

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Typizace systémové amyloidózy pomocí hmotnostní
spektrometrie**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Lucie Broskevičová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: Mgr. Dušan Holub

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Dušana Holuba za použití citované literatury.

V Olomouci

Podpis

Chtěla bych poděkovat Mgr. Dušanu Holubovi za odborné vedení diplomové práce. Děkuji mu za pomoc v laboratoři a při vypracování této práce. Především děkuji za jeho čas, trpělivost a cenné rady. Dále děkuji Mgr. Janě Václavkové, Mgr. Tomáši Oždianovi a Renatě Buriánové za rady a pomoc během mé práce v laboratoři. Děkuji také mé rodině, příteli a všem blízkým za podporu během celého studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Lucie Broskevičová
Název práce	Typizace systémové amyloidózy pomocí hmotnostní spektrometrie
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	Mgr. Dušan Holub
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	<p>V této diplomové práci jsou uvedeny základní informace o amyloidózách a jejich klasifikaci. Dále byly popsány čtyři nejčastěji se vyskytující amyloidózy a byly shrnuty současné diagnostické přístupy pro typizaci amyloidóz. Experimentální část práce je zaměřena na typizaci amyloidózy z parafinovaných vzorků tkáně pomocí laserového mikrodisektoru ve spojení s hmotnostní spektrometrií a také ze vzorků tukové tkáně pomocí hmotnostní spektrometrie.</p>
Klíčová slova	amyloid, amyloidóza, amyloidní depozita, imunohistochemie, hmotnostní spektrometrie, laserová mikrodisekce
Počet stran	69
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	B.Sc. Lucie Broskevičová
Title	Typing of systemic amyloidosis by mass spectrometry-based proteomics
Type of thesis	Master
Department	Institute of molecular and translational medicine
Supervisor	M.Sc. Dušan Holub
The year of presentation	2016
Abstract	<p>In the theoretical part of this diploma thesis are provided basic information about amyloidosis and classification of amyloidosis. It also describes the four most common amyloidosis and summarizes current diagnostic approaches for typing amyloidosis. The experimental part of this thesis is focused on amyloid subtyping from paraffin-embedded tissue samples by laser microdissection and mass spectrometry and from fat tissue samples by mass spectrometry.</p>
Keywords	amyloid, amyloidosis, amyloid deposits, immunohistochemistry, mass spectrometry, laser microdissection
Number of pages	69
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	9
2.1	AMYLOIDÓZA	9
2.1.1	Charakteristika	9
2.1.2	Historie.....	9
2.1.3	Klasifikace amyloidóz	10
2.1.3.1	Nomenklatura amyloidóz	10
2.1.4	Lokalizovaná amyloidóza	12
2.1.5	Systémová amyloidóza	12
2.1.5.1	AL amyloidóza	13
2.1.5.2	AA amyloidóza.....	13
2.1.5.3	ATTR amyloidóza.....	14
2.1.6	Incidence	15
2.1.7	Patogeneze	16
2.1.7.1	Amyloidní fibrily.....	17
2.1.7.2	Amyloidní depozitum.....	18
2.1.8	Symptomy	19
2.1.9	Léčba.....	20
2.2	DIAGNOSTIKA AMYLOIDÓZ	21
2.2.1	Histologický průkaz amyloidních depozit	21
2.2.1.1	Barvení kongo červení.....	22
2.2.2	Typizace amyloidu.....	23
2.2.2.1	Imunohistochemie	24
2.2.2.2	Proteomická analýza.....	25
3	CÍL PRÁCE.....	27
4	MATERIÁL	28
4.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL	28
4.2	CHEMIKÁLIE	31
4.3	ROZTOKY	31
4.4	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	32

4.5	SOFTWARE	32
5	METODIKA.....	33
5.1	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	33
5.2	ZPRACOVÁNÍ VZORKU PARAFINOVANÉ TKÁNĚ.....	34
5.2.1	Laserová mikrodisekce	34
5.2.2	Postup zpracování mikrodisekované tkáně.....	35
5.3	ZPRACOVÁNÍ VZORKU TUKOVÉ TKÁNĚ	36
5.3.1	Odběr vzorku	36
5.3.2	Homogenizace a další zpracování tukové tkáně	36
5.4	PURIFIKACE PEPTIDŮ POMOCÍ STAGETIP.....	38
5.5	LC-MS ANALÝZA	39
5.6	ZPRACOVÁNÍ A VYHODNOCENÍ LC-MS DAT	40
5.6.1	Interpretace výsledků	41
5.6.2	P-Skóre a D-Skóre	42
6	VÝSLEDKY	43
6.1	TYPIZACE SYSTÉMOVÉ AMYLOIDÓZY Z FFPE VZORKŮ	43
6.2	TYPIZACE VZORKŮ TUKOVÉ TKÁNĚ	52
7	DISKUZE	55
8	ZÁVĚR	58
9	LITERATURA.....	59
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	67

1 ÚVOD

Amyloidóza je vzácná skupina onemocnění, u kterých dochází k ukládání špatně složených amyloidních proteinů (tzv. amyloidů) ve tkáních a orgánech. Akumulace amyloidů postupem času narušuje tkáňové mikroprostředí, což může vést až k selhání postiženého orgánu. K dnešnímu dni je známo několik amyloidních proteinů odpovědných za vznik amyloidózy. Léčba je dostupná pro většinu amyloidóz, je však pro jednotlivé typy specifická. Pro zvolení odpovídající léčby je tedy zásadní správná identifikace amyloidního proteinu, tzv. typizace amyloidu.

Diagnostika amyloidóz zahrnuje histologický průkaz amyloidu ve tkáni pomocí barvení kongo červení. Následná typizace amyloidu se v klinické praxi provádí imunohistochemickou metodou, avšak tento přístup má určitá omezení, především v citlivosti a specifitě protilátek. Další možný přístup v typizaci amyloidu je proteomická analýza, která umožňuje přímo identifikovat amyloidní protein z biologického vzorku. Typizace amyloidu je založena na stanovení nejvíce abundantního amyloidního proteinu.

V rámci experimentální části mé práce byly zavedeny proteomické metody pro typizaci amyloidu z parafinovaných vzorků tkání pomocí laserové mikrodisekce ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LMD-LC-MS/MS) a také ze vzorků tukové tkáně pomocí hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS).

2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

2.1 Amyloidóza

2.1.1 Charakteristika

Amyloidóza je označení pro vzácnou skupinu onemocnění, kterou charakterizuje ukládání abnormálně složených proteinů (tzv. amyloidů) v různých tkáních a orgánech. Amyloidní depozita narušují tkáňové mikroprostředí, což může časem vést až k selhání postiženého orgánu (Theis *et al.*, 2013). Dle rozsahu postižení se amyloidózy dělí na systémové a lokalizované. Nejčastěji postižené orgány jsou játra, ledviny, nervový systém a srdce (Brambilla *et al.*, 2013).

Za vznikem amyloidu stojí prekursorový amyloidní protein, který podstoupí fibrilizaci na základě změny v jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. V současné době je známo 31 prekursorových proteinů odpovědných za vznik amyloidózy (Sipe *et al.*, 2014). Mezi nejčastěji se vyskytující amyloidózy se řadí AL κ nebo AL λ amyloidóza, AA amyloidóza a ATTR amyloidóza (Hazenberga, 2013)

2.1.2 Historie

Termín „amyloid“ jako první ustanovil v roce 1854 německý vědec Rudolf Virchow, kdy takto označil abnormální tkáň vykazující pozitivní zbarvení při reakci s jódem, stejné reakci jako při reakci s celulózą a škrobem. Z tohoto důvodu bylo složení amyloidu přisuzováno celulóze či škrobu (Sipe *et Cohen*, 2000).

Porozumění struktury amyloidu rostlo s vývojem zobrazovacích technik jako například světelná mikroskopie. Velký pokrok v identifikaci amyloidu znamenal objev možnosti barvení pomocí kongo červeně v roce 1922 (Bennhold, 1922). Zavedení *in vitro* přístupů a vylepšení purifikace vedlo k izolaci amyloidních fibril z tkáně, což umožnilo studovat jejich strukturu na molekulární úrovni. Provedení X-ray difrakce v roce 1968 prokázalo přítomnost formy β -skládaného listu (Eanes *et Glenner*, 1968). Později od roku 1980 došlo k rozvoji metod k průkazu typu amyloidu pomocí imunodetekce a byly připraveny protilátky pro většinu známých amyloidóz, což pomohlo v diagnostice tohoto onemocnění (Linke, 2012). Až v posledních letech se zavedl průkaz typu amyloidu pomocí proteomické analýzy (Nizhnikov *et al.*, 2015).

2.1.3 Klasifikace amyloidóz

V průběhu let existovaly různé klasifikace např. na základě orgánové distribuce amyloidových depozit a klinických nálezů. Původní klasifikace rozděluje amyloidózy do několika skupin: primární, sekundární, dědičné a amyloidózy spojené s mnohočetným myelomem (Sipe *et al.*, 2000). U primární amyloidózy (nyní AL amyloidóza) nebyla zaznamenána žádná příčina vzniku onemocnění. Sekundární amyloidóza (nyní AA amyloidóza) bylo označení pro onemocnění v reakci na jiné primární onemocnění, obvykle chronický zánět (Picken *et al.*, 2007). Toto rozdělení je dnes již zastaralé a nepoužívá se (Sipe *et al.*, 2014).

Názvosloví a klasifikace amyloidóz je v dnešní době založena na chemické identifikaci amyloidního proteinu. Tento protein je definován takto: v těle musí dojít k tvorbě amyloidních depozit s afinitou ke kongo červeni a musí vykazovat typický zelený dvojlom v polarizovaném světle. Pokud je možnost, musí být také potvrzena aminokyselinová sekvence (Sipe *et al.*, 2014).

Pro zjednodušení se amyloidózy dělí dle původu onemocnění na získané a dědičné (Sipe *et al.*, 2014). Dle rozsahu postižení na lokalizované a systémové amyloidózy. V případě lokalizované amyloidózy dochází k ukládání amyloidního proteinu v jednom orgánu, v případě systémové amyloidózy ve více orgánech (Picken, 2010).

2.1.3.1 Nomenklatura amyloidóz

Názvosloví amyloidních proteinů a klinickou klasifikaci amyloidóz formuluje výbor mezinárodní společnosti pro amyloidózu (International Society of Amyloidosis, ISA). K dnešnímu dni je známo 31 extracelulárních fibrilových proteinů u člověka (Tab. 1), z nichž devět bylo zjištěno také u zvířat (Sipe *et al.*, 2014).

Amyloidní protein se označuje jako protein A s následujícím indexem, který je zkrácenou formou amyloidního prekurzorového proteinu. Například amyloidní protein odvozený od lehkých řetězců imunoglobulinu je AL (A + imunoglobulinový lehký řetězec) a nemoc je označována jako AL amyloidóza. Mutovaná varianta amyloidního proteinu se pojmenovává podle substituce nebo delece na proteinu, např. ATTRV30M nebo ALysI56T. Je doporučeno použít třípísmenkový kód pro aminokyseliny, pokud bylo provedeno sekvenování DNA. Mutace by se měla umístit do závorek, tedy TTRV30M varianta by měla být zapsána jako TTR c.(Val50Met) (Sipe *et al.*, 2014).

Tab. 1: Seznam amyloidních proteinů dle současné nomenklatury (Sipe *et al.*, 2014).

Amyloidní protein	Prekurzorový protein	Systémová a/nebo lokalizovaná	Získaná nebo dědičná	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	Transtyretin, divoký typ	S	Z	srdce hlavně u mužů, ligamenta
	Transthyretin, varianty	S	D	PNS, ANS, srdce, oko
A β 2M	β ₂ -mikroglobulin, divoký typ	L	Z	pohybový systém
	β ₂ -mikroglobulin, varianty	S	D	ANS
AApoAI	Apolipoprotein AI, varianty	S	D	srdce, játra, ledviny, PNS, varlat, hrtan, kůže
AApoAII	Apolipoprotein AII, varianty	S	D	ledviny
AApoAIV	Apolipoprotein AIV, divoký typ	S	Z	dřeň ledvin
AGel	Gelsolin, varianty	S	D	PNS, rohovka
ALys	Lysozym, varianty	S	D	ledviny
ALECT2	Leukocytární chemotaktický faktor 2	S	Z	především ledviny
AFib	Fibrinogen α -řetězec, varianty	S	D	především ledviny
ACys	Cystatin C, varianty	S	D	PNS, kůže
ABri	ABri proteinový prekurzor, varianty	S	D	CNS
ADan	ADan proteinový prekurzor, varianty	L	D	CNS
A β	A β proteinový prekurzor, divoký typ	L	Z	CNS
	A β proteinový prekurzor, varianty	L	D	CNS
APrP	Prionový protein, divoký typ	L	Z	CJD, Fatální insomnie
	Prionový protein, varianty	L	D	CJD, GSS syndrom, Fatální insomnie
ACal	(Pro) kalcitonin	L	Z	C buňky u nádoru štítné žlázy
AIAPP	Ostrůvkový amyloidový polypeptid (amylin)	L	Z	Langerhansovy ostrůvky slinivky břišní, Inzulinom
AANF	Atriální natriuretický faktor	L	Z	srdeční síň
APro	Prolaktin	L	Z	Prolaktinom, stárnutí hypofýzy
AIns	Inzulín	L	Z	iatrogenně v místě vpichu inzulínu
ASPC	Plicní surfaktant	L	Z	pľíce
AGal7	Galektin 7	L	Z	kůže
ACor	Corneodesmosin	L	Z	zrohovatělý epitel, vlasové folikuly
AMed	Lactadherin	L	Z	senilní aorta, Tunica media
AKer	Kerato-epitelin	L	Z	rohovka
ALac	Laktoferin	L	Z	rohovka
AOAAP	Odontogenní protein asociovaný s ameloblastomem	L	Z	odontogenní nádory
ASem1	Semenogelin 1	L	Z	semenný váček
AEnf	Enfuvirtid	L	Z	iatrogenní poškození

ANS – autonomní nervová soustava; CJD – Creutzfeldt-Jakobova choroba; CNS – centrální nervová soustava; D – dědičná, GSS – Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrom; L – lokalizovaná; PNS – periferní nervová soustava; S – systémová; Z – získaná

2.1.4 Lokalizovaná amyloidóza

Lokalizovaná amyloidóza je charakterizována tím, že se amyloidní depozita tvoří jen v jednom orgánu. Předpokládá se, že již ve věku okolo 60 let má amyloidní depozita v jednom nebo více orgánech každý člověk. Lokalizované amyloidózy se vyskytují ve spojení se specifickými chorobami a můžou se rovněž podílet na jejich patogenezi (Westermarck, 2012a).

Vznik lokalizované amyloidózy může být způsoben nadměrnou produkcí prekurzorového proteinu. V tomto případě je většina klinicky významných lokalizovaných amyloidóz typu AL a dochází k místní produkci amyloidogenního lehkého řetězce imunoglobulinu (Pinney *et* Hawkins, 2012). K ukládání amyloidu pak dochází v místě produkce prekurzorového proteinu, nejčastěji v dýchacím traktu, urogenitálním traktu, kůži, hrtanu, prsu nebo orbitě (Hazenberg, 2013).

Lokalizovaná amyloidní depozita lze také nalézt kolem míst vpichu inzulínu, a to při opakovaném podávání v průběhu několika let. Tato forma dostala název iatrogenní AIns amyloidóza, která se detekuje pomocí protilátek proti inzulínu (Shikama *et al.*, 2010). Orgánově specifická amyloidóza se vyskytuje u Alzheimerovy choroby (ukládání beta amyloidu v mozku) a při diabetes mellitus 2. typu (ukládání amylinu v Langerhansových ostrůvcích). Role ukládání amyloidu v patogenezi těchto onemocnění zatím není známa (Falk *et al.*, 1997; Hazenberg, 2013).

2.1.5 Systémová amyloidóza

Systémová amyloidóza je charakterizována tím, že se amyloidní depozita tvoří ve více orgánech. Prekurzorový protein cirkuluje v krevním oběhu a má potenciální přístup k téměř všem orgánům nebo tkáním v těle. Jsou však specifické amyloidní proteiny, které se ukládají převážně v určitých orgánech, například Fibrinogen- α a leukocytární chemotaktický faktor 2 v ledvinách, β 2-mikroglobuliny v kloubech a transthyretin (ATTRV30M varianta) v periferních nervech (Merlini *et* Bellotti, 2003). Důvody preference některých orgánů nejsou příliš známy. Vliv na pozice ukládání amyloidu by mohla mít samotná koncentrace prekurzorového proteinu, pH, přítomnost proteolytických enzymů (Merlini *et* Bellotti, 2003), dále interakce prekurzorového proteinu s kolagenem (Harris *et al.*, 2000) nebo s glykosaminoglykany (Stevens *et* Kisilevsky, 2000). Mezi nejčastější typy systémové amyloidózy patří AL amyloidóza, AA amyloidóza a ATTR amyloidóza (Hazenberg, 2013).

2.1.5.1 AL amyloidóza

AL amyloidóza je nejčastější typ systémové amyloidózy ve vyspělých zemích s odhadovaným výskytem 9 případů na milion obyvatel za rok. Ve většině studií je mezi pacienty zaznamenán o něco vyšší podíl mužů (Hazenberg, 2013). Průměrný věk pacientů je 65 let, 10 % pacientů je mladších 50 let (Desport *et al.*, 2012). Prognóza přežití u neléčených pacientů bývá okolo 6-15 měsíců (Kyle *et Gertz*, 1995).

Toto onemocnění je způsobeno dyskrazií plazmatických buněk v kostní dřeni. Plazmatické buňky produkují abnormální proteiny a dochází k extracelulární depozici. Prekurzorový protein je lehký řetězec imunoglobulinu, lambda nebo kappa (Desport *et al.*, 2012; Hazenberg, 2013). AL amyloidóza se vyskytuje při mnohočetném myelomu (přibližně 15% pacientů má mnohočetný myelom), zřídka také při Non-Hodgkinovu lymfomu nebo Waldenströmově makroglobulinemii (Pinney *et Hawkins*, 2012).

AL amyloidóza se projevuje únavou až u 2/3 pacientů a úbytkem váhy ve více než polovině případů. Samotný úbytek váhy může přejít až do anorexie či dysgeuzie, tedy poruchy vnímání chuti. Podvýživa (nízká hodnota mass index) a nízká hladina prealbuminu v séru jsou významnými prognostickými faktory u AL amyloidózy (Caccialanza *et al.*, 2006).

Mezi nejčastěji postižené orgány patří ledviny. Proteinurie je přítomná u 73 % pacientů a nefrotický syndrom u 30 % pacientů (Leung *et al.*, 2012). Mezi další klinické projevy patří kardiomyopatie, nefrotický syndrom, renální selhání, hepatomegalie (zvětšení jater), splenomegalie (zvětšení sleziny), hypotenze a další (Hazenberg, 2013).

2.1.5.2 AA amyloidóza

Nejběžnějším typem amyloidózy v rozvojových zemích je AA amyloidóza, dříve také nazývána jako sekundární nebo reaktivní amyloidóza. Incidence AA amyloidózy se odhaduje na 1-2 případy na milion obyvatel za rok. U pacientů s diagnostikovaným typem AA je zaznamenán větší podíl žen, především kvůli revmatoidní artritidě, která postihuje častěji ženy. V rozvojových zemích je míra výskytu AA amyloidózy vyšší z důvodu většího rozšíření infekčních chorob (Hazenberg, 2013). Průměrný věk diagnostikovaných pacientů je 45-55, medián přežití je odhadován na 4 roky (Hemminki *et al.*, 2012; de Asúa *et al.*, 2014).

AA amyloidóza je způsobena dlouhodobým zánětlivým stavem. Vyskytuje se při revmatoidní artritidě (Mutru *et al.*, 1985), chronické infekci (tuberkulóza, osteomyelitida, lepra) nebo při dědičném zánětlivém onemocnění jako je familiární středomořská horečka (Ben-Zvi *et Livneh*, 201; Pinney *et Hawkins*, 2012; Westermarck *et al.*, 2015).

