serum amyloid P-component, SAP) je reaktant akutní fáze z rodiny petaxinů. Jeho syntéza probíhá výhradně v hepatocytech a v krvi koluje s biologickým poločasem 24 h. Jeho primární struktura vykazuje značnou podobnost s C-reaktivním proteinem. V krvi je přítomen v podobě na  $\text{Ca}^{2+}$  iontech závislého pentameru. Váže se na materiál buněčného jádra a zdá se, že hraje roli při fagocytóze apoptotického materiálu chromatinové povahy. [71] SAP je součástí všech druhů amyloidových depozit s vysokou vazebnou afinitou k amyloidovým fibrilám. [18] Zdá se, že SAP působí jako stabilizační faktor bránící amyloidová depozita před účinky některých proteáz a fagocytární aktivitu. [9] [18]

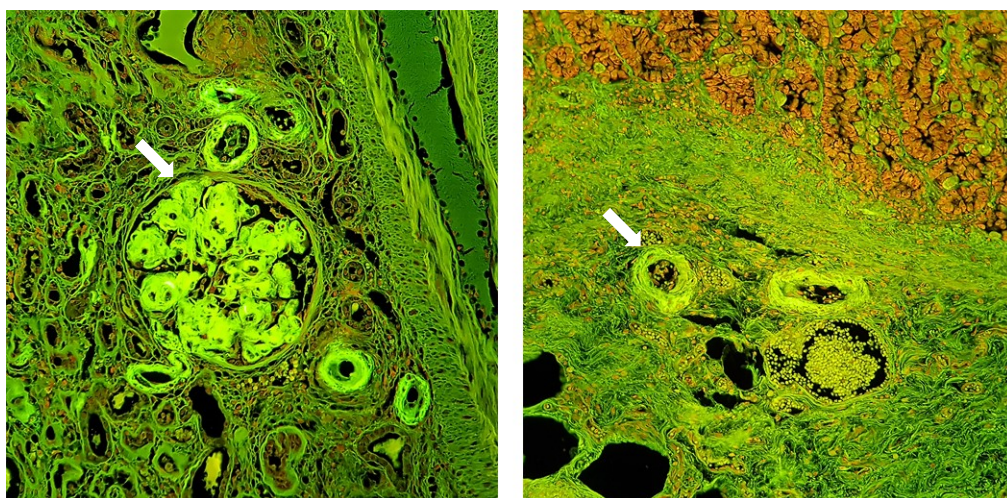
## 14 APPENDIX II – HISTOLOGICKÁ BARVENÍ NA AMYLOID

---

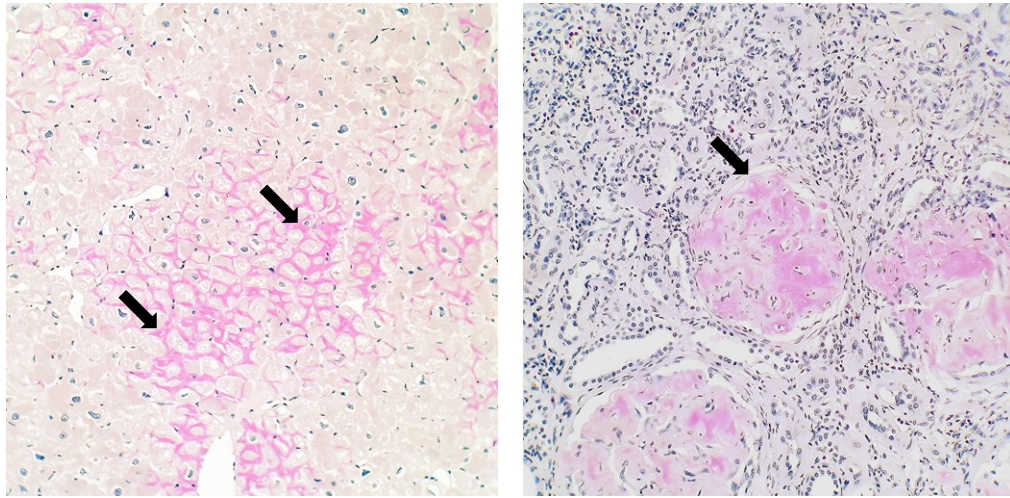
**Obrázek 12** KČ dle Stokesa. Vlevo klasická světelná mikroskopie, vpravo fluorescenční. Glomeruly a cévy s objemnými AD. 200x.



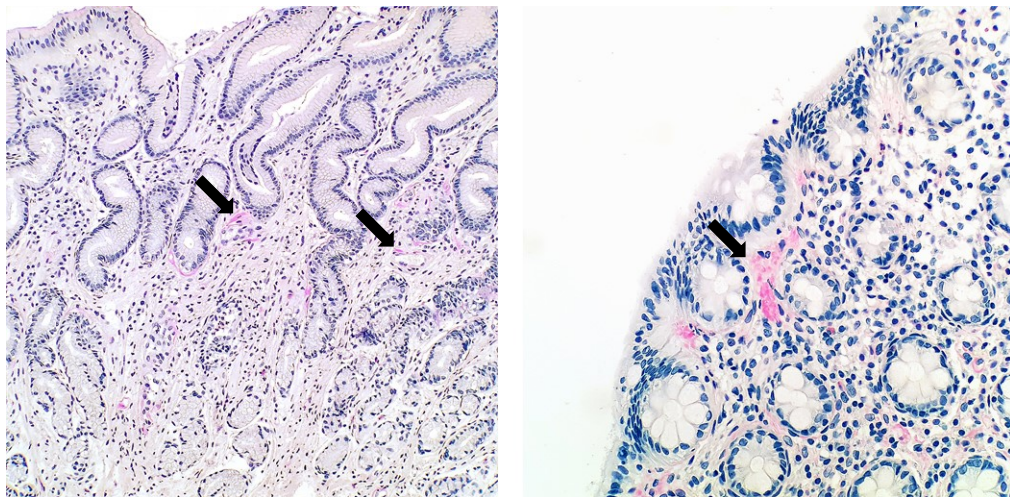
**Obrázek 13** Thioflavin T dle Burnse (fluorescenční mikroskopie). Vlevo AD v glomerulech a cévách kůry ledviny. Vpravo depozita v cévách tunica submucosa ve stěně žaludku. 200x.



**Obrázek 14** Sirius red dle Šteinera. Vlevo depozita v intersticiu myokardu. 400x. Vpravo objemná depozita v glomerulech a cévách kůry ledviny. 200x.



**Obrázek 15** Sirius red dle Šteinera. Vlevo drobná depozita v lamina propria mucosae ve sliznici tlustého střeva. 200x. Vpravo drobná depozita v lamina propria. 400x.



**Obrázek 16** KČ dle Stokesese. Vpravo AD v cévách tunica submucosa. Tlusté střevo. 100x. Vpravo AD v cévách tunica submucosa. Tenké střevo. 400x.