Prekurzorový amyloidní protein je sérový amyloid A (SAA), což je reaktant akutní fáze. Je syntetizován v hepatocytech na základě prozánětlivých cytokinů (IL-6). Fyziologická hladina SAA v plazmě je 3 mg/l, tento stav se může v průběhu akutní fáze zvýšit více než tisíckrát. Dlouhotrvající zvýšení hladiny SAA je předpokladem k rozvoji AA amyloidózy (Pinney *et Hawkins*, 2012, Westermarck *et al.*, 2015).

Tento typ amyloidózy postihuje především ledviny. U více než 95% se vyskytuje proteinurie, dále nefrotický syndrom nebo selhání ledvin. Postižení srdce nebo nervové soustavy je velmi vzácné. Dalšími klinickými projevy onemocnění jsou neuropatie, hepatomegalie (zvětšení jater), splenomegalie (zvětšení sleziny) nebo postižení střev (Lachmann *et al.*, 2007; Pinney *et Hawkins*, 2012).

2.1.5.3 ATTR amyloidóza

ATTR amyloidóza je třetí nejrozšířenější typ amyloidózy na světě. Dědičná forma této amyloidózy je způsobena bodovou mutací prekurzorového proteinu transthyretinu (TTR). Jedná se nejčastěji o autosomálně dominantní dědičné onemocnění. Bylo popsáno kolem stovky mutací TTR. Nejčastější popisovaná TTR mutace je substituce methioninu (M) za valin (V) v pozici 30 (TTRV30M) (Connors *et al.*, 2003; Pinney *et Hawkins*, 2012)

Ukládáním TTR je nejčastěji postižen periferní a autonomní nervový systém, srdce, sklivec, střeva a CNS. Mezi hlavní klinické projevy onemocnění patří periferní a autonomní neuropatie, známá jako familiární amyloidní polyneuropatie (FAP), ale také kardiomyopatie a selhání ledvin. FAP je závažné progresivní onemocnění, kdy je po prvních projevech symptomů odhadována průměrná délka života na 10 let. U jedinců s časným nástupem onemocnění dochází k rychlému průběhu nemoci, zatímco u jedinců starších 55 let je průběh pomalejší a přežívají až 20 let (Benson, 2003; Pinney *et Hawkins*, 2012; Hazenberg, 2013).

Existuje také nedědičná forma ATTR amyloidózy, takzvaná získaná senilní amyloidóza (SSA). Vyskytuje se téměř výhradně u mužů starších 65 let. Pitevní studie naznačují, že jsou amyloidní depozita v tkáni srdce přítomna až u 25% všech osmdesátníků (Dungu *et al.*, 2012).

Při tomto onemocnění působí nemutovaný (wild-type) TTR jako amyloidní prekurzor (Dungu *et al.*, 2012). Důvody jeho fibrilogeneze a následného ukládání ve formě amyloidu není objasněno. Studie naznačují, že post-translační modifikace na TTR a nebo jeho chaperonů podílejících se na správném sbalení/složení proteinu, mohou přispívat k tvorbě amyloidních fibril (Buxbaum *et al.*, 2012).

K ukládání amyloidů pak dochází především v srdci, dále také v plicích, zažívacím traktu nebo v játrech (Dubrey *et al.*, 2011). Onemocnění se vyznačuje pomalu probíhající kardiomyopatií a srdečním selháním, často ve spojení se syndromem karpálního tunelu (Dungu *et al.*, 2012).

2.1.6 Incidence

Obsáhlejší informace o incidenci onemocnění nejsou k dispozici dokonce ani v rozvinutých zemích. V rámci České republiky je amyloidóza poddiagnostikovaná.

Největší studie proběhla v Olmsted County ve státě Minnesota, kde s ohledem na věk a pohlaví prokázali s 95% spolehlivostí incidenci 1,5 - 8,12 případů na milion obyvatel za rok (Kyle *et al.*, 1992).

V rámci studie ve Švédsku probíhající v letech 2001 a 2008 bylo identifikováno celkem 949 pacientů s amyloidózou, což odpovídá incidenci 8,29 případů na milion obyvatel ročně. Odhadovaná incidence AL amyloidózy byla 3,2 případy na milion obyvatel a AA amyloidózy 2 případy na milion obyvatel za rok. Většina pacientů měla nad 65 let (Hemminki *et al.*, 2012).

Studie ve Velké Británii na základě informace z úmrtních listů odhaduje úmrtí jako následek amyloidózy na 0,58 případů na 1000 úmrtí, z toho 80 % zaujímá AL amyloidóza. Incidence systémové amyloidózy se dle studie každoročně zvyšuje, v roce 2008 byl přibližně 0,8 na 100 000 obyvatel. Tento zdánlivý nárůst může odrážet skutečný nárůst incidence onemocnění, ale mohl by stejně dobře být způsoben lepším povědomím o nemoci samotné nebo lepšími diagnostickými metodami (Pinney *et al.*, 2013).

2.1.7 Patogeneze

Za vznik amyloidózy je v principu zodpovědný prekurzorový protein nebo peptid, který ztratí nebo nenabyde fyziologické schopnosti funkčního složení. Tento abnormální špatně složený protein podstoupí následně fibrilizaci a dochází k extracelulární akumulaci ve formě amyloidních depozit (Chiti *et* Dobson, 2006).

K amyloidogenezi, procesu vzniku amyloidu, může dojít prostřednictvím několika různých mechanismů. Například genetická mutace prekurzorového proteinu může mít za následek tvorbu amyloidního proteinu. Do této skupiny se řadí především dědičné formy amyloidóz. Amyloid se může také vytvořit z divokého typu proteinu. Příkladem je senilní amyloidóza z divokého typu transthyretinu. AA amyloidóza vzniká v důsledku zvýšené koncentrace sérového amyloidního A proteinu, ke které může docházet při chronické infekční chorobě, zánětlivých stavech, syndromu periodické horečky či u Castlemanovy choroby (Westermarck *et al.*, 2015). A β 2M amyloidóza vzniká následkem snížené eliminace β 2-mikroglobulinu u pacientů s onemocněním ledvin (Leung *et al.*, 2012).

Jinou možností vzniku amyloidu je proteolytická přestavba prekurzorového proteinu. Ve spojení s amyloidovým prekurzorovým proteinem (APP) byly identifikovány tři enzymy, α - β -, γ -sekretáza. Tyto enzymy jsou zodpovědné za produkci amyloidu beta (A β) štěpením APP a následnou tvorbu amyloidních depozit v mozku u Alzheimerovy choroby (Strooper *et al.*, 2010). V případě AL nebo AH amyloidózy je amyloidogeneze způsobena kombinací různých mechanismů jako akumulace, mutace a proteolytická přestavba (Leung *et al.*, 2012).

Priony jakožto infekční agens bez obsahu nukleové kyseliny se mohou také podílet na tvorbě amyloidu. Mechanismus je založen na konformační přeměně helikální isoformy prionového proteinu (PrP^c) v nerozpustnou infekční izoformu (PrP^{Sc}), která je bohatá na strukturu β -skládaného listu. Tato forma má za následek tvorbu amyloidních plaků. Onemocnění způsobené priony jsou tzv. přenosné spongiformní encefalopatie (TSEs), mezi něž patří například Creutzfeldt-Jakobovu chorobu (Aguzzi, 2008; Stöhr *et al.*, 2008). U některých typů amyloidóz zůstává mechanismus patogeneze stále neurčen, jako například u ALECT2. (Leung *et al.*, 2012).

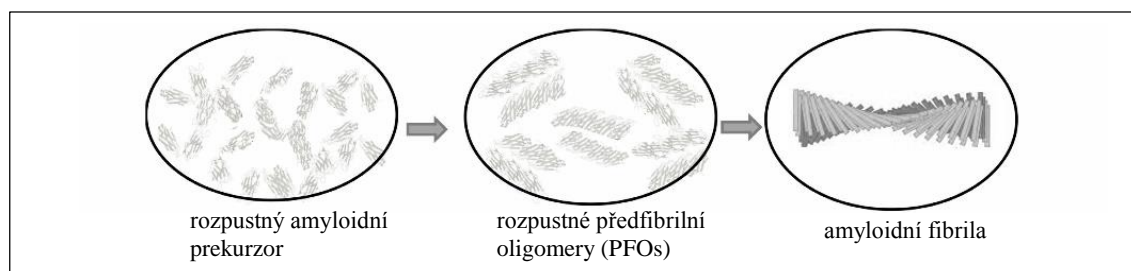
Samotný proces, jakým amyloidní depozita poškozují orgány, není příliš dobře pochopen. Pravděpodobně extracelulární depozice amyloidních fibril vede k narušení tkáňového mikroprostředí, což má za následek postupnou ztrátu funkce postiženého orgánu (Hazenberg, 2013). Další hypotéza naznačuje, že je poškození způsobeno toxickými účinky meziproductů rané fáze fibrilizace, konkrétně se jedná o nízkomolekulární rozpustné předfibrilní oligomery (PFOs) (Diociaiuti *et al.*, 2014).

2.1.7.1 Amyloidní fibrily

I přes značnou rozmanitost aminokyselinových sekvencí a terciárních struktur je známo, že morfologie a histochemické vlastnosti všech amyloidních fibril jsou až pozoruhodně podobné. Proces tvorby amyloidních fibril zahrnuje opakované skládání nativní struktury prekurzorového proteinu, což vede k vytvoření meziproductů s vysokým podílem β -skládaného listu, které se akumulují v podobě protofilament a nakonec vedou k tvorbě fibril (Pepys, 2001).

Zásadní pro tvorbu amyloidu je tedy zvýšená frekvence struktur β -skládaného listu vedoucí k tvorbě vodíkových vazeb mezi monomery špatně složeného proteinu a vytvoření fibril, které jsou nerozpustné a odolné vůči degradaci (Westermarck *et al.*, 2015). Tyto pevné a nerozvětvené fibrily mají v průměru asi 10 nm a jsou tvořeny strukturou β -skládaného listu, který se obvykle skládá z peptidů uspořádaných v antiparalelní konfiguraci (Westermarck *et al.*, 2015).

Obecně platí, že nativní protein podstoupí proces amyloidogeneze v důsledku destabilizace jeho původní konformace. Amyloidní proteiny nemají žádnou podobnost v jejich primární, sekundární nebo terciární struktuře, nicméně proces tvorby abnormálně složených proteinů je stejný. Zaujímá několik kroků, které zahrnují tvorbu nízkomolekulárních oligomerů, obecně se nazývají jako předfibrilní oligomery (PFOs). Následuje tvorba prstencových nebo lineárních protofilament a spojením čtyř až šesti protofilament se nakonec vytvoří nerozpustná zralá fibrila (Obr. 1) (Diociaiuti *et al.*, 2014).



Obr. 1: Proces tvorby amyloidních fibril (převzato a upraveno dle Lavatelli *et al.*, 2016).

In vitro studie navíc ukázaly, že tvorba amyloidních fibril probíhá prostřednictvím "jaderného růstu", který připomíná mechanismus krystalizace. Počáteční fází je rozpuštění monomerních proteinů (oligomerů) a jedná se o tzv. lag fázi. Po vytvoření kritického jádra začíná tvorba fibril, která pokračuje velmi rychlou kinetikou: každý amyloidní prekurzor se ve své konformaci, která je náchylná k agregaci, ihned zapojí do rostoucí fibrily (Diociaiuti *et al.*, 2014).

2.1.7.2 Amyloidní depozitum

Převážná část amyloidního depozita je tvořena z amyloidních fibril, složených ze specifického prekurzorového proteinu asociovaného s klinickým typem amyloidózy. V amyloidním depozitu se nalézají i další složky, především proteoglykany, glykosaminoglykany a sérový amyloidový P protein (Merlini *et Bellotti*, 2003).

Proteoglykany a glykosaminoglykany (např. heparansulfát) přispívají k tvorbě a stabilizaci amyloidních fibril a to prostřednictvím interakce se složkami extracelulární matrix jako jsou laminin, entaktin a kolagen IV (Merlini *et Bellotti*, 2003).

Další složkou všech depozit je sérový amyloidový P protein (SAP), což je glykoprotein patřící do rodiny pentraxinů. SAP se s velkou afinitou reverzibilně váže na všechny typy amyloidů a zvyšuje odolnost amyloidních fibril proti degradaci, jelikož je vysoce chráněn proti proteolýze (Tennent *et al.*, 1995; Merlini *et Bellotti*, 2003; Hazenberg, 2013). V klinické praxi se využívá radioaktivně značeného SAP pro scintigrafické zobrazování depozit (Hazenberg *et al.*, 2006).

Některá depozita navíc obsahují např. apolipoprotein E, různé inhibitory proteáz a složky komplementu (Pepys, 2001;). Součástí depozita bez ohledu na typ amyloidu mohou být také další proteiny jako klusterin, apolipoprotein A-IV a vitronektin. U systémové amyloidózy jsou tyto proteiny přítomny jak v tkáni, tak i v podkožním tuku. V tomto směru se mluví o tzv. „amyloid proteome signature“ a zkoumá se možné využití v diagnostice (Brambilla *et al.*, 2012; Vrana *et al.*, 2014; Lavatelli *et al.*, 2016).

2.1.8 Symptomy

Amyloidóza se může projevit celou řadou symptomů, především v závislosti na lokalizaci a velikosti amyloidních depozit. Počáteční příznaky bývají často nespecifické, jako například únava či úbytek na váze. Dále se objevují příznaky jako závratě, otékání kotníků, modřiny, průjem, necitlivost, dušnost či závratě (Dubrey *et al.*, 2011). S vývojem nemoci dochází k poškození funkce a postupnému selhávání zasažených orgánů (Mollee *et al.*, 2014). Amyloidózy jsou vzácné u mladých lidí, ale po dosažení věku 40-50 let se rapidně zvyšuje jejich prevalence (Westermarck *et al.*, 2015).

V případě lokalizované amyloidózy se amyloid ukládá především v kůži, dýchacích, močových a pohlavních cestách nebo v očích. Obecně se nejedná o letální stav. Konkrétně na kůži se to projevuje tvorbou amyloidních uzlíků (Leung *et al.*, 2012). Ukládání amyloidů může být také zaznamenáno kolem vpichu inzulínu u diabetiků, v oblastech poškození kůže či po úrazu (Mollee *et al.*, 2014).

Dalším symptomem mohou být tzv. "mývalí oči" (Obr. 2) v důsledku ukládání amyloidů ve stěněch kapilár, což vede k jejich křehkosti a zvýšené krvácivosti při menším úrazu jako je kýčání, kašel či tření očí. U přibližně 10 % případů se objevuje makroglosie neboli chorobně zvětšený jazyk (Obr. 3) (Pinney *et Hawkins*, 2012).



Obr. 2: Symptom "mývalí oči" u pacienta s diagnostikovanou AL amyloidózou (převzato z Pinney *et Hawkins*, 2012).



Obr. 3: Symptom makroglosie u pacienta s diagnostikovanou AL amyloidózou (převzato z Pinney *et Hawkins*, 2012).

Systemová amyloidóza se projevuje selháváním více orgánů. Při postižení ledvin dochází k proteinurii, nefrotickému syndromu a v konečné fázi až selhání funkce ledvin (Leung *et al.*, 2012). Postižení srdce se projevuje arytmií, hypotenzí, nízkým tlakem, periferními edémy nebo srdečním selháním (Dubrey *et al.*, 2011).

2.1.9 Léčba

V současné době je dostupná léčba pro většinu amyloidóz, je však typově specifická. Obvykle je léčba založena na zachování funkčnosti poškozených orgánů, dále v případě selhání orgánu na transplantaci a v neposlední řadě na snížení produkce prekurzorového proteinu, který je odpovědný za vznik onemocnění (Pepys, 2001).

Při AL amyloidóze, která je téměř většinou důsledkem plazmocelulární dyskrázie, se ukázala jako efektivní antimyelomová terapie. Léčba je tedy založená na podávání cytostatik nebo transplantaci kostní dřeně (Lachmann *et al.*, 2003; Palladini *et al.*, 2007).

U AA amyloidózy je léčba zaměřena na potlačení probíhající infekce nebo zánětlivého stavu (Lachmann *et al.*, 2007). Základem této léčby je snížení produkce sérového amyloidu A (SAA) pomocí kortikosteroidů nebo cytostatik. Dále léčba monoklonálními protilátkami proti cytokinům, zejména TNF a IL-6 (Okuda *et al.*, 2014).

Základem léčby amyloidózy u dědičných typů je transplantace orgánů za účelem odstranění místa zdroje mutovaného proteinu a nahrazení narušených orgánů. Nejběžnějším příkladem je transplantace jater u pacientů s ATTR amyloidózou, kde je onemocnění způsobeno mutací transthyretinu syntetizovaného v játrech (Leung *et al.*, 2012; Yamashita *et al.*, 2012).

Větší znalosti o vzniku a struktuře amyloidních fibril výrazně rozšířily možnosti potencionální léčby, které jsou ve vývoji nebo dokonce v klinických studiích. Jsou zaměřeny především na samotné fibrily, jejich stav před agregací a s nimi související molekuly jako například sérový amyloidový P protein (SAP) a heparan sulfát (HS) (Westermarck *et al.*, 2015).

SAP se s velkou afinitou reverzibilně váže na všechny typy amyloidních fibril a je tedy vždy součástí amyloidního depozita (Merlini *et Bellotti*, 2003). Z tohoto důvodu se SAP stal terapeutickým cílem pro léčebnou strategii. V klinických testech podané léčivo CPHPC účinně eliminovalo cirkulující SAP z plasmy, ale zároveň ponechalo určitou část SAP v amyloidových depozit jako cíl pro protilátku proti SAP (Richards *et al.*, 2015). Po opakovaném podávání CPHPC s odpovídajícími dávkami anti-SAP protilátek bylo prokázáno postupné odstranění amyloidních depozit z jater a dalších orgánů.

Studie ukázaly, že tento systém může být pravděpodobně aplikován pro všechny typy systémových amyloidóz. CPHPC spolu s anti-SAP protilátkou je nyní ve II. fázi klinického testování (Pepys *et al.*, 2015).

Glykosaminglykany jako heparan sulfát (HS) a proteoglykany jsou častou složkou amyloidního depozita. Dle hypotézy se podílí na patogenezi AA amyloidózy a Alzheimerovy choroby (Westermarck *et al.*, 2015). Konkrétně heparan sulfát-proteoglykany (HSPG) podporují produkci beta amyloidu (Van Horsen *et al.*, 2003). Nejnovější studie zkoumá možnost potlačení tvorby beta amyloidu pomocí nadměrné exprese heparanázy. To je endoglykosidáza, která specificky degraduje nevětvené glykosaminoglykanové postranní řetězce HSPGs. Bylo prokázáno, že zvýšená exprese heparanázy vede ke snížení amyloidní zátěže u transgenních myší. Mohlo by se tedy jednat o novou potenciální strategii léčby (Jendresen *et al.*, 2015).

2.2 Diagnostika amyloidóz

V současné době je diagnostika amyloidóz založena na histologické vizualizaci amyloidových depozit a stanovení konkrétního typu amyloidu, tzv. „typizaci amyloidu“. Správná typizace amyloidu je naprosto zásadní pro zvolení následné léčby pacienta, protože je typově specifická (Mollee *et al.*, 2014)

Při diagnostice amyloidóz se využívají také různé doplňkové metody jako například stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu nebo sérového amyloidu A (SAA), což je užitečné pro diagnostiku i pro monitorování průběhu vybraných amyloidóz. Další možností jsou zobrazovací techniky jako například srdeční ultrazvuk, magnetická rezonance, kostní scintigrafie a scintigrafie sérového amyloidového P proteinu (SAP). Tyto techniky jsou užitečné, jak pro diagnostiku amyloidóz, tak pro zhodnocení závažnosti onemocnění. (Nienhuis *et al.*, 2016).

2.2.1 Histologický průkaz amyloidních depozit

Diagnóza amyloidóz vyžaduje histologické vyšetření, což zahrnuje biopsii tkáně. Nejvyšší citlivosti v diagnóze je obecně dosaženo odebráním vzorku tkáně přímo z postiženého orgánu, zejména z ledviny nebo srdce. Jedná se však o velice invazivní zákrok. V situacích, kdy biopsie orgánu není bezpečná či možná, se provádí biopsie jiného místa. Úspěšně se po desetiletí prováděla rektální biopsie (Gafni *et al.*, 1960), dále biopsie žaludku nebo kůže (Leung *et al.*, 2012).

V posledních letech se v diagnostice amyloidózy využívá aspirát břišní tukové tkáně odebraný pomocí jehly. Tato metoda je méně invazivní, bezpečná, levná a rychlá, nicméně v běžné praxi může být kvalita odebrané tkáně pro vyšetření nedostatečná (Picken, 2013). Další alternativou je chirurgická biopsie tukové tkáně (Westermarck, 2012b). I když oba odběry mohou být provedeny ambulantně, chirurgická biopsie poskytuje lepší výtěžek materiálu pro stanovení diagnózy. Detekce amyloidu z břišního tuku by měla být prováděna opakovaně, jelikož amyloidní depozita mohou být zpočátku špatně detekovatelná (Picken, 2013).

Odebraná tkáň je před histologickým vyšetřením buď zamrazena nebo fixována formalínem a následně zalita do parafínu. Pro optimální barvení amyloidových depozit by měly mít tkáňové řezy tloušťku 6-10 μm (Steensma, 2001; Leung *et al.*, 2012). Základem histologického průkazu amyloidu je pozitivní barvení amyloidních depozit kongo červení (viz podkapitola 2.2.1.1) (Mollee *et al.*, 2014).

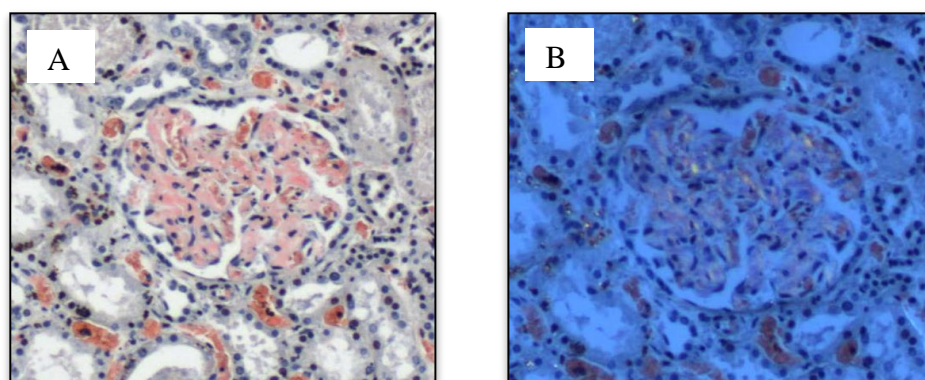
Byly vyvinuty i nové metody barvení amyloidu, například pomocí luminiscenčních konjugovaných oligothiofenů (LCOSs). Dle prvních výsledků se tyto molekuly vážou k amyloidu s vyšší citlivostí a selektivitou než kongo červení. Tato nová metoda by mohla vést k citlivější detekci amyloidu v porovnání s barvením pomocí kongo červeně (Nilsson *et al.*, 2010; Hazenberg, 2013).

2.2.1.1 Barvení kongo červení

Původ kongo červeně sahá do druhé poloviny 19. století, kdy bylo představeno v Německu jako ekonomicky lukrativní textilní barvivo. V roce 1922 byla poprvé prokázána jeho schopnost vazby na amyloidní proteiny (Griesbach, 1886; Bennhold, 1922; Steensma, 2001).

Barvení kongo červení (CR) je „zlatým standardem“ v histologickém potvrzení přítomnosti amyloidního depozita, především ve spojení s mikroskopií v polarizovaném světle. Kongo červeně způsobuje světle růžové až červené zbarvení amyloidních depozit a vydává typický zelený dvojlom při pozorování pod mikroskopem v polarizovaném světle (Obr. 4). Jedná se o jednu z vlastností, kterou lze odlišit amyloidní fibrily od ostatních nepatogenních fibril (Divry *et al.*, 1927; Leung *et al.*, 2012).

Dnes používané barvení pomocí kongo červeně vychází ze zkrácené původní verze barvení (Puchtler *et al.*, 1962) a následném mikroskopickém vyhodnocení obarvených úseků v jasném a polarizovaném světle (Puchtler *et al.*, 1962; Linke, 2012). Při negativním výsledku lze využít fluorescenční mikroskopii. Tato metoda je citlivější a amyloid je snadno identifikovatelný podle jasně oranžovo-červeného zabarvení (Linke, 2000; Linke, 2012). Při vyhodnocení by se měla věnovat pozornost především možnosti záměny typického zeleného dvojlomu za žluto-zelený dvojlom, který vykazuje kolagen (Steensma, 2001; Leung *et al.*, 2012).



Obr. 4: Průkaz amyloidu ve tkáni: (A) nabarvená tkáň kongo červení (B) nabarvená tkáň kongo červení v polarizačním světle.

2.2.2 Typizace amyloidu

Po prokázání přítomnosti amyloidního depozita je nutné identifikovat chemickou podstatu amyloidního proteinu, provést tzv. typizaci amyloidu. Ve většině případů lze očekávat typ amyloidního proteinu na základě anamnézy a klinického obrazu, nicméně i tak je nutné přímé potvrzení amyloidního proteinu z amyloidního depozita. Chybně typizovaná amyloidóza může mít závažné klinické následky, jelikož léčba se výrazně liší mezi jednotlivými typy amyloidózy (Mollee *et al.*, 2014).

V klinické praxi je stále preferována typizace amyloidu pomocí imunohistochemie. Jedná se o rychlou metodu, avšak její nevýhodou je proměnlivá citlivost a specifita (Gilbertson *et al.*, 2015). Během posledních let se pro typizaci amyloidu začala používat proteomická analýza založená na hmotnostní spektrometrii (MS). Ve Spojených státech amerických dostala typizace amyloidu pomocí MS povolení na využití v klinické diagnostice amyloidóz (Lavatelli *et al.*, 2016).

V případě dědičné amyloidózy je jako doplňková metoda k typizaci amyloidu prováděna genetická analýza. Především u ATTR amyloidózy se klade zvláštní důraz na genetické vyšetření, jelikož existuje senilní nemutovaná ATTR forma onemocnění (Dungu *et al.*, 2012). Genetické vyšetření je komerčně dostupné, je však důležité si uvědomit jistá omezení. Většina komerčních laboratoří používá polymorfismus délký restričních fragmentů, které mohou detekovat pouze známé mutace. Pro detekci nových mutací je nezbytné provést sekvenování DNA (Leung *et al.*, 2012).

2.2.2.1 Imunohistochemie

Standardní metodou typizace amyloidu je imunohistochemie, která využívá značení amyloidu pomocí specifických protilátek (Gilbertson *et al.*, 2015). Princip identifikace amyloidního proteinu pomocí IHC je založen na vyhodnocení navázání specifických protilátek na FFPE řezech pomocí mikroskopie (Linke, 2012). Běžně využívaná sada obsahuje 4 protilátky proti AL κ , AL λ , AA a ATTR amyloidním proteinům. Rozšířená sada 10 protilátek (“amY-kit”) je schopna identifikovat až osm různých amyloidních proteinů: AA, AL λ , AL κ , AH, ATTR, A β ₂M, AFib a AApoAI (Linke, 2012).

Jde o finančně a časově nenáročnou metodu, která ve většině případů úspěšně identifikuje prekurzorový protein. Během let se navíc zvýšila specifita a citlivost komerčně dostupných protilátek. Dnes je tato metoda k dispozici ve většině laboratoří, je dobře reprodukovatelná a nevyžaduje speciálně vyškolený personál. Je však důležitá odborná interpretace výsledků (Gilbertson *et al.*, 2015).

I přes velký význam v typizaci amyloidóz má IHC několik omezení, jako například dostupnost protilátek pro méně běžné typy amyloidóz. Citlivost a specifita protilátek je další problém, vzhledem k tomu, že amyloidní prekurzor může být mutovaný. Používané protilátky jsou cílené proti nemutované formě amyloidního proteinu, z toho důvodu mohou u mutované formy amyloidního proteinu vykazovat nižší afinitu. Toto představuje komplikaci především v typizaci AL amyloidózy, jelikož se prekurzorový protein vyznačuje největší variabilitou (Poshusta *et al.*, 2009; Leung *et al.*, 2012). Problém mohou představovat také změny konformace, nebo modifikace amyloidních proteinů, které mohou vést k neschopnosti protilátek rozpoznat odpovídající epitopy. Další problém může představovat kontaminace proteiny z krve, která může vést k nespecifickému barvení u IHC (Lavatelli *et Vrana*, 2011).

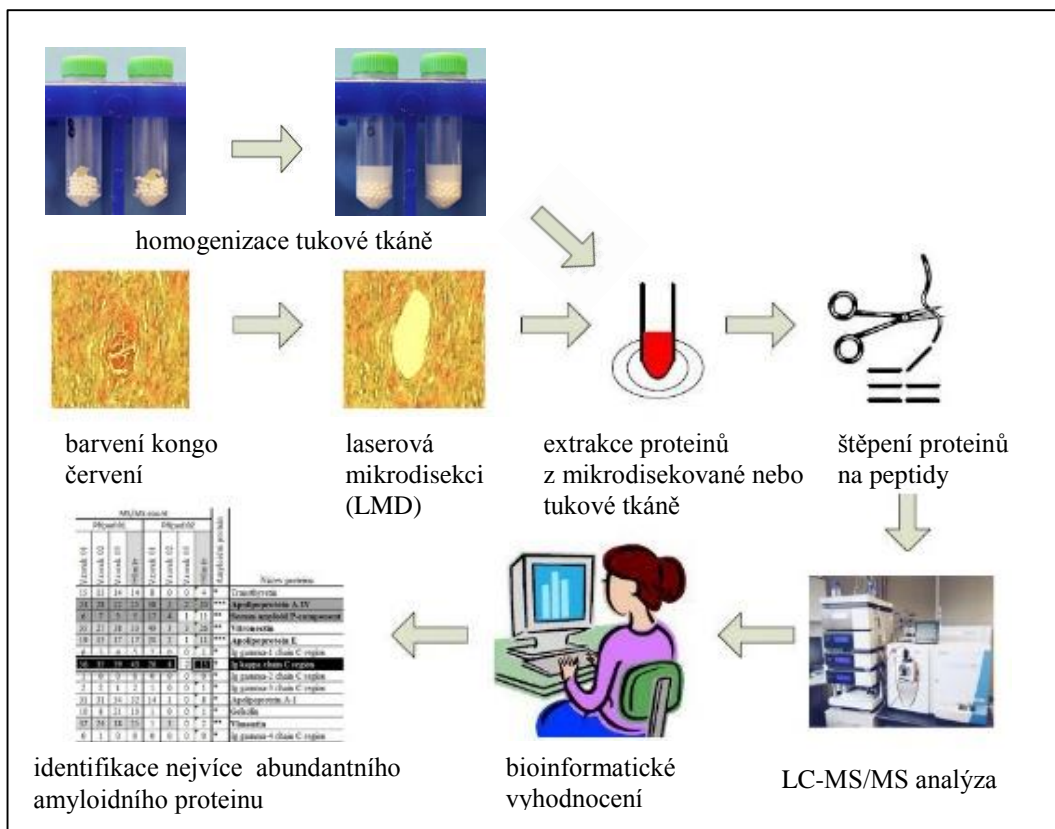
Další metoda typizace je založena na zlatem značených protilátkách a elektronové mikroskopii, využívá se však prozatím jen ve výzkumu. Výhoda této metody je především v přesné lokalizaci amyloidního proteinu ve tkáni. Tato metoda také zajišťuje, že protilátky reagují s amyloidním proteinem a nikoli s proteiny v okolí (Leung *et al.*, 2012).

2.2.2.2 Proteomická analýza

Proteomická analýza je vhodnou volbou pro studium a spolehlivou typizaci amyloidu, jelikož umožňuje přímo identifikovat amyloidní prekursorový protein. Proteomická analýza navíc překonává nedostatky imunohistochemické analýzy zmíněné v předchozí kapitole (Brambilla *et al.*, 2013). Během posledních deseti let bylo vyvinuto několik přístupů typizace amyloidu z různých biologických vzorků, většina kombinuje kapalinovou chromatografii (LC) s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) (Theis *et al.*, 2013). V současné době je nejpokročilejším přístupem typizace amyloidu z parafinované tkáně pomocí laserové mikrodisekce ve spojení s kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (LMD-LC-MS/MS) (Vrana *et al.*, 2009). Typizace amyloidu z tukové tkáně vyžaduje pouze kapalinovou chromatografii a hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS) (Vrana *et al.*, 2014).

Typizace amyloidu ze vzorku parafinované tkáně zahrnuje laserovou mikrodisekci (LMD). Laserová mikrodisekce je technika, která umožňuje izolovat vybrané části tkáně pro její následnou analýzu. Speciálně upravený mikroskop umožňuje výběr mikroskopické oblasti zájmu (např. kongo červení vizualizována amyloidní depozita), následně umožňuje vyřezání této oblasti pomocí laseru a převedení mikrodisekované tkáně do zkumavky. LMD umožňuje zpracovat zamražené nebo parafinované tkáně. Velkou výhodou LMD metody je možnost analyzovat pouze amyloidní depozita, tedy vzorky obohacené o amyloidní proteiny (Dogan, 2012). Typizace amyloidu ze vzorku tukové tkáně vyžaduje promývací kroky a následnou homogenizaci tukové tkáně (Vrana *et al.*, 2014).

Z mikrodisekované nebo tukové tkáně jsou proteiny extrahovány a následně štěpeny trypsinem na peptidy. Směs peptidů je separována pomocí kapalinové chromatografie a poté analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie. Získaná data jsou bioinformaticky vyhodnocena. Identifikace proteinů je dosaženo porovnáním naměřených a teoretických hmotnostních spekter peptidů. Typizace amyloidu je založena na stanovení nejvíce abundantního amyloidního proteinu (Obr. 5) (Theis *et al.*, 2013).



Obr. 5: Průběh typizace amyloidu z parafinovaného vzorku tkáně nebo tukové tkáně pomocí proteomické analýzy (převzato a upraveno dle Theis *et al.*, 2013).

Výhodou proteomické analýzy je možnost přímo identifikovat amyloidní prekurzorový protein. Pomocí stávajících softwarů a databází je částečně možné identifikovat genetické mutace amyloidních proteinů (Leung *et al.*, 2012). Získáváme také přehled o proteinech, které jsou součástí amyloidního depozita. Další výhodou je možnost zkoumat metabolické změny v amyloidních depozitech, které vedou k buněčné toxicitě a následnému poškození orgánu. V neposlední řadě lze identifikovat nové amyloidní prekurzorové proteiny zodpovědné za vznik onemocnění nebo objevit potencionální biomarkery pro diagnostiku, hodnocení závažnosti onemocnění či odpovědi na léčbu (Brambilla *et al.*, 2013). Nevýhody této metody jsou ve vysokých pořizovacích a provozních nákladech přístrojů, stejně jako v nutnosti specializovaného personálu pro analýzu a interpretaci dat (Gilbertson *et al.*, 2014).

3 CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo vypracování rešerše obsahující základní informace o amyloidózách, jejich klasifikaci a současné diagnostické přístupy pro typizaci amyloidóz.

Cílem experimentální části práce bylo zavést proteomické metody typizace systémové amyloidózy z parafinované tkáně pomocí laserového mikrodisektoru ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LMD-LC-MS/MS) a z tukové tkáně pomocí hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS).

4 MATERIÁL

4.1 Biologický materiál

Byly zpracovány dva různé typy vzorků: parafinované vzorky tkáně (FFPE) a vzorky tukové tkáně.

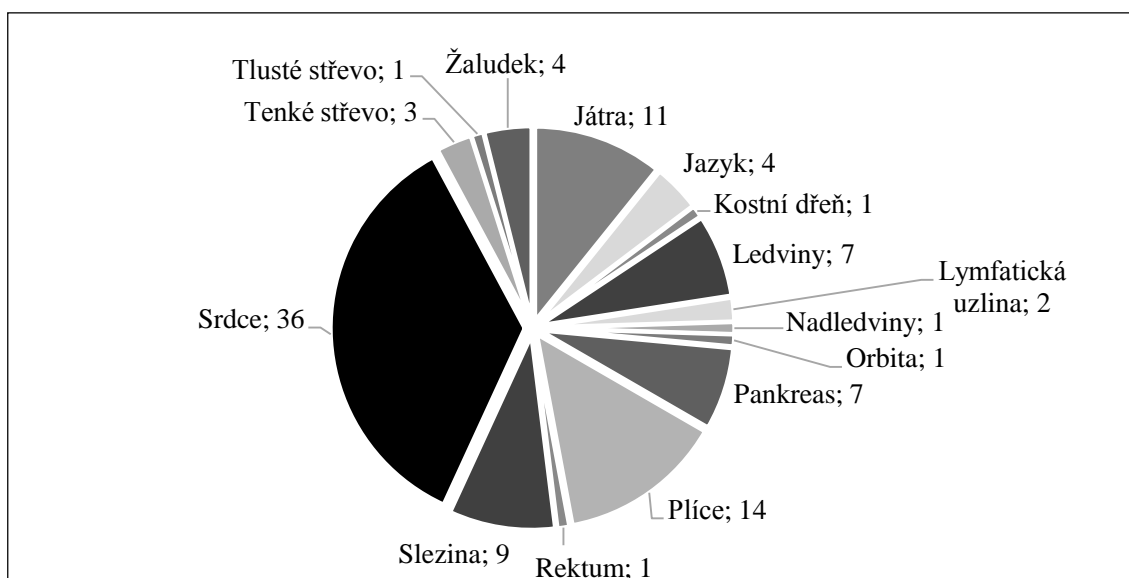
Celkem 102 parafinovaných vzorků tkání bylo získáno z archívu z let 2007 až 2014 z Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Vzorky byly vybrány na základě pozitivního barvení konžskou červení, které specificky barví amyloidní depozita. Vzorky byly získány celkově od 40 případů. Jeden nebo více různých druhů tkání bylo k dispozici u každého případu (Graf 1). U vybraných 12 případů (Tab. 2) byly zpracovány dva odlišné orgány/tkáně pro ověření, že typizovaný amyloidní protein bude u obou tkání totožný. U zbývajících 28 případů (Tab. 3) byl zpracován pouze jeden druh orgánu/tkáně (Graf 2). Dále byly zpracovány kontrolní parafinované vzorky tkání (játra, jazyk, ledvina a srdce), které vykazovaly negativní barvení konžskou červení na přítomnost amyloidního depozita. Ve všech případech byly zpracovány 1-3 biologické replikáty.

Tab. 2: Základní informace u vybraných 12 případů, kde byly zpracovány parafinované vzorky ze dvou odlišných tkání.

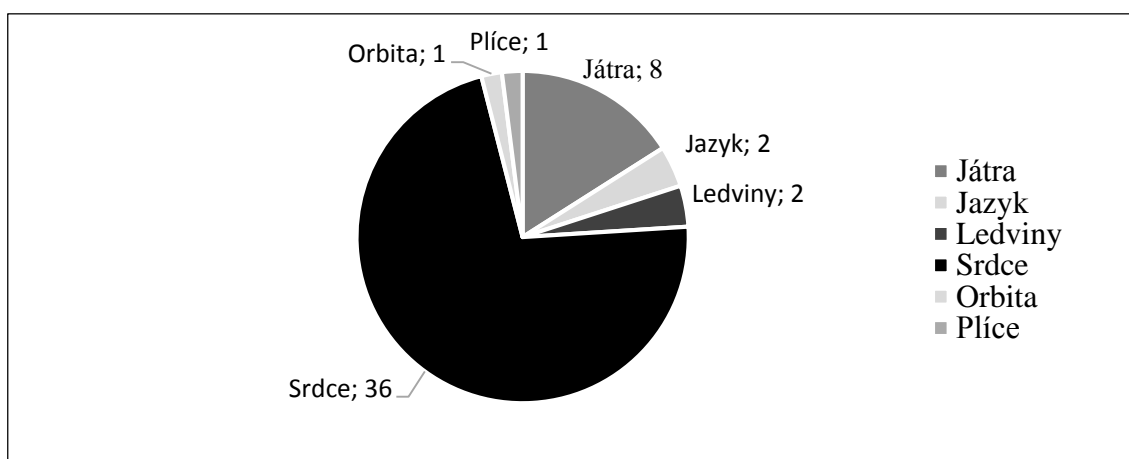
Případ	Pohlaví	Věk	Typ tkáně	Klinická diagnóza
1	muž	69	srdce	Monoklonální gamapatie
			játra	
2	žena	67	srdce	Monoklonální gamapatie nejasného významu
			játra	
3	muž	85	srdce	Monoklonální gamapatie nejasného významu
			ledvina	
4	muž	70	srdce	Mnohočetný myelom
			játra	
5	muž	77	srdce	-
			ledvina	
6	muž	50	srdce	-
			játra	
7	muž	49	srdce	-
			játra	
8	žena	63	srdce	Monoklonální gamapatie nejasného významu
			játra	
9	žena	75	srdce	-
			játra	
10	muž	59	srdce	Mnohočetný myelom
			jazyk	
11	žena	92	srdce	-
			plíce	
12	muž	79	srdce	-
			srdce paraaortálně	

Tab. 3: Základní informace u 28 případů, kde byl zpracován pouze jeden parafinovaný vzorek tkáně.

Případ	Pohlaví	Věk	Tkáň	Případ	Pohlaví	Věk	Tkáň
13	muž	94	srdce	27	žena	92	srdce
14	žena	79	srdce	28	muž	85	srdce
15	žena	84	srdce	29	žena	84	srdce
16	muž	93	srdce	30	muž	91	srdce
17	muž	58	játra	31	muž	77	srdce
18	muž	84	srdce	32	muž	83	srdce
19	žena	85	srdce	33	muž	93	srdce
20	žena	88	srdce	34	žena	86	srdce
21	žena	85	srdce	35	muž	84	srdce
22	žena	92	srdce	36	muž	82	srdce
23	muž	84	srdce	37	žena	82	srdce
24	muž	86	srdce	38	-	-	srdce
25	muž	80	srdce	39	žena	62	jazyk
26	žena	69	srdce	40	muž	40	orbita



Graf 1: Celkové zastoupení orgánů ve 102 vzorcích z archívu.



Graf 2: Celkové zastoupení orgánů ze zpracovaných parafinovaných vzorků z archívu.

Vzorky tukové tkáně byly zpracovány od 5 případů s diagnostikovanou systémovou amyloidózou (Tab. 4) a od 5 kontrolních (zdravých) subjektů. Všechny vzorky tukové tkáně byly zpracovány s informovaným souhlasem a po schválení etickou komisí.

Tab. 4: Základní informace u pacientů s AL amyloidózou, u kterých byla odebrána tuková tkáň.

Případ	Pohlaví	Věk	Klinická diagnóza
1	žena	67	AL _λ
2	muž	56	AL _λ
3	žena	67	AL _λ
4	žena	72	AL _λ
5	muž	43	AL _κ

4.2 Chemikálie

- Acetonitril (ACN, Sigma-Aldrich, Německo)
- Trifluoroethanol (TFE, Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina trifluoroctová (TFA, Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina octová pro LC-MS (AA, Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina mravenčí pro LC-MS (FA, Sigma-Aldrich, Německo)
- Hexafluoropropanol (HFP, Sigma-Aldrich, Německo)
- Zwittergent 3-16 (Sigma-Aldrich, Německo)
- EL pufr (Sigma-Aldrich, Německo)
- RPMI1640 roztok (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dithiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, Německo)
- Milli-Q voda (Merck, Německo)
- Metanol pro LC-MS (MeOH, Merck, Německo)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, SERVA, Německo)
- Kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA, SERVA, Německo)
- Trypsin (Promega, USA)

4.3 Roztoky

Roztoky pro chromatografii:

- Mobilní fáze A (2 % ACN s 0,1 % FA)
- Mobilní fáze B (80 % ACN, 10 % TFE s 0,8 % FA)
- Roztok pro nanášení vzorku (0,1 % TFA)

Roztoky pro extrakci proteinů z parfínovaných vzorků tkání:

- Roztok 10 mmol/l Tris (pH 8)
- Zásobní roztok 2% Zwittergentu 3-16 v 10 mmol/l Tris
- TEZ pufr (10 mmol/l Tris, 1 mmol/l EDTA a 0,002 % Zwittergent 3-16)

Roztoky pro extrakci proteinů u vzorků tukové tkáně:

- Zásobní roztok 2% Zwittergentu 3-16 v HFP
- Pracovní roztok HFP s 0,002 % Zwittergent 3-16

Roztoky pro purifikaci:

- Roztok 0,1% AA
- Roztok 80% ACN s 0,1% AA

Další roztoky:

- Roztok 5% ACN s 0,1% FA
- Roztok 0.5% AA
- Roztok 0,1 mol/l DTT
- Roztok 100 mmol/l Tris (pH 8)

4.4 Přístrojové vybavení

- Laserový mikrodisektor: MMI Cell Cut (Molecular Machines & Industries, Německo)
- Kapalinový chromatograf: UltiMate 3000 RSLCnano System (Thermo Scientific, USA)
- Separační kolona: EASY-Spray colum, PepMap C18, 3 μm , 100 \AA , 75 μm x 15 cm) (Thermo Scientific, USA)
- Předkolona: Acclaim PepMap C18, 5 μm , 100 \AA , 100 μm x 2 cm, NanoViper (Thermo Scientific, USA)
- Hmotnostní spektrometr: Orbitrap Elite™ Hybrid Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo Scientific, USA)
- Homogenizátor: FastPrep-24 (MP Biomedicals, USA)
- Výrobník vody: Direct-Q 3 UV Water Purification System (Merck, Německo)
- Třepačka Vortex (Eppendorf, Německo)
- MiniSpin (Eppendorf, Německo)
- Inkubátor: MS Incubator Biotech (MS Major Science, USA)
- Ultrazvuková lázeň: Bandelin SONOREX (Maneko, Česká republika)
- Centrifuga: Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Německo)
- Termostat blokový: Bio TDB-100 (Biosan, Litva)
- Analytické váhy: Scaltec SBC 21 (Scaltec, Německo)
- pH/mV Metr: UltraBASIC p-LAB,UB-10 (Denver Instrument, USA)
- Koncentrator 5301 (Eppendorf, Německo)

4.5 Software

- Thermo Xcaliber Qual Browser 2.2 SP1.48 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- MaxQuant 1.5.2.8 (Computational Systems Biochemistry, Německo)
- Perseus 1.5.1.6 (Computational Systems Biochemistry, Německo)

5 METODIKA

5.1 Příprava roztoků

Pro kapalinovou chromatografii byly připraveny dvě mobilní fáze: Mobilní fáze A byla složena z 2 % ACN a 0,1 % FA a mobilní fáze B byla složena z 80 % ACN, 10 % TFE a 0,8 % FA. Pro nanášení vzorku na předkolonu byl připraven roztok o složení 0,1 % TFA v H₂O.

Pro extrakci proteinů byl připraven TEZ pufr (10 mmol/l Tris, 1 mmol/l EDTA a 0,002 % Zwittergent 3-16) rozpuštěním 1,9 mg 1 mmol/l EDTA v 4980 μ l 10 mmol/l Tris a přidáním 5 μ l 2% roztoku Zwittergent 3-16. Roztok 10 mmol/l Tris byl připraven rozpuštěním 36 mg Tris ve 30 ml H₂O. Následně bylo pH upraveno na hodnotu 8 pomocí 1 mol/l HCl. Zásobní roztok 2% Zwittergentu 3-16 v 10 mmol/l Tris byl připraven rozpuštěním 10 mg Zwittergent 3-16 v 500 μ l 10 mmol/l Tris.

Pro naředění vzorku byl připraven roztok 0,5% AA smícháním 11 940 μ l a 60 μ l AA. Pro purifikaci peptidů pomocí StageTip byl připraven roztok 0.1% AA smícháním 11 988 ml H₂O s 12 μ l AA a roztok 80% ACN s 0.1% AA smícháním 9,6 ml ACN, 12 μ l AA s 2388 μ l H₂O. Po odpaření vzorků po purifikaci, byly vzorky rozpuštěny v roztoku 5% ACN s 0,1% FA smícháním 11 400 μ l H₂O, 600 μ l ACN a 12 μ l FA.

Roztok 0,1 mol/l DTT byl připraven rozpuštěním 15,4 mg DTT v 1 ml H₂O. Roztok 100 mmol/l Tris byl připraven rozpuštěním 484 mg Tris ve 40 ml H₂O. Následně bylo pH upraveno pomocí 1 mol/l HCl na hodnotu 8.

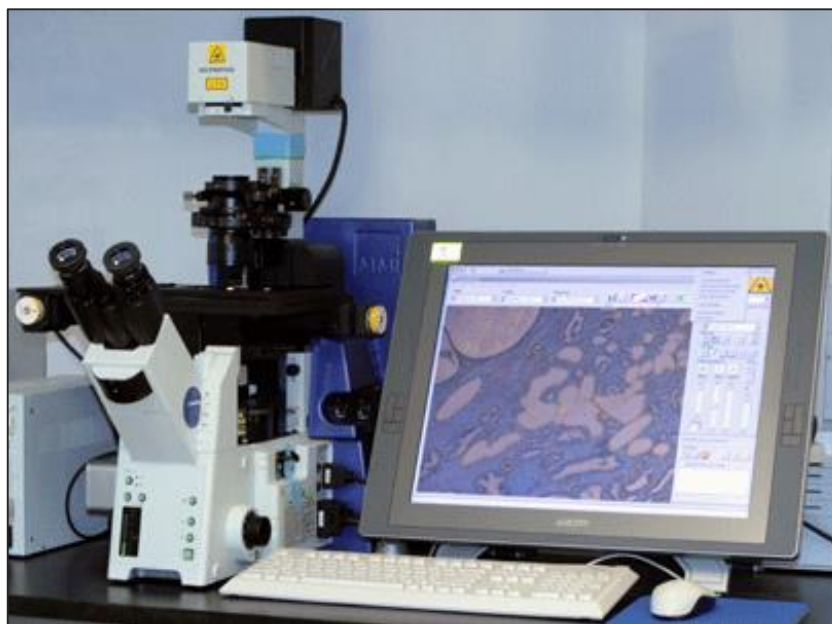
Roztok HFP s 0,002 % Zwittergent 3-16 pro extrakci proteinů z tukové tkáně byl připraven smícháním 1998 μ l HFP a 2 μ l zásobního roztoku 2% Zwittergentu. Zásobní roztok 2% Zwittergentu v HFP byl připraven rozpuštěním 10 mg Zwittergent 3-16 v 500 μ l HFP.

5.2 Zpracování vzorku parafinované tkáně

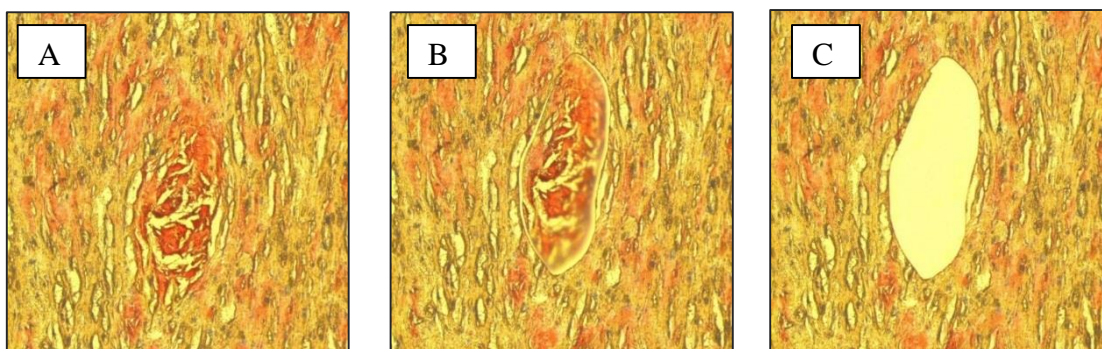
5.2.1 Laserová mikrodisekce

Vzorky parafinované tkáně (FFPE) nabarvené kongo červení byly zpracovány metodou laserové mikrodisekce pomocí přístroje MMI Cell Cut (Obr. 6). Po zapnutí přístroje byla otestována fokusace laseru a případně provedena jeho kalibrace. Následně byly nastaveny parametry laseru jako rychlost, ostření a síla s ohledem na typ tkáně.

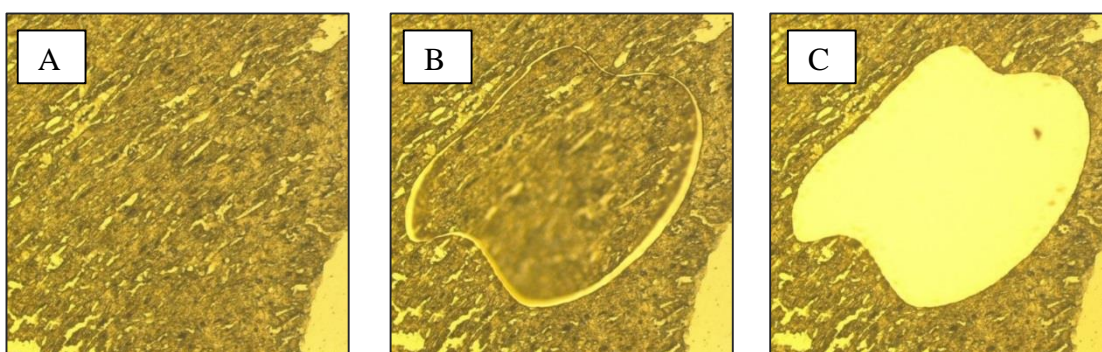
Po základním prozkoumání obarvené tkáně byly označeny červeně nabarvená amyloidní depozita o celkové ploše přibližně 300 000 μm^2 a poté vyřezána pomocí laseru. Mikrodisekovaná tkáň byla zachycena na speciálně upravené víčko mikroskopu pro další zpracování (Obr. 7). U kontrolního vzorku byla označena a vyřezána tkáň neobsahující amyloidní depozita o stejné celkové ploše (Obr. 8).



Obr. 6: Ilustrační obrázek laserového mikrodisektoru MMI Cell Cut
(převzato ze URL: www.aomf.ca/index.html [2016-3-23]).



Obr. 7: Laserová mikrodisekce vzorku: (A) amyloidní depozitum obarvené kongo červení (B) amyloidní depozitum po vyřezání laserem (C) zbylá tkáň po odebrání amyloidního. Zvětšení objektivu: 10x.



Obr. 8: Laserová mikrodisekce kontrolního vzorku: (A) tkáň srdce (B) tkáň po vyřezání laserem (C) zbylá tkáň po odebrání. Zvětšení objektivu: 10x.

5.2.2 Postup zpracování mikrodisekované tkáně

Do každé mikrozkušavky obsahující na víčku mikrodisekovanou tkáň bylo přidáno 35 μ l TEZ pufru (10 mmol/l Tris, pH 8/1 mmol/l EDTA/0,002 % Zwittergent 3-16). Následně byla provedena extrakce proteinů z mikrodisekované tkáně po dobu 90 minut v termobloku při 98 °C. Extrahované proteiny byly poté denaturovány sonikací na vodní lázni přibližně 30 minut.

Ke každému vzorku byl přidán 1 μ l trypsinu o koncentraci 0,5 μ g/ μ l a 39 μ l 0,1 mol/l Tris o pH 8. Proteiny byly štěpeny na peptidy přes noc při 37 °C. Druhý den byla provedena redukce disulfidických můstků na peptidech pomocí 3 μ l 0,1 mol/l DTT po dobu 5 minut v termobloku při 95 °C. Následně byla provedena purifikace peptidů pomocí StageTip (viz podkapitola 5.5).

5.3 Zpracování vzorku tukové tkáně

5.3.1 Odběr vzorku

Vzorek tukové tkáně byl odebrán ve Fakultní nemocnici Olomouc z přední stěny břišní pomocí větší jehly. Vzorek byl přenesen do zkumavky obsahující speciální médium (RPMI 1640 PR s 10 U/ml heparinu a 0,03% azidu sodného) a během 1 hodiny byl poslán do proteomické laboratoře.

Vzorek suspenze tukové tkáně byl zachycen na označené a médiem promyté nylonové sítko (Netwell) a následně promyt médiem a EL pufrem (Qiagen EL puf, způsobuje lýzi erytrocytů). Dále byl vzorek přelit EL pufrem a ponechána 15 minut na ledu. V dalším kroku byl vzorek promyt médiem RPMI 1640 a jednotlivé kousky tukové tkáně byly přeneseny z nylonového sítka do označené 1,5 ml zkumavky. Po odstranění přebytečné kapaliny byl vzorek tukové tkáně zvážen. Za tímto krokem bylo možné tukovou tkáň dále zpracovat nebo zamrazit na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

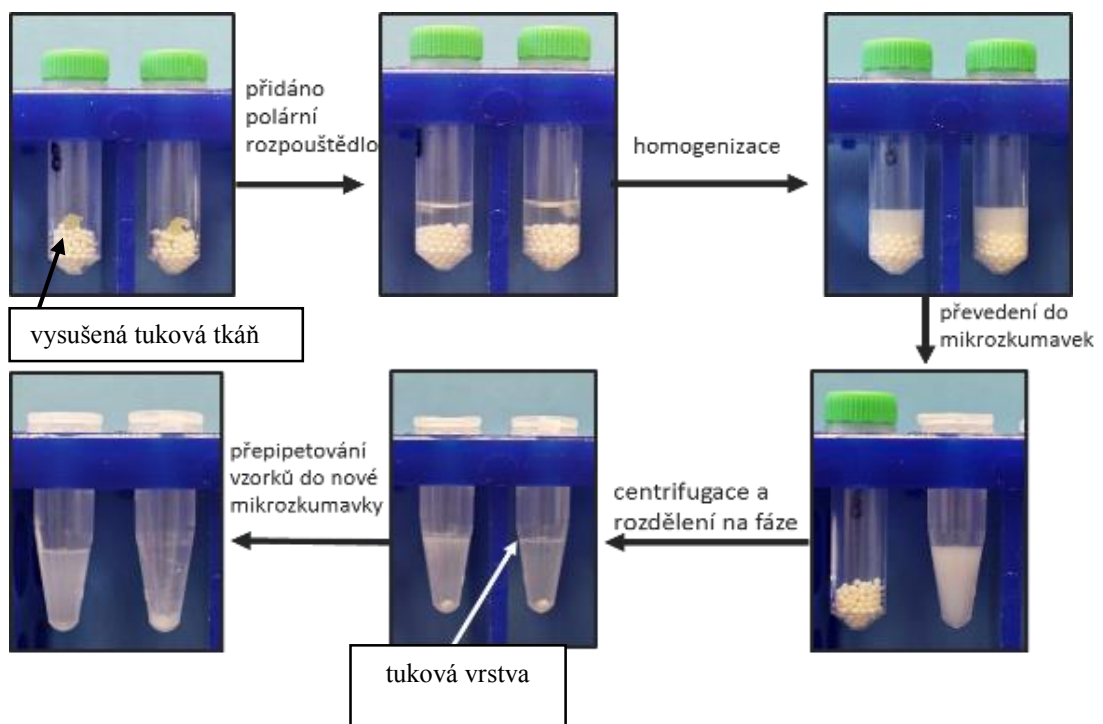
5.3.2 Homogenizace a další zpracování tukové tkáně

Vzorek tukové tkáně byl přenesen do speciální zkumavky obsahující keramické kuličky (Lysing Matrix D, MP Biomedicals). Poté k němu bylo přidáno 300 μl HFP polárního rozpouštědla s 0,002 % Zwittergent 3-16. Homogenizace byla provedena na přístroji FastPrep-24 (3x 40 s, rychlost 6) (Obr. 9). Homogenát tukové tkáně byl převeden do 1,5 ml mikrozkušavky a centrifugován při 12 000 rpm a $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Homogenát byl rozdělen na dvě fáze, kdy vrchní vrstva byla tvořena tukovou vrstvou a spodní proteinovou vrstvou a buněčným sedimentem. Prostřední vrstva obsahující extrahované proteiny byla odebrána do nové 1,5 ml mikrozkušavky a vzorek byl odpařen ve vakuové odparce při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Obr. 10).

Po odpaření bylo ke vzorku přidáno 100 μl 0,1 mol/l Tris o pH 8. Po následném promíchání a sonikaci byl přidán 1 μl trypsinu o koncentraci 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 39 μl 0,1 mol/l Tris o pH 8. Proteiny byly štěpeny na peptidy přes noc v inkubátoru při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Druhý den byly ke vzorkům přidány 3 μl 0,1 mol/l DTT po dobu 5 minut v termobloku při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ za účelem redukce disulfidických vazeb. Následně byla provedena purifikace peptidů pomocí StageTip (viz podkapitola 5.5).



Obr. 9: Ilustrační obrázek homogenizátoru FastPrep-24.



Obr. 10: Postup homogenizace vzorku tukové tkáně.

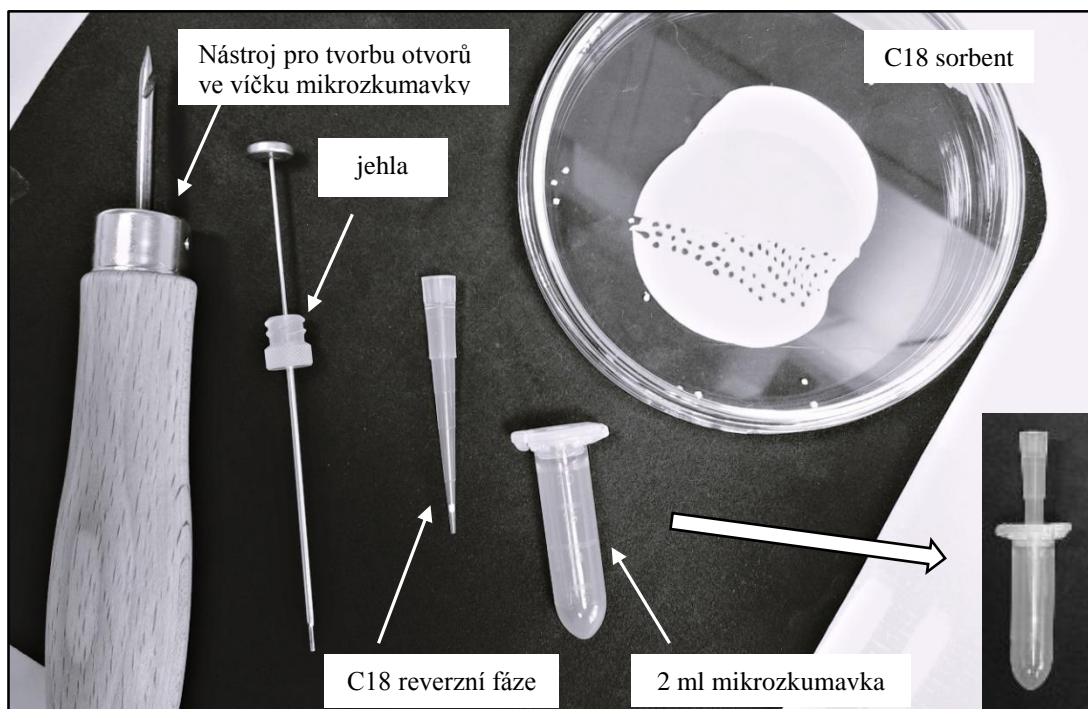
5.4 Purifikace peptidů pomocí StageTip

Manuálně byly připraveny špičky s reverzní fází C18, tzv. StageTip. Pomocí jehly byl vyražen disk s C18 sorbentem a byl vložen do 200 μ l pipetovací špičky (Obr. 11). Takto připravené StageTip byly vloženy do předpřipravené 2 ml zkumavky.

StageTip byl aktivován nanesením 100 μ l 100% metanolu a byl centrifugován při 3 500 rpm a 21°C po dobu 3-5 minut. Stejné centrifugační podmínky byly použity i v dalších krocích. Do StageTip bylo přidáno 100 μ l 80 % ACN s 0,1 % AA a centrifugováno, dále 100 μ l 0,1% AA a opět centrifugováno. Proteklá kapalina byla odstraněna do odpadu.

Do StageTip byl aplikován vzorek (150 μ l) a byl opět centrifugován. StageTip byl promyt přidáním 100 μ l 0,1% AA a byl centrifugován při 3 500 rpm a 21°C po dobu 3-5 minut.

StageTip byla umístěna do nové 1,5 ml mikrozkušavky. Přidáním 100 μ l 80% ACN s 0,1 % AA do StageTip byla centrifugací provedena eluce peptidů. Eluát byl odpařen ve vakuové odparce při 30 °C. Peptidová směs byla rozpuštěna v 5% ACN s 0,1 % FA a byla přenesena do označené vialky pro následnou LC-MS analýzu.

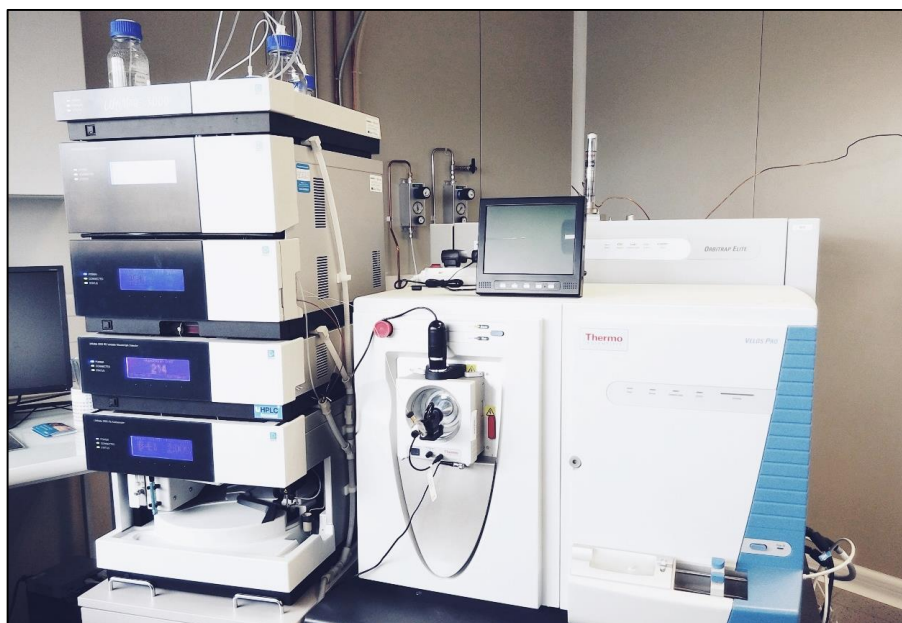


Obr. 11: Ilustrační obrázek manuální přípravy špičky s reverzní fází C18, tzv. StageTip.

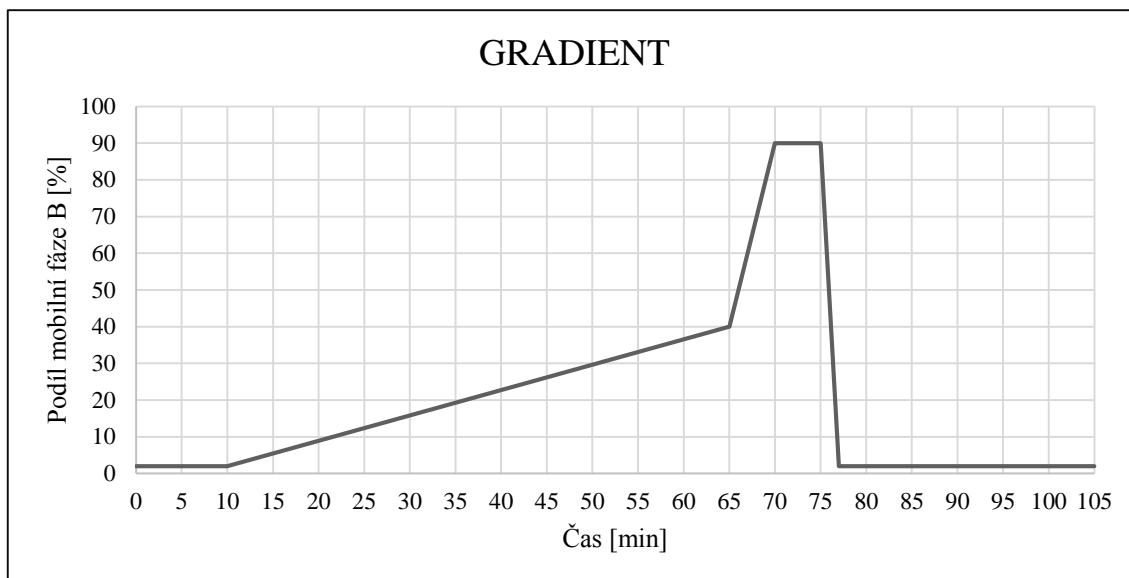
5.5 LC-MS analýza

Proteomická analýza byla provedena na kapalinovém chromatografu Dionex Ultimate 3000 Series ve spojení s ionizačním zdrojem EASY-Spray Source a Orbitrap Elite™ hmotnostním spektrometrem (Obr. 12).

Chromatografická separace proběhla za použití předkolony Acclaim PepMap C18 (5 μm , 100 \AA , 100 μm x 2 cm) a separační kolony EASY-Spray column PepMap C18 (3 μm , 100 \AA , 75 μm x 15 cm). Teplota kolon byla nastavena na 40 $^{\circ}\text{C}$. Pro separaci byla použita mobilní fáze A o složení 2 % ACN s 0,1 % FA a mobilní fáze B o složení 80 % ACN, 10 % TFE s 0,8 % FA. Pro nástřik vzorku na kolonu byl použit roztok o složení 0,1 % TFA. Nástřikový objem vzorku byl 10 μl . Peptidy byly nejdříve zachyceny na Trap koloně při průtoku 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ mobilní fáze A/0,1 % TFA po dobu 10 min, poté byly peptidy separovány na separační koloně. Byla provedena nelineární gradientová separace o celkové době 105 minut. Na začátku gradientu bylo použito 2 % B po dobu 10 minut, poté bylo složení mobilní fáze postupně zvyšováno až na 90 % B po dobu 60 minut. Po dobu 5 minut bylo složení mobilní fáze 90 % B, během 2 minut prudce kleslo na 2 % B a bylo udržováno dalších 28 minut až do konce analýzy (Graf 3). Průtok mobilní fáze byl 0,275 $\mu\text{l}/\text{min}$.



Obr. 12: Ilustrační obrázek kapalinového chromatografu Dionex Ultimate 3000 Series ve spojení s ionizačním zdrojem EASY-Spray a Orbitrap Elite™ hmotnostním spektrometrem.



Graf 3: Průběh používané gradientové eluce pro separaci peptidů na analytické koloně.

Analýza peptidů byla provedena na Orbitrap Elite™ hmotnostním spektrometru. Měření bylo provedeno v pozitivním módu. MS data byla získána v hmotnostním rozsahu od 300 do 1700 m/z a při rozlišení 120 000. CID fragmentace proběhla v iontové pasti, kdy byly pro fragmentaci vybírány 2+, 3+ a 4+ nabitě prekurzorové ionty. Minimální požadovaná intenzita pro MS/MS analýzu byla nastavena na 1000. Hodnota kolizní energie (CE) byla nastavena na 35 %. Hodnota aktivační energie (Q) byla nastavena na 0,25 a aktivační čas byl 10 ms. Dynamická exkluze prekurzorů byla dovolena po dobu 70 s.

5.6 Zpracování a vyhodnocení LC-MS dat

Naměřená MS data byla prohlížena v programu Thermo Xcaliber Qual Browser (2.2 SP1.48) a poté byla nahrána do programu MaxQuant (1.5.2.8), kde byla provedena identifikace proteinů. Data byla prohledána proti UniProt lidské databázi (www.uniprot.org) za využití prohledávacího algoritmu Andromeda. Pro vyhledávání byly nastaveny variabilní modifikace: Gln->pyro-Glu, Acetyl (protein N-term) a oxidace methioninu (M). Jako enzym byl nastaven trypsin s maximálním počtem 2 povolených vynechaných štěpných míst. Byla zvolena label-free kvantifikace (počet MS/MS count). Výsledky po vyhledání byly prohlíženy v programu Perseus (1.5.1.6) a následně vyhodnoceny v programu Microsoft Excel.

5.6.1 Interpretace výsledků

Po vyhledání byl získán seznam identifikovaných proteinů v každém vzorku a počet naměřených MS/MS spekter (MS/MS count) pro daný protein. Počet MS/MS count představuje semikvantitativní informaci o proteinové abundanci.

Ze získaného seznamu identifikovaných proteinů byly vybrány a označeny amyloidní proteiny (viz podkapitola 2.1.3.1, Tab. 1). Následně byla ověřena přítomnost sérového amyloidního P proteinu, apolipoproteinu E a apolipoproteinu A-IV v každém vzorku. Tyto proteiny jsou vždy součástí amyloidního depozita (Pepys, 2001; Merlini *et Bellotti*, 2003). Byla stanovena podmínka, že jejich abundance (MS/MS count) musí být minimálně 2, aby se dal vzorek hodnotit. Dále byla ověřena přítomnost s amyloidem asociovaných proteinů, jako jsou vitronectin a vimentin. U vzorků tukové tkáně byla ověřena přítomnost sérového amyloidního P proteinu, apolipoproteinu A-I a apolipoproteinu E.

Typizace amyloidu byla založena na stanovení nejvíce abundantního amyloidního proteinu. Byl vypočítán průměr MS/MS count mezi biologickými replikáty u jednotlivých případů (Obr. 13).

MS/MS count								Amyloidní protein	Název proteinu
Případ 01				Případ 02					
Vzorek 01	Vzorek 02	Vzorek 03	Průměr	Vzorek 01	Vzorek 02	Vzorek 03	Průměr		
15	13	14	14	8	0	0	4	*	Transthyretin
24	28	22	25	38	2	2	20	***	Apolipoprotein A-IV
6	7	3	5	17	4	1	11	**	Serum amyloid P-component
35	27	38	33	49	3	3	26	**	Vitronectin
19	15	17	17	20	2	1	11	***	Apolipoprotein E
6	5	4	5	2	0	0	1	*	Ig gamma-1 chain C region
56	35	39	43	26	4	2	15	*	Ig kappa chain C region
1	0	0	0	0	0	0	0	*	Ig gamma-2 chain C region
2	2	1	2	1	0	0	1	*	Ig gamma-3 chain C region
31	31	34	32	14	1	0	8	*	Apolipoprotein A-I
10	8	21	13	1	0	0	1	*	Gelsolin
32	24	18	25	1	3	0	2	**	Vimentin
0	1	0	0	0	0	0	0	*	Ig gamma-4 chain C region
...	*	...

nejvíce abundantní amyloidní protein

Obr. 13: Ilustrační tabulka vyhodnocení nejvíce abundantního amyloidního proteinu.

5.6.2 P-Skóre a D-Skóre

Pro vhodnější interpretaci naměřených MS dat pro typizaci amyloidu byly stanoveny dva parametry: P-skóre a D-skóre.

P-skóre stanovuje relativní podíl identifikovaných amyloidních proteinů ku všem identifikovaným proteinům ve vzorku. P-skóre je definováno jako podíl součtu hodnot MS/MS count amyloidních proteinů a MS/MS count všech identifikovaných proteinů ve vzorku. P-skóre bylo vypočítáno u vzorků s amyloidózou i u kontrolních vzorků.

$$P - \text{skóre} [\%] = \frac{\sum(\text{MS/MS count}_{\text{amyloidních proteinů}})}{\sum(\text{MS/MS count}_{\text{všech proteinů}})} \times 100$$

D-skóre je definováno jako podíl hodnoty rozdílu mezi MS/MS count prvního a druhého nejvíce abundantního amyloidního proteinu a hodnoty MS/MS count prvního nejvíce abundantního amyloidního proteinu. Pokud se hodnota D-skóre blíží 1, jedná se o lépe průkaznou typizaci. D-skóre bylo vypočítáno pouze u vzorků s amyloidózou.

$$D - \text{skóre} = \frac{\text{MS/MS count}_1 - \text{MS/MS count}_2}{\text{MS/MS count}_1}$$

6 VÝSLEDKY

6.1 Typizace systémové amyloidózy z FFPE vzorků

Byla provedena typizace systémové amyloidózy pomocí LMD-LC-MS analýzy u 40 případů s diagnostikovanou amyloidózou. U každého případu byly zpracovány 1-3 biologické replikáty. U každého vzorku byl získán proteomický profil obsahující identifikované proteiny s jejich odpovídajícím počtem MS/MS count. Počet MS/MS count odpovídá semikvantitativní informaci o abundanci identifikovaného proteinu.

U vybraných 12 případů, kde byla typizace amyloidu provedena z parafinovaných vzorků ze dvou odlišných orgánů/tkání, jsou výsledné proteomické typizace uvedeny v Tabulce 5. V 11 případech byla typizace totožná z obou orgánů, byl typizován stejný amyloidní protein. Pouze u jednoho případu (případ 12) došlo k rozdílné typizaci. Vzorek tkáně srdce byl typizován jako AL κ a vzorek tkáně srdce odebraný paraaortálně (podél aorty) byl typizován jako ATTR. Výsledná typizace (ATTR) u tohoto případu byla provedena na základě vyšší hodnoty D-skóre. U 28 případů, kde byla provedena typizace pouze z jednoho orgánu, jsou výsledné proteomické typizace uvedeny v Tabulce 6. Ve všech vzorcích byla ověřena přítomnost sérového amyloidního P proteinu, apolipoproteinu A-IV, apolipoproteinu E, vitronectinu a vimentinu jako proteinů asociovaných s amyloidem. V rámci všech případů byla typizována ATTR, AL κ , AL λ , AFib a ACal amyloidóza (Tab. 7, Graf 3).

U případu 17 byla typizována AFib amyloidóza. Je popsáno devět různých mutací na fibrinogenu α asociovaných s AFib amyloidózou, z nichž nejčastější varianta je E545V (Pinney *et* Hawkins, 2012). Na poloze 545 je záměna kyselina glutamové (E) za valin (V) (E545V, p.Glu545Val). Na základě MS a MS/MS dat byl identifikován mutovaný peptid (TFPGFFSPMLGEFVSETVSR, 1118.0432 m/z, z = 2+) z fibrinogenu α (Obr. 14).

Pro porovnání amyloidních a neamyloidních parafinovaných vzorků tkání byla provedena analýza 20 kontrolních vzorků parafinované tkáně (játra, jazyk, ledvina a srdce) ve 3 biologických replikátech. V kontrolních vzorcích byly buď identifikovány amyloidní proteiny s velmi nízkou abundancí anebo nebyly identifikovány vůbec.

Tab. 5: Typizace amyloidu ve vzorcích parafinované tkáně u 12 případů ze dvou různých orgánů. Hodnota MS/MS count: je u nejvíce abundantního amyloidního proteinu vyznačena černě a u proteinů asociovaných s amyloidem jsou vyznačeny šedě.

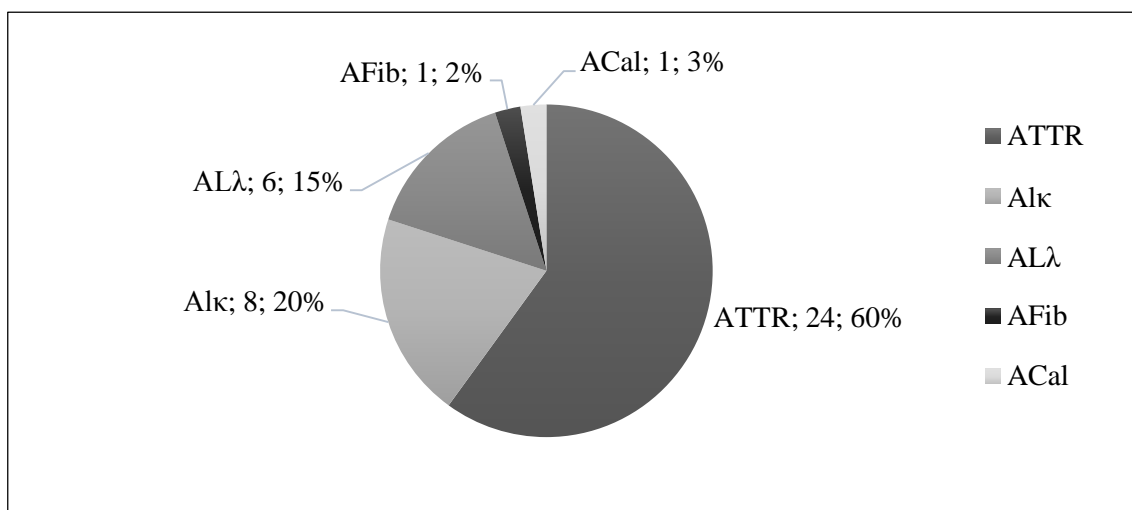
Případ	Tkáň	Proteomická typizace	MS/MS count vybraných amyloidních proteinů													
			Transferrin	Apolipoprotein A-IV	Serum amyloid P-component	Vitronectin	Apolipoprotein E	Ig gamma-1 chain C region	Ig kappa chain C region	Ig gamma-2 chain C region	Ig gamma-3 chain C region	Apolipoprotein A-I	Vimentin	Ig lambda-2 chain C regions	Fibrinogen alpha chain	Calcitonin
1	srdce	ALκ	3	9	19	15	35	20	50	7	9	5	14	3	2	0
	játra	ALκ	4	11	36	22	62	17	63	3	6	7	11	6	4	0
2	srdce	ALλ	3	10	12	15	25	6	5	1	2	10	22	31	5	0
	játra	ALλ	4	13	27	16	44	6	3	1	2	12	15	33	8	0
3	srdce	ALλ	5	38	15	29	17	3	5	1	2	9	24	24	6	0
	ledvina	ALλ	10	51	30	31	23	10	9	5	4	8	47	25	4	0
4	srdce	ALκ	14	45	16	43	32	14	106	6	7	12	26	5	4	0
	játra	ALκ	7	8	13	21	35	17	39	6	6	8	23	3	11	0
5	srdce	ALλ	3	31	8	31	23	7	10	4	3	14	25	28	0	0
	ledvina	ALλ	5	13	13	31	44	16	12	11	6	6	42	35	4	0
6	srdce	ALκ	10	53	9	43	35	2	36	0	1	15	17	2	2	0
	játra	ALκ	8	26	9	38	61	6	32	0	3	4	9	2	10	0
7	srdce	ALλ	1	30	7	9	14	1	1	1	0	1	20	29	1	0
	játra	ALλ	2	24	10	18	44	0	1	0	0	0	9	32	9	0
8	srdce	ALλ	7	29	5	34	11	6	7	1	3	8	10	14	4	0
	játra	ALλ	8	32	9	34	16	6	3	1	2	6	14	10	3	0
9	srdce	ALλ	8	40	20	31	20	7	6	1	3	17	21	32	10	0
	játra	ALλ	6	30	27	31	15	6	3	0	2	13	36	21	3	0
10	srdce	ALκ	12	37	11	46	25	4	57	1	1	29	19	2	11	0
	jazyk	ALκ	14	26	7	31	17	6	46	1	2	31	28	2	2	0
11	srdce	ATTR	33	22	13	16	15	5	10	1	3	9	8	2	3	0
	plíce	ATTR	18	14	14	18	11	4	8	3	4	6	3	2	1	0
12	srdce	ALκ	6	5	8	13	8	1	7	0	0	4	4	0	0	0
	srdce paraaortálně	ATTR	82	33	36	40	20	21	16	7	8	13	26	3	2	0

Tab. 6: Typizace amyloidu ve vzorcích parafinované tkáně u 28 případů. Hodnota MS/MS count je u nejvíce abundantního amyloidního proteinu vyznačena **černě** a u proteinů asociovaných s amyloidem jsou vyznačeny **šedě**.

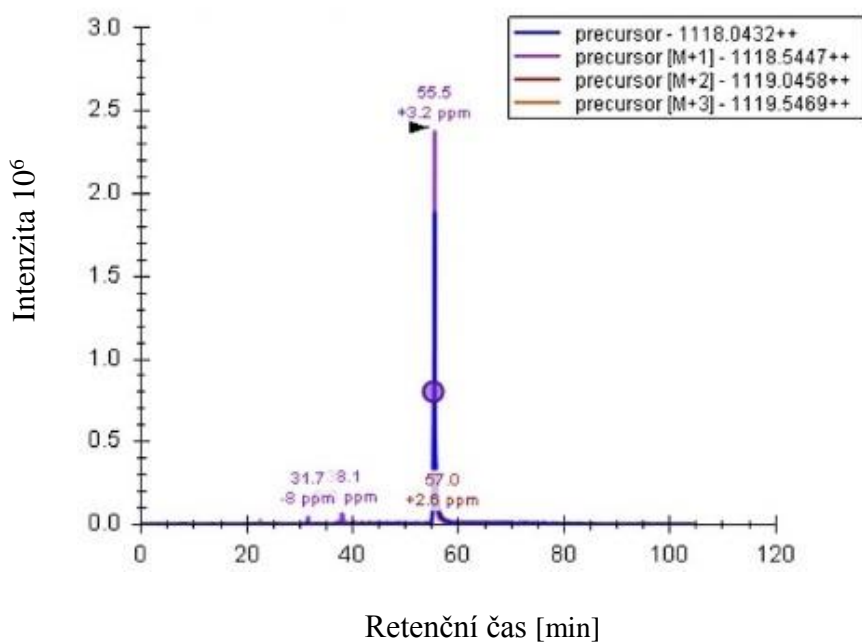
Případ	Tkáň	Proteomická typizace	MS/MS count vybraných amyloidních proteinů													
			Transferrin	Apolipoprotein A-IV	Serum amyloid P-component	Vitronectin	Apolipoprotein E	Ig gamma-1 chain C region	Ig kappa chain C region	Ig gamma-2 chain C region	Ig gamma-3 chain C region	Apolipoprotein A-I	Vimentin	Ig lambda-2 chain C regions	Fibrinogen alpha chain	Calcitonin
13	srdce	ATTR	41	21	23	20	19	12	10	8	8	6	5	3	3	0
14	srdce	ALκ	4	14	6	23	15	1	10	0	0	3	12	0	1	0
15	srdce	ATTR	33	16	15	26	15	9	6	4	7	5	4	2	5	0
16	srdce	ATTR	56	20	20	23	13	5	11	2	3	5	5	2	4	0
17	játra	AFib	7	0	34	42	46	16	11	6	7	10	9	2	95	0
18	srdce	ATTR	25	16	16	30	15	10	10	6	8	7	31	2	3	0
19	srdce	ATTR	34	14	14	21	15	6	7	3	4	3	16	1	2	0
20	srdce	ATTR	30	12	11	11	11	3	5	3	2	2	6	1	1	0
21	srdce	ATTR	24	8	8	11	9	7	6	4	5	6	1	2	2	0
22	srdce	ATTR	73	32	30	44	30	30	23	18	18	9	10	8	5	0
23	srdce	ATTR	66	36	33	45	24	23	13	7	12	22	28	4	5	0
24	srdce	ALκ	3	1	3	10	2	1	4	1	1	0	10	0	0	0
25	srdce	ATTR	72	32	32	41	32	16	12	8	11	15	7	5	3	0
26	srdce	ATTR	76	44	29	39	25	28	14	13	18	25	26	7	20	0
27	srdce	ATTR	41	23	18	21	23	1	5	0	0	3	5	0	0	0
28	srdce	ATTR	61	26	27	33	26	16	15	12	15	10	11	7	9	0
29	srdce	ATTR	84	47	45	45	35	22	16	12	13	12	9	4	7	0
30	srdce	ATTR	35	16	11	18	12	7	7	3	3	2	5	2	0	0
31	srdce	ATTR	22	15	18	21	12	15	10	8	9	7	6	6	4	0
32	srdce	ATTR	35	18	18	30	9	20	13	7	12	9	26	2	0	0
33	srdce	ATTR	81	35	31	37	24	14	15	7	9	8	9	3	3	0
34	srdce	ATTR	50	25	29	40	18	26	14	13	17	9	13	3	5	0
35	srdce	ATTR	24	7	17	13	10	4	10	1	2	3	5	1	1	0
36	srdce	ATTR	49	30	31	36	25	1	5	0	0	4	10	2	2	0
37	srdce	ATTR	49	21	25	30	18	5	12	1	2	3	7	1	3	0
38	srdce	ACal	8	65	14	44	26	13	13	7	7	24	30	3	2	61
39	jazyk	ALκ	4	20	11	26	11	1	15	0	1	8	2	1	0	0
40	orbita	ALκ	12	29	7	45	23	12	101	12	11	31	20	3	0	0

Tab. 7: Četnost typizovaných amyloidóz ve vyšetřeném archivu (40 případů).

Typizovaný protein	Proteomická typizace	Počet
Transthyretin	ATTR	24
Ig kappa chain C region	Alk	8
Ig lambda-2 chain C regions	AL λ	6
Fibrinogen alpha chain	AFib	1
Calcitonin	ACal	1



Graf 3: Koláčový graf četnosti typizovaných amyloidóz u parafinovaných vzorků z archivu (40 případů).



Obr. 14: MS stopa mutovaného peptidu (TFPGFFSPMLGEFVSETVSR) z fibrinogenu α u případu 17.

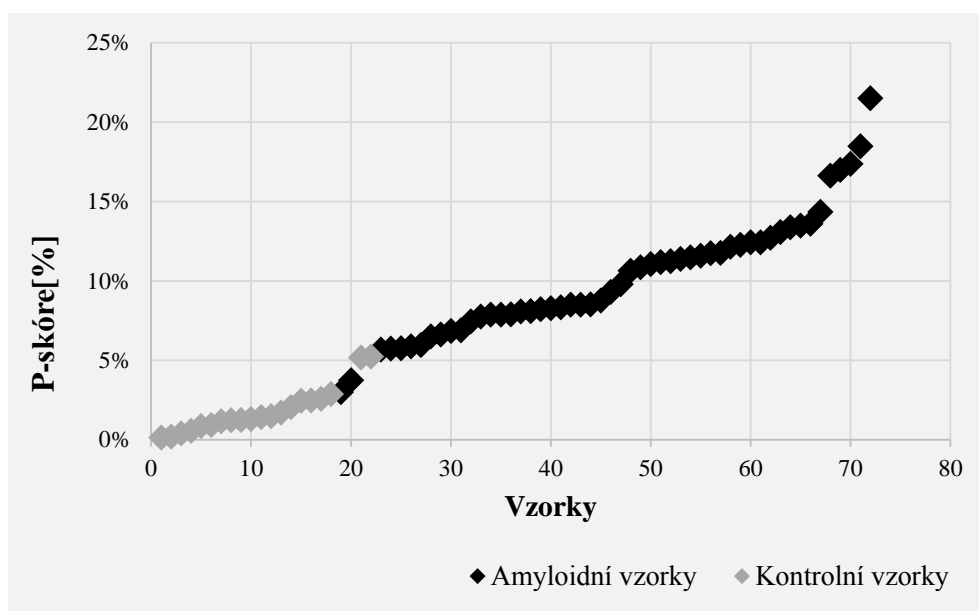
Bylo vypočítáno P-skóre u amyloidních (Tab. 8) a kontrolních vzorků (Tab. 9, Graf 4). Byl vytvořen graf závislosti počtu zpracovaných (amyloidních a kontrolních) vzorků ku vzrůstající hodnotě P-skóre (Graf 5).

Tab. 8: Hodnota P-skóre pro zpracované amyloidní parafinované vzorky tkáně.

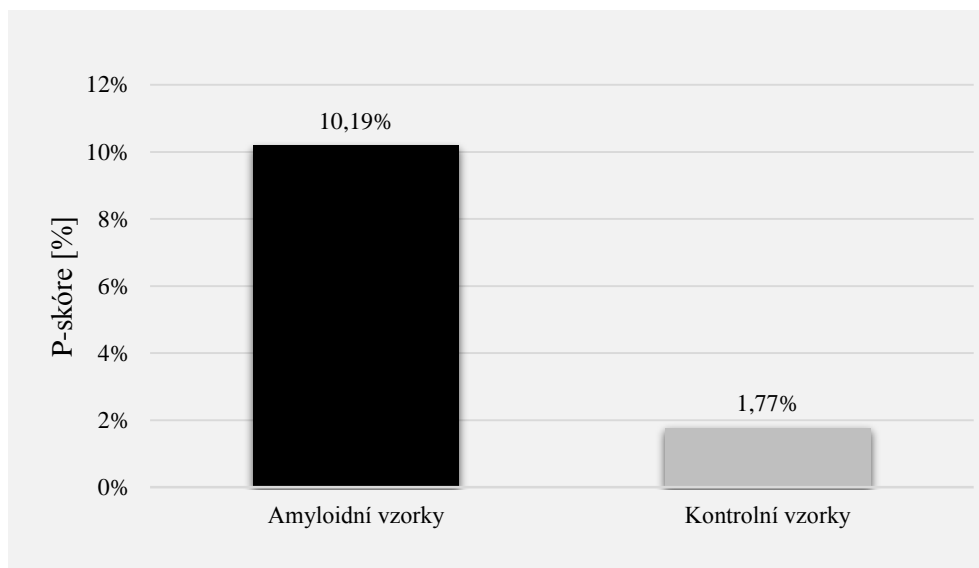
Amyloidní vzorky	Případ	MS/MS count amyloidních proteinů	MS/MS count všech proteinů	P-skóre [%]
	1	234	3013	7,77
		300	2442	12,27
	2	164	2791	5,89
		197	2498	7,90
	3	190	2232	8,50
		299	2284	13,08
	4	378	3554	10,64
		227	2740	8,28
	5	219	3800	5,75
		285	2429	11,75
	6	276	1657	16,64
		264	1958	13,49
	7	122	3270	3,74
		151	2532	5,96
	8	148	1689	8,76
		151	1836	8,23
	9	239	2059	11,59
		204	2078	9,79
	10	321	2730	11,76
		280	2251	12,44
	11	142	2501	5,68
		116	1465	7,89
	12	58	519	11,18
		329	2866	11,48
	13	203	1596	12,72
	14	97	1164	8,33
	15	160	746	21,50
	16	177	2719	6,51
	17	340	2367	14,35
	18	193	1777	10,86
	19	148	1878	7,88
	20	98	1479	6,63
	21	104	1291	8,08
	22	371	2771	13,39
	23	343	2018	17,00
	24	41	1365	3,00
	25	308	1772	17,38
	26	425	3125	13,60
	27	140	2032	6,89
28	303	3741	8,10	
29	385	3096	12,44	
30	128	1862	6,85	
31	164	1441	11,38	
32	219	1980	11,06	
33	313	3673	8,52	
34	299	2462	12,14	
35	100	1740	5,75	
36	204	2397	8,51	
37	185	2482	7,45	
38	337	3621	9,31	
39	124	1103	11	
40	364	1969	18	
	Průměr		10,19	

Tab. 9: Hodnoty P-skóre pro zpracované kontrolní parafinované vzorky tkáně.

Kontrolní vzorky	Případ	MS/MS count amyloidních proteinů	MS/MS count všech proteinů	P-skóre [%]
	41	0,3	235,0	0,14
	42	3,7	427,7	0,86
	43	2,3	199,0	1,17
	44	6,3	425,7	1,49
	45	4,3	354,7	1,22
	46	2,7	287,7	0,93
	47	1,0	251,3	0,40
	48	7,3	299,3	2,45
	49	3,3	235,0	1,42
	50	0,7	334,3	0,20
	51	4,3	254,0	1,71
	52	8,7	301,7	2,87
	53	2,3	188,0	1,24
	54	2,7	204,7	1,30
	55	5,0	202,0	2,48
	56	1,33	241,3	0,55
	57	8,7	165,7	5,23
	58	5,33	207,0	2,58
	59	5,0	244,3	2,05
60	7,7	148,3	5,17	
	Průměr		1,77	



Graf 4: Závislost počtu zpracovaných (amyloidních a kontrolních) parafinovaných vzorků na vzrůstající hodnotě P-skóre.

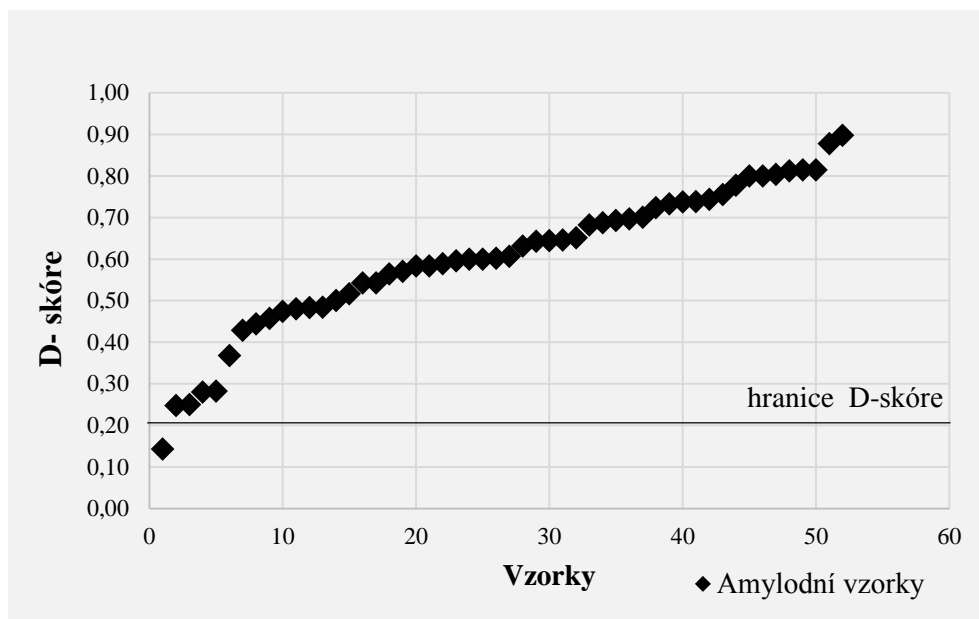


Graf 5: Sloupcový graf průměrné hodnoty P-skóre ze všech zpracovaných amyloidních a ze všech kontrolních (neamyloidních) parafinovaných vzorků.

D-skóre byla počítáno u všech amyloidních vzorků (Tab. 10) a byl vynesena graf závislosti počtu amyloidních vzorků na vzrůstající hodnotě D-skóre (Graf 6). U případu 12 byla provedena typizace ze dvou parafinovaných vzorků (srdce a srdce paraaortálně). Vzorek srdce byl typizován jako AL κ a jeho D-skóre bylo 0,14. Vzorek srdce (paraaortálně) byl typizován jako ATTR a jeho D-skóre bylo 0,71 (Tab. 11). Na základě vyšší hodnoty D-skóre byl případ 12 typizován jako ATTR amyloidóza. Pro spolehlivější výslednou typizaci byla nastavena hraniční hodnota D-skóre na hodnotu 0,20.

Tab. 10: Hodnoty D-skóre pro zpracované amyloidní parafinované vzorky tkáně.

Amyloidní vzorky	Případ	MS/MS count prvního	MS/MS count druhého	D-skóre
	1	50,3	20,3	0,60
		63,3	17,0	0,73
	2	31,3	11,0	0,64
		32,7	14,0	0,57
	3	23,7	9,3	0,60
		25,3	13,3	0,47
	4	106,3	19,3	0,81
		39,0	17,0	0,56
	5	28,0	14,3	0,48
		35,3	16,0	0,54
	6	36,3	15,0	0,58
		32,3	11,3	0,65
	7	29,3	4,3	0,81
		31,7	9,3	0,70
	8	13,7	9,7	0,28
		10,0	7,5	0,25
	9	32,0	17,0	0,44
		20,5	12,5	0,37
	10	57,0	28,7	0,46
		45,5	31,0	0,28
	11	33,0	10,0	0,70
		17,5	8,0	0,54
	12	7,0	6,0	0,14
		82,0	21,0	0,74
	13	30,3	9,7	0,68
	14	10,0	4,0	0,60
	15	33,0	9,3	0,69
	16	56,0	11,0	0,80
	17	95,3	25,3	0,72
	18	25,0	10,0	0,60
	19	29,3	5,3	0,80
	20	29,5	6,5	0,52
	21	33,5	10,0	0,64
	22	73,0	30,0	0,59
	23	66,0	23,0	0,65
	24	4,0	3,0	0,25
	25	72,0	16,0	0,78
	26	76,0	28,0	0,63
	27	41,0	5,0	0,88
28	61,0	16,0	0,74	
29	84,0	22,0	0,74	
30	35,0	7,0	0,80	
31	21,5	14,5	0,48	
32	35,0	20,0	0,43	
33	81,0	15,0	0,81	
34	50,0	26,0	0,48	
35	24,0	10,0	0,58	
36	49,0	5,0	0,90	
37	49,0	12,0	0,76	
38	61,0	24,0	0,61	
39	15,0	7,5	0,500	
40	101,0	31,0	0,693	
Průměr				0,60



Graf 6: Graf závislosti počtu amyloidních vzorků na vzrůstající hodnotě D-skóre.

Tab. 11: Typizace amyloidu a hodnota D-skóre u případu 12. Hodnota MS/MS count: je u nejvíce abundantního amyloidního proteinu vyznačena **černě** a u proteinů asociovaných s amyloidem jsou vyznačeny **šedě**.

Případ	Tkáň	D-skóre	Proteomická typizace	MS/MS count vybraných amyloidních proteinů												
				Transferytin	Apolipoprotein A-IV	Serum amyloid P-	Vitronectin	Apolipoprotein E	Ig gamma-1 chain C region	Ig kappa chain C region	Ig gamma-2 chain C region	Ig gamma-3 chain C region	Apolipoprotein A-I	Gelsolin	Vimentin	...
12	srdce	0,14	ALκ	6	5	8	13	8	1	7	0	0	4	0	4	-
	srdce paraaortálně	0,74	ATTR	82	33	36	40	20	21	16	7	8	13	2	26	-

6.2 Typizace vzorků tukové tkáně

Byla provedena proteomická analýza tukové tkáně u 5 případů s diagnostikovanou AL amyloidózou a u 5 zdravých kontrolních případů. Byl získán proteomický profil obsahující seznam identifikovaných proteinů s jejich odpovídajícím počtem MS/MS count. Počet MS/MS count odpovídá semikvantitativní informaci o proteinové abundance. Nejvíce abundantní amyloidní protein určil typ amyloidózy. Ve všech vzorcích byla ověřena přítomnost sérového amyloidního P proteinu, apolipoproteinu A-I a apolipoproteinu E jako proteinů asociovaných s amyloidem (Tab. 12).

Ve třech případech (případ 1, 3 a 4) byla typizována AL λ amyloidóza, což odpovídá klinické diagnóze. U případu 2 byla typizována AL κ amyloidóza, ale klinická diagnóza byla AL λ amyloidóza. Případ 5 nebyl typizován, jednalo se o lokalizovanou amyloidózu. V 5 kontrolních vzorcích byly identifikovány amyloidní proteiny s velmi nízkou abundancí anebo nebyly identifikovány vůbec.

Tab. 12: Typizace amyloidu ve vzorcích tukové tkáně u 5 případů s diagnostikovanou AL amyloidózou a 5 kontrolních případů. Hodnota MS/MS count: je u nejvíce abundantního amyloidního proteinu vyznačena **černě** a u proteinů asociovaných s amyloidem jsou vyznačeny **šedě**.

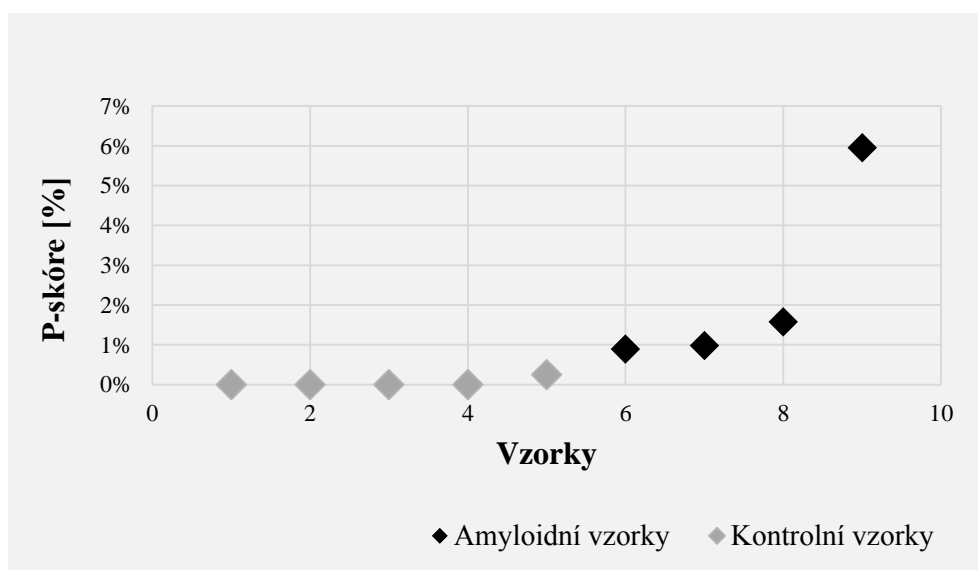
	Případ	Proteomická typizace	Systémová/lokalizovaná amyloidóza	Klinická diagnóza	MS/MS count amyloidních proteinů										
					Ig lambda-3 chain C regions	Apolipoprotein E	Apolipoprotein A-IV	Apolipoprotein A-I	Serum amyloid P-component	Transferrin	Beta-2-microglobulin	Ig gamma-2 chain C region	Ig gamma-3 chain C region	Ig heavy chain V-III region VH26	Ig kappa chain C region
Amyloidní vzorky	1	AL λ	S	AL λ	12	7	6	3	2	2	1	0	0	0	0
	2	AL κ	S	AL λ	3	12	17	27	4	3	1	1	4	2	6
	3	AL λ	S	AL λ	25	22	33	14	10	8	1	5	4	3	6
	4	AL λ	S	AL λ	8	25	21	25	7	4	1	1	1	1	3
	5	-	L	AL λ	0	1	0	9	0	0	1	0	0	0	0
Kontrolní vzorky	6	-	-	-	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	7	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

S – systémová; L – lokalizovaná

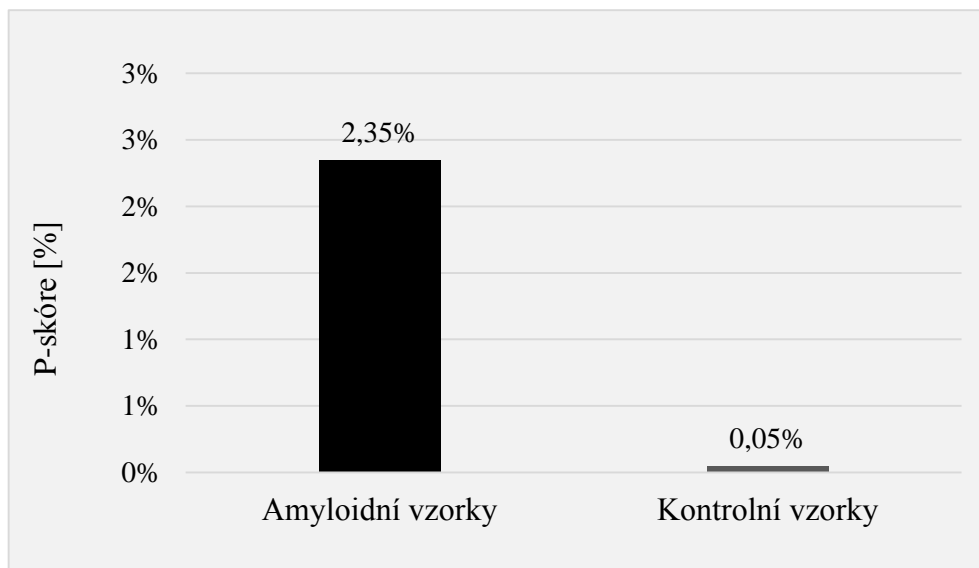
Bylo vypočítáno P-skóre u amyloidních a kontrolních vzorků (Tab. 13, Graf 7). Byl vytvořen graf závislosti počtu zpracovaných (amyloidních a kontrolních) vzorků ku vzrůstající hodnotě P-skóre (Graf 8). D-skóre byla počítáno u všech amyloidních vzorků (Tab. 14) a byl vynesena graf závislosti počtu amyloidních vzorků na vzrůstající hodnotě D-skóre (Graf 9). U případu 2 byly hodnoty MS/MS count prvního a druhého nejvíce abundantního proteinu 6 a 4, rozdíl byl minimální, čemuž odpovídala i nízká hodnota D-skóre (0,33). Pro spolehlivější výslednou typizaci byla nastavena hraniční hodnota D-skóre na hodnotu 0,35.

Tab. 13: Hodnota P-skóre pro 4 případy s diagnostikovanou AL amyloidózou a 5 kontrolních případů.

	Případ	MS/MS count všech proteinů	MS/MS count amyloidních proteinů	P-skóre [%]
Amyloidní vzorky	1	585	35	5,95
	2	9798	87	0,89
	3	9162	145	1,58
	4	9830	97	0,98
	Průměr			
Kontrolní vzorky	6	818	2	0,24
	7	361	0	0
	8	276	0	0
	9	217	0	0
	10	305	0	0
	Průměr			



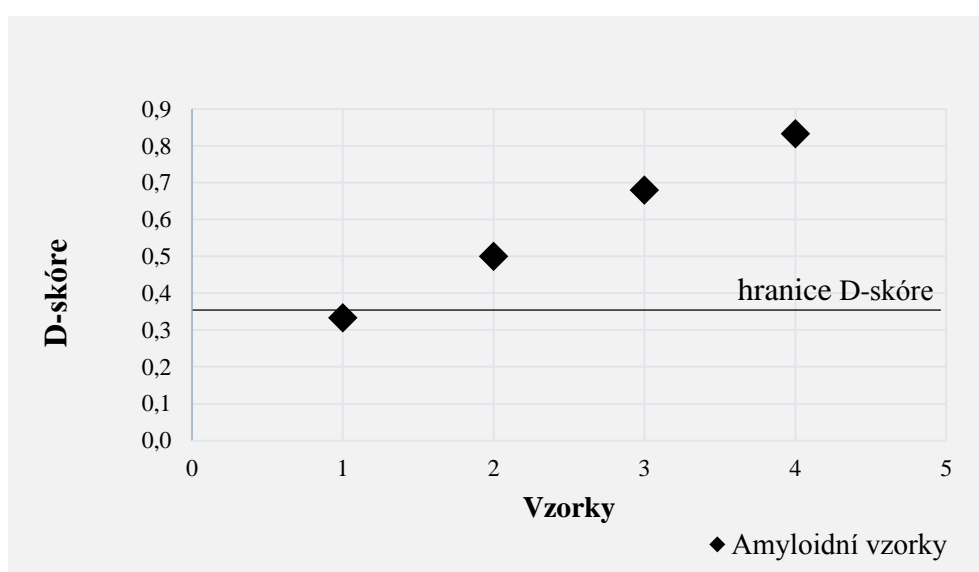
Graf 7: Závislost počtu amyloidních a kontrolních vzorků na vzrůstající hodnotě P-skóre.



Graf 8: Sloupcový graf s průměrnou hodnotou P-skóre u 4 případů s diagnostikovanou AL amyloidózou a 5 kontrolních případů.

Tab. 14: Hodnoty D-skóre pro 4 případy s diagnostikovanou AL amyloidózou.

Amyloidní vzorky	Případ	MS/MS count prvního	MS/MS count druhého	D-skóre
	1	12	2	0,83
2	6	4	0,33	
3	25	8	0,68	
4	8	4	0,50	
Průměr				0,6



Graf 9: Závislost počtu amyloidních vzorků na vzrůstající hodnotě D-skóre.

7 DISKUZE

V současné době je dostupná léčba pro většinu amyloidóz, je však pro jednotlivé typy specifická. Spolehlivá typizace amyloidu je naprosto zásadní pro zvolení vhodné léčby u pacientů s amyloidózou. Typizace amyloidózy je založena na identifikaci prekurzorového proteinu, který se podílí na tvorbě amyloidních depozit. Typizace amyloidózy se v běžné praxi provádí pomocí imunohistochemie, nicméně tato metoda má jisté omezení především v nižší citlivosti a specifitě protilátek (Gilbertson *et al.*, 2015).

Nejpokročilejší technikou pro typizaci amyloidu je dnes proteomická analýza, konkrétně laserová mikrodisekce ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LMD-LC-MS/MS). V roce 2009, Vrana a kol. zavedli metodu pro typizaci amyloidu pomocí LMD-LC-MS/MS analýzy z parafinovaných vzorků tkáně. V tréninkové skupině, kde jednotlivé amyloidózy byly známy, bylo spolehlivě typizováno 50 z 50 případů. Poté v nezávislé validační skupině bylo správně typizováno 40 ze 41 případů a bylo dosaženo 98% citlivosti metody (Vrana *et al.*, 2009). Typizace amyloidu pomocí LMD-LC-MS/MS metody byla úspěšně provedena u renální amyloidózy (Sethi *et al.*, 2012) a amyloidní neuropatie (Klein *et al.*, 2011). Tyto studie prokázaly, že LMD-LC-MS/MS analýza je užitečným nástrojem pro typizaci amyloidóz a v mnohém překonává konvenční imunohistochemickou typizaci.

Cílem experimentální části práce bylo zavést proteomickou metodu pro typizaci amyloidóz z parafinových vzorků tkáně. V rámci práce byla provedena typizace u 40 případů s diagnostikovanou amyloidózou. V této skupině případů bylo zastoupeno 24 mužů a 16 žen. Průměrný věk byl 78 let. U 12 případů byla provedena typizace z parafinovaných vzorků ze dvou odlišných orgánů/tkání. V 11 případech byla typizace amyloidního proteinu totožná z obou orgánů/tkání. Pouze u případu 12 došlo k rozdílné typizaci a výsledná ATTR amyloidóza byla stanovena na základě vyšší hodnoty D-skóre. U zbylých 28 případů byla provedena typizace pouze z jednoho orgánu/tkáně. V celkovém souboru 40 případů byla typizována ve 24 případech ATTR amyloidóza, v 8 případech AL κ amyloidóza, v 6 případech AL λ amyloidóza, v jednom případě AFib amyloidóza a také v jednom případě ACal amyloidóza (Tab. 7, Graf 3). U případu 17 byla typizována AFib amyloidóza, u které byl na základě MS dat identifikován mutovaný peptid (TFPGFFSPMLGEFVSETVSR, 1118.0432 m/z, z = 2+) z fibrinogenu α (Obr. 14). Mutace odpovídá nejčastěji se vyskytující mutaci na fibrinogenu α , která je

asociovaná s AFib amyloidózou. U detekované mutace musí být provedena verifikace na DNA úrovni (Dasari *et al.*, 2014).

Pro vhodnější interpretaci naměřených MS dat pro typizaci amyloidu bylo vypočítáno P-skóre [%] a D-skóre (Sun *et al.*, 2015). P-skóre stanovuje abundanci amyloidních proteinů ve vzorku. Průměrná hodnota P-skóre u všech amyloidních parafinovaných vzorků byla 10,19 %, zatímco u kontrolních (neamyloidních) parafinovaných vzorků byla 1,77 % (Graf 5). Z toho vyplývá, že některé amyloidní proteiny se vyskytují přirozeně ve tkáni, avšak při velmi nízké fyziologické hladině. Laserová mikrodisekce umožnila selektivně zpracovat pouze amyloidní depozita a pomohla tak zvýšit celkový podíl amyloidních proteinů v analyzovaném vzorku v průměru až na 10,19 %. D-skóre stanovuje relativní rozdíl mezi prvním a druhým nejvíce abundantním amyloidním proteinem. Výsledná typizace je spolehlivější, pokud se hodnota D-skóre blíží k 1. Hodnota D-skóre se u amyloidních vzorků pohybovala v rozmezí od 0,14 do 0,90 s průměrem 0,6 (Tab. 10). D-skóre pomohlo rozhodnout výslednou typizaci u případu 12, kdy typizace ze dvou orgánů/tkání vyšla rozdílně (AL λ a ATTR). Hodnoty MS/MS count prvního a druhého nejvíce abundantního proteinu u vzorku (srdce) byly 7 a 6, rozdíl byl minimální, čemuž odpovídala i nízká hodnota D-skóre (0,14). Zatímco u druhého vzorku (srdce paraaortálně) byly hodnoty MS/MS count 82 a 21, rozdíl byl výrazný, čemuž odpovídala i vyšší hodnota D-skóre (0,74), která pomohla při rozhodování ve výsledné typizaci u případu 12 (Tab. 11). Z tohoto důvodu byla nastavena hraniční hodnota D-skóre (0,2), která musí být překročena prospolehlivější výslednou typizaci. Ve 39 případech bylo hodnota D-skóre vyšší než 0,2.

V druhé části experimentální práce byla zavedena proteomická metoda pro typizaci amyloidóz z tukové tkáně. U systémové amyloidózy dochází k ukládání amyloidních proteinů do většiny orgánů a tkání. Tuková tkáň je snadno dostupná a odběr je méně invazivní v porovnání s biopsií srdce či ledviny. Z těchto důvodů bylo zavedeno vyšetření tukové tkáně pro typizaci systémové amyloidózy (Vrana *et al.*, 2014). Byla provedena proteomická analýza tukové tkáně u 5 případů s diagnostikovanou amyloidózou a 5 kontrolních případů. Případy 1, 3 a 4 byly typizovány jako AL λ amyloidózy, což odpovídalo klinické diagnóze. U případu 2 byla typizována AL κ amyloidóza, ale klinická diagnóza byla AL λ amyloidóza. Případ 5 nebylo možné typizovat, jednalo se o lokalizovanou amyloidózu. U kontrol byly identifikovány amyloidní proteiny s velmi nízkou abundancí anebo nebyly identifikovány vůbec amyloidní proteiny (Tab. 12).

Pro vhodnější interpretaci MS dat u typizace amyloidózy z tukové tkáně bylo opět počítáno P-skóre a D-skóre. Hodnota P-skóre u případů s diagnostikovanou amyloidózou se pohybovalo v rozmezí od 0,89 % do 5,95 % s průměrnou hodnotou 2,35 %. U kontrolních vzorků se hodnota P-skóre pohybovala v rozmezí od 0 % do 0,24 % s průměrnou hodnotou 0,05 % (Tab. 13, Graf 8). Z těchto výsledků vyplývá, že některé amyloidní proteiny se vyskytují přirozeně v tukové tkáni, avšak při velmi nízkých fyziologických hladinách. Zvýšená hladina amyloidních proteinů (2,35 %) u systémové amyloidózy potvrzuje výskyt a tvorbu amyloidních depozit v tukové tkáni. Hodnota D-skóre pro případy se systémovou amyloidózou se pohybovala v rozmezí od 0,33 do 0,83 s průměrnou hodnotou 0,6 (Tab. 14). U případu 2 byla falešně typizována AL κ amyloidóza místo AL λ amyloidóza. Hodnoty MS/MS count prvního a druhého nejvíce abundantního proteinu byly 6 a 4, rozdíl byl minimální, čemuž odpovídala i nízká hodnota D-skóre (0,33). Z tohoto důvodu byla nastavena hraniční hodnota D-skóre (0,35), která musí být překročena pro spolehlivější výslednou typizaci. Je nutné vyšetřit více vzorků tukové tkáně pro nastavení optimální hraniční hodnoty D-skóre pro posouzení spolehlivosti výsledné typizace.

8 ZÁVĚR

V diplomové práci byl vypracován teoretický úvod o amyloidózách, klasifikaci amyloidóz, dále byly popsány čtyři nejčastěji se vyskytující amyloidózy a byly shrnuty současné diagnostické přístupy pro typizaci amyloidóz.

V experimentální části diplomové práce byla zavedena proteomická metoda pro typizaci amyloidu z parafinovaných vzorků tkání a metoda pro typizaci amyloidu ze vzorků tukové tkáně. Byla provedena typizace amyloidu u 40 případů z parafinovaných vzorků tkání pomocí laserové mikrodisekce ve spojení s kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (LMD-LC-MS/MS). U dvanácti případů byla současně provedena typizace ze dvou odlišných orgánů/tkání, kde u 11 případů byla shodná typizace amyloidního proteinu. Pro vhodnější interpretaci dat byla počítána P- a D-skóre, která napomohla ve výsledné typizaci amyloidu. Hodnota P-skóre představuje procentuální zastoupení amyloidních proteinů v analyzovaném vzorku. Hodnota D-skóre představuje relativní rozdíl mezi prvním a druhým nejvíce abundantním amyloidním proteinem, čím je hodnota D-skóre blíže 1, tím je výsledná typizace spolehlivější. V souboru 40 případů byla typizována ve 24 případech ATTR amyloidóza, v 8 případech AL κ amyloidóza, v 6 případech AL λ amyloidóza, v jednom případě AFib amyloidóza a také v jednom případě ACal amyloidóza. Dále byla zavedena LC-MS/MS metoda pro typizaci amyloidu z tukové tkáně, jakožto snadno dostupného materiálu pro typizaci systémové amyloidózy. Pomocí této proteomické metody byly správně typizovány 3 ze 4 případů se systémovou amyloidózou. Obě zavedené metody mohou sloužit k typizaci amyloidu u pacientů s amyloidózou nejen ve výzkumu, ale mohou také rozšířit soubor používaných metod v klinické praxi.

9 LITERATURA

Aguzzi, A. (2008): Unraveling prion strains with cell biology and organic chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(1): 11-12.

Bennhold, H. (1922): Specific staining of amyloid by Congo red. *Munchener Medizinische Wochenschrift* 69: 1537-1538.

Benson, M. D. (2003): The hereditary amyloidoses. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 17(6): 909-927.

Ben-Zvi, I., Livneh, A. (2011): Chronic inflammation in FMF: markers, risk factors, outcomes and therapy. *Nature Reviews Rheumatology* 7(2): 105-112.

Brambilla, F., Lavatelli, F., Di Silvestre, D., Valentini, V., Rossi, R., Palladini, G., Obici, L., Verga, L., Mauri, P., Merlini, G. (2012): Reliable typing of systemic amyloidoses through proteomic analysis of subcutaneous adipose tissue. *Blood* 119(8): 1844-7.

Brambilla, F., Lavatelli, F., Merlini, G., Mauri, P. (2013): Clinical proteomics for diagnosis and typing of systemic amyloidoses. *Proteomics Clinical Applications* 7(1-2): 136-143.

Buxbaum, J. N., Tagoe, C., Gallo, G., Walker, J. R., Kurian, S., Salomon, D. R. (2012): Why are some amyloidoses systemic? Does hepatic “chaperoning at a distance” prevent cardiac deposition in a transgenic model of human senile systemic (transthyretin) amyloidosis? *The FASEB Journal* 26(6): 2283-2293.

Caccialanza, R., Palladini, G., Klersy, C., Cena, H., Vagia, C., Cameletti, B., Russo, F., Lavatelli, F., Merlini, G. (2006): Nutritional status of outpatients with systemic immunoglobulin light-chain amyloidosis. *The American journal of clinical nutrition* 83(2): 350-354.

Chiti, F., Dobson, C. M. (2006): Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *The Annual Review of Biochemistry* (75): 333-366.

Connors, L. H., Lim, A., Prokaeva, T., Roskens, V. A., Costello, C. E. (2003): Tabulation of human transthyretin (TTR) variants. *Amyloid* 10(3): 160-184.

Dasari, S., Theis, J. D., Vrana, J. A., Zenka, R. M., Zimmermann, M. T., Kocher, J. P.A., Highsmith, W.E., Kurtin, P.J., Dogan, A. (2014): Clinical proteome informatics workbench detects pathogenic mutations in hereditary amyloidoses. *Journal of proteome research* 13(5): 2352-8.

de Asúa, D. R., Costa, R., Galván, J. M., Filigheddu, M. T., Trujillo, D., Cadiñanos, J. (2014): Systemic AA amyloidosis: epidemiology, diagnosis, and management. *Clinical epidemiology* 6: 369.

De Strooper, B., Vassar, R., Golde, T. (2010): The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* 6(2): 99-107.

Desport, E., Bridoux, F., Sirac, C., Delbes S., Bender, S., Fernandez, B., Quellard, N., Lacombe, C., Goujon, J.M., Lavergne, D., Abraham, J., Touchard, G., Femand, J.P., Jaccard, A. (2012): AL amyloidosis. *Orphanet journal of rare diseases* 7(1): 1-13.

Diociaiuti, M., Macchia, G., Paradisi, S., Frank, C., Camerini, S., Chistolini, P., Gaudio, M., Petrucci, T., Malchiodi-Albedi, F. (2014): Native metastable prefibrillar oligomers are the most neurotoxic species among amyloid aggregates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1842 (9): 1622-1629.

Divry, P., Florin, M. (1927): Sur les propriétés optiques de l'amyloïde. *Comptes rendus Biologies* (97): 1808-1810.

Dogan, A. (2012): Classification of amyloidosis by mass spectrometry-based proteomics. In *Amyloid and Related Disorders: Surgical Pathology and Clinical Correlations*. Picken, M. M., Dogan, A., Herrera, G. A. (eds.). Springer: 261-262.

Dubrey, S. W., Hawkins, P. N., Falk, R. H. (2011): Amyloid diseases of the heart: assessment, diagnosis, and referral. *Heart* 97(1): 75-84.

Dungu, J. N., Anderson, L. J., Whelan, C. J., Hawkins, P. N. (2012): Cardiac transthyretin amyloidosis. *Heart* 98(21): 1546-1554.

Eanes, E. D., Glenner, G. G. (1968): X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 16(11): 673-677.

Falk, R. H., Comenzo, R. L., Skinner, M. (1997): The systemic amyloidoses. *New England Journal of Medicine* 337(13): 898-909.

Gafni, J., Sohar, E. (1960): Rectal biopsy for the diagnosis of amyloidosis. *The American journal of the medical sciences* 240(3): 332-336.

Gilbertson, J., Theis, J., Vrana, J., Lachmann, H., Wechalekar, A., Whelan, C., Hawkins, P., Dogan, A., Gillmore, J. (2015): A comparison of immunohistochemistry and mass spectrometry for determining the amyloid fibril protein from formalin-fixed biopsy tissue. *Journal of clinical pathology* 68(4): 314-317.

Griesbach, H. (1886): Weitere untersuchungen uber azofarbstoffe behufs tinction menschlicher und thierischer gewebe [Further studies of azo dyestuffs as a stain of human and animal tissues]. *Zeitschrift fur Wissenschaftliche Mikroskopie und fur Mikroskopische Technik* (3): 358-385.

Harris, D. L., King, E., Ramsland, P. A., Edmundson, A. B. (2000): Binding of nascent collagen by amyloidogenic light chains and amyloid fibrillogenesis in monolayers of human fibrocytes. *Journal of Molecular Recognition* 13(4): 198-212.

Hazenberg, B. P. (2013): Amyloidosis: a clinical overview. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 39(2): 323-345.

Hazenberg, B. P., van Rijswijk, M. H., Piers, D. A., Lub-de Hooge, M. N., Vellenga, E., Haagsma, E. B., Hawkins, P. N., Jager, P. L. (2006): Diagnostic performance of ¹²³I-labeled serum amyloid P component scintigraphy in patients with amyloidosis. *The American journal of medicine* 119(4): 355-e15.

Hemminki, K., Li, X., Försti, A., Sundquist, J., Sundquist, K. (2012): Incidence and survival in non-hereditary amyloidosis in Sweden. *BMC public health* 12(1): 974.

Jendresen, C. B., Cui, H., Zhang, X., Vlodavsky, I., Nilsson, L. N., Li, J. P. (2015): Overexpression of heparanase lowers the amyloid burden in amyloid- β precursor protein transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry* 290(8): 5053-5064.

- Klein, C. J., Vrana, J. A., Theis, J. D., Dyck, P. J., Dyck, P. J. B., Spinner, R. J., Mauermann, M.L., Bergen, H.R., Zeldenrust, S. R., Dogan, A. (2011): Mass spectrometric-based proteomic analysis of amyloid neuropathy type in nerve tissue. *Archives of neurology* 68(2): 195-199.
- Kyle, R. A., Gertz, M. A. (1995): Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratory features in 474 cases. *Seminars in hematology* (32): 45-59.
- Kyle, R. A., Linos, A., Beard, C. M., Linke, R. P., Gertz, M. A., O'Fallon, W. M., Kurland, L. T. (1992): Incidence and natural history of primary systemic amyloidosis in Olmsted County, Minnesota, 1950 through 1989. *Blood* 79(7): 1817-1822.
- Lachmann, H. J., Gallimore, R., Gillmore, J. D., Carr-Smith, H. D., Bradwell, A. R., Pepys, M. B., Hawkins, P. N. (2003): Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating free immunoglobulin light chains following chemotherapy. *British journal of haematology* 122(1): 78-84.
- Lachmann, H. J., Goodman, H. J., Gilbertson, J. A., Gallimore, J. R., Sabin, C. A., Gillmore, J. D., Hawkins, P. N. (2007): Natural history and outcome in systemic AA amyloidosis. *New England Journal of Medicine* 356(23): 2361-2371.
- Lavatelli, F., di Fonzo, A., Palladini, G., Merlini, G. (2016): Systemic amyloidoses and proteomics: The state of the art. *EuPA Open Proteomics* 11: 4-10.
- Lavatelli, F., Vrana, J. A. (2011): Proteomic typing of amyloid deposits in systemic amyloidoses. *Amyloid* 18(4): 177-182.
- Leung, N., Nasr, S. H., Sethi, S. (2012): How I treat amyloidosis: the importance of accurate diagnosis and amyloid typing. *Blood* 120(16): 3206-3213.
- Linke, R. P. (2000): Highly sensitive diagnosis of amyloid and various amyloid syndromes using Congo red fluorescence. *Virchows Archiv* 436(5): 439-448.
- Linke, R. P. (2012): On typing amyloidosis using immunohistochemistry. Detailed illustrations, review and a note on mass spectrometry. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 47(2): 61-132.

- Merlini, G., Bellotti, V. (2003): Molecular mechanisms of amyloidosis. *New England Journal of Medicine* 349(6): 583-596.
- Mollee, P., Renaut, P., Gottlieb, D., Goodman, H. (2014): How to diagnose amyloidosis. *Internal medicine journal* 44(1): 7-17.
- Mutru, O., Laakso, M., Isomäki, H., Koota, K. (1985): Ten year mortality and causes of death in patients with rheumatoid arthritis. *British Medical Journal* 290(6484): 1797-1799.
- Nienhuis, H. L. A., Bijzet, J., Hazenberg, B. P. (2016): The Prevalence and Management of Systemic Amyloidosis in Western Countries. *Kidney Diseases* 2(1): 10-19.
- Nilsson, K. P. R., Ikenberg, K., Åslund, A., Fransson, S., Konradsson, P., Röcken, C., Moch, H., Aguzzi, A. (2010): Structural typing of systemic amyloidoses by luminescent-conjugated polymer spectroscopy. *The American journal of pathology* 176(2): 563-574.
- Nizhnikov, A. A., Antonets, K. S., Inge-Vechtomov, S. G. (2015): Amyloids: from pathogenesis to function. *Biochemistry (Moscow)* 80(9): 1127-1144.
- Okuda Y, Ohnishi M, Matoba K, Jouyama K, Yamada A, Sawadaa, N., Mokudaa, S., Murataa, Y., Takasugia, K. (2014): Comparison of the clinical utility of tocilizumab and anti-TNF therapy in AA amyloidosis complicating rheumatic diseases. *Modern Rheumatology* (24): 137-43.
- Palladini, G., Russo, P., Nuvolone, M., Lavatelli, F., Perfetti, V., Obici, L., Merlini, G. (2007): Treatment with oral melphalan plus dexamethasone produces long-term remissions in AL amyloidosis. *Blood* 110(2): 787-788.
- Pepys, M. B. (2001): Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 356(1406): 203-211.
- Pepys, M. B., Cookson, L. M., Barton, S. V., Berges, A. C. (2015): Dose-Dependent Progressive Immunotherapeutic Clearance of Systemic Amyloid Deposits By Repeated Doses of Antibody to Serum Amyloid P Component (SAP). *Blood* 126(23): 1836-1836.

- Picken, M. M. (2007): New insights into systemic amyloidosis: the importance of diagnosis of specific type. *Current opinion in nephrology and hypertension* 16(3): 196-203.
- Picken, M. M. (2010): Amyloidosis-where are we now and where are we heading? *Archives of pathology & laboratory medicine* 134(4): 545-551.
- Picken, M. M. (2013): Modern approaches to the treatment of amyloidosis: the critical importance of early detection in surgical pathology. *Advances in anatomic pathology* 20(6): 424-439.
- Pinney, J., Hawkins, P. (2012): Amyloidosis. *Annals of Clinical Biochemistry* 49 (3): 229-241.
- Pinney, J., Smith, C., Taube, J., Lachmann, H., Venner, C., Gibbs, S., Dungu, J., Banypersad, S., Wechalekar, A., Whelan, C., Hawkins, P., Gillmore, J. (2013): Systemic Amyloidosis in England: an epidemiological study. *British Journal of Haematology* 161(4): 525-532.
- Poshusta, T. L., Sikkink, L. A., Leung, N., Clark, R. J., Dispenzieri, A., Ramirez-Alvarado, M. (2009): Mutations in specific structural regions of immunoglobulin light chains are associated with free light chain levels in patients with AL amyloidosis. *PLoS One* 4(4): e5169.
- Puchtler, H., Sweat, F., Levine, M. (1962): On the binding of Congo red by amyloid. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 10(3): 355-364.
- Richards, D. B., Cookson, L. M., Berges, A.C., Barton, S. V., Lane, T., Ritter, J. M., Fontana, M., Moon, J. C., Pinzani, M., Gillmore, J. D., Hawkins, P. N., Pepys, M. B. (2015): Therapeutic Clearance of Amyloid by Antibodies to Serum Amyloid P Component. *The New England journal of medicine* 373(12): 1106-1114.
- Sethi, S., Vrana, J. A., Theis, J. D., Leung, N., Sethi, A., Nasr, S. H., Fervenza, F.C., Cornell, L.D., Fidler, M.E., Dogan, A. (2012): Laser microdissection and mass spectrometry-based proteomics aids the diagnosis and typing of renal amyloidosis. *Kidney international* 82(2): 226-234.

- Shikama, Y., Kitazawa, J. I., Yagihashi, N., Uehara, O., Murata, Y., Yajima, N., Wada, R., Yagihashi, S. (2010): Localized amyloidosis at the site of repeated insulin injection in a diabetic patient. *Internal Medicine* 49(5): 397-401.
- Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S. I., Merlini, G., Saraiva, M. J., Westermark, P. (2014): Nomenclature 2014: amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid* 21(4): 221-224.
- Sipe, J., Cohen, A. (2000): Review: history of the amyloid fibril. *Journal of structural biology* (130): 88-98.
- Steensma, D P. (2001): "Congo red": out of Africa? *Archives of pathology & laboratory medicine* 125(2): 250-2.
- Stevens, F. J., Kisilevsky, R. (2000): Immunoglobulin light chains, glycosaminoglycans, and amyloid. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57(3): 441-449.
- Stöhr, J., Weinmann, N., Wille, H., Kaimann, T., Nagel-Steger, L., Birkmann, E., Panza, G., Prusiner, S.B, Eigen, M., Riesner, D. (2008): Mechanisms of prion protein assembly into amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(7): 2409-2414.
- Sun, W., Sun, J., Zou, L., Shen, K., Zhong, D., Zhou, D., Sun, W., Li, J. (2015): The Successful Diagnosis and Typing of Systemic Amyloidosis Using A Microwave-Assisted Filter-Aided Fast Sample Preparation Method and LC/MS/MS Analysis. *PloS one* 10(5): e0127180.
- Tennent, G. A., Lovat, L. B., Pepys, M. B. (1995): Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(10): 4299-4303.
- Theis, J. D., Dasari, S., Vrana, J. A., Kurtin, P. J., Dogan, A. (2013): Shotgun-proteomics-based clinical testing for diagnosis and classification of amyloidosis. *Journal of Mass Spectrometry* 48(10): 1067-1077.
- Van Horssen, J., Wesseling, P., Van Den Heuvel, L. P., De Waal, R. M., Verbeek, M. M. (2003): Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders. *The Lancet Neurology* 2(8): 482-492.

Vrana, J. A., Gamez, J. D., Madden, B. J., Theis, J. D., Bergen, H. R., Dogan, A. (2009). Classification of amyloidosis by laser microdissection and mass spectrometry-based proteomic analysis in clinical biopsy specimens. *Blood* 114(24): 4957-4959.

Vrana, J. A., Theis, J. D., Dasari, S., Mereuta, O. M., Dispenzieri, A., Zeldenrust, S. R., Gertz, M.O., Kurtin, P. J., Grogg, K. L., Dogan, A. (2014): Clinical diagnosis and typing of systemic amyloidosis in subcutaneous fat aspirates by mass spectrometry-based proteomics. *Haematologica* 99(7): 1239-1247.

Westermarck, G. T., Fändrich, M., Westermarck, P. (2015): AA amyloidosis: pathogenesis and targeted therapy. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (10): 321-344.

Westermarck, P. (2012a): Localized amyloidoses and amyloidoses associated with aging outside the central nervous system. In *Amyloid and Related Disorders: Surgical Pathology and Clinical Correlations*. Picken, M. M., Dogan, A., Herrera, G. A. (eds.). Springer: 81-82.

Westermarck, P. (2012b): Subcutaneous adipose tissue biopsy for amyloid protein studies. In: Sigurdsson, E. M., Calero, M., Gasset, M., (eds.). *Amyloid Proteins*. Humana Press: 363-371.

Yamashita, T., Ando, Y., Okamoto, S., Misumi, Y., Hirahara, T., Ueda, M., Asonuma, K. (2012): Long-term survival after liver transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy. *Neurology* 78(9): 637-643.

<http://www.aomf.ca/index.html> [2016-3-23]

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	kyselina octová
AA	sérový amyloid A
AANF	atriální natriuretický faktor
AApoAI	apolipoprotein AI
AApoAII	apolipoprotein AII
AApoAIV	apolipoprotein AIV
ABri	ABri proteinový prekurzor
ACal	(pro) kalcitonin
ACN	acetonitril
ACor	corneodesmosin
ACys	cystatin C
ADan	ADan proteinový prekurzor
AEnf	enfuvirtid
AFib	fibrinogen α
AGal7	galektin 7
AGel	gelsolin
AH	těžký řetězec imunoglobulinů
AIAPP	ostrůvkový amyloidový polypeptid (amylin)
AIns	insulin
AKer	kerato-epitelin
AL	lehký řetězec imunoglobulinů
ALac	laktoferin
ALECT2	leukocytární chemotaktický faktor 2
ALys	lysozym
AL κ	lehký řetězec imunoglobulinu kappa
AL λ	lehký řetězec imunoglobulinu lambda
AMed	lactadherin
ANS	autonomní nervová soustava
AOAAP	odontogenní protein asociovaný s ameloblastomem
APP	amyloidový prekurzorový protein
APro	prolaktin

APrP	prionový protein
ASem1	semenogelin 1
ASPC	plicní surfaktant
ATTR	transthyretin
A β	A β proteinový prekurzor
A β 2M	β 2-mikroglobulin
CE	kolizní energie
CID	kolizně indukovaná disociace
CJD	Creutzfeldt-Jakobova choroba
CNS	centrální nervová soustava
CPHPC	(R)-1-[6-[(R)-2-karboxy-pyrrolidin-1-yl]-6-oxohexanoyl]pyrrolidin-2-karboxylová kyselina
CR	kongo červen
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
E	kyselina glutamová
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
EL	lyzační pufr
FA	kyselina mravenčí
FAP	familiární amyloidní polyneuropatie
FFPE	formalinem fixovaná parafinovaná tkáň
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrom
H ₂ O	voda
HCl	kyselina chlorovodíková
HFP	hexafluoropropylen
HS	heparan sulfát
HSPG	heparan sulfát proteoglykan
Ig	immunoglobulin
IL-6	Interleukin 6
ISA	Mezinárodní společnost pro amyloidózu
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení hmotnostní spektrometrií
LCOSs	luminiscenční konjugované oligothiofeny
LMD	laserová mikrodisekce

M	methionin
m/z	poměr hmotnosti a náboje
MeOH	metanol
Met	methionin
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
PFOs	předfibrilní oligomery
PNS	periferní nervová soustava
PrP ^c	helikální isoforma prionového proteinu
PrPS ^c	infekční izoforma prionového proteinu
Q	aktivační energie
SAA	sérový amyloid A
SAP	sérový amyloidový P protein
SSA	senilní systematická amyloidóza
TFA	kyselina trifluoroctová
TFE	trifluoroethanol
TNF	tumor nekrotizující faktor
TSE	přenosná spongiformní encefalopatie
TTR	transthyretin
V	valin
Val	valin