

## TERAPEUTIKA AMYLOIDÓZ

MONIKA HOLUBOVÁ a MARTIN HRUBÝ

Ústav makromolekulární chemie, v. v. i., Akademie věd České republiky, Heyrovského nám. 6, 162 06 Praha 6 mhruby@centrum.cz

Došlo 31.5.16, přijato 16.6.16.

Klíčová slova: amyloidóza, amyloid, Alzheimerova choroba

### Obsah

1. Úvod
2. Amyloid
3. Klinicky používané terapie
  - 3.1. Systémové amyloidózy
    - 3.1.1. AL amyloidóza
    - 3.1.2. AA amyloidóza
    - 3.1.3. Dědičné amyloidózy
  - 3.2. Lokalizované formy amyloidózy
    - 3.2.1. Alzheimerova choroba
4. Experimentální terapie
5. Závěr

### 1. Úvod

Amyloidózy jsou onemocnění spojená s ukládáním normálně rozpustných proteinů v podobě nerozpustných amyloidů. Tyto amyloidy se ukládají v různých orgánech a tkáních a způsobují jejich dysfunkci, čímž představují velkou hrozbou pro lidské zdraví<sup>1,2</sup>. Termín „amyloid“ byl poprvé použit v botanice v roce 1838 Matthiasem Schleidenem pro popis rostlinného škrobu, a až poté v roce 1854 Rudolf Virchow tento pojem použil pro abnormální makroskopická ložiska amyloidů, i když už byly známé pod různými jmény od poloviny sedmáctého století. Virchow pomocí vodného roztoku jodu a kyseliny sírové došel k závěru, že látka, která je základem abnormálních ložisek, byla celulóza. Hypotéza celulosového charakteru amyloidu netrvala dlouho. V roce 1859 Friedreich a Kekule prokázali přítomnost proteinu a nepřítomnost sacharidů v amyloidu, což bylo založeno na vysokém obsahu dusíku<sup>2,3</sup>. Bennhold zavedl barvení kongo červení v roce 1922 pro identifikaci amyloidů ve tkáňových vzorcích<sup>4</sup>. V roce 1927 Divry a Florkin popsal charakteristický zelený dvojlo, když byl amyloid obarvený kongo červení pozorován v polarizovaném světle<sup>4</sup>. V roce 1959 Cohen a Calkins

detegovali fibrilární povahu amyloidu při pozorování pod elektronovým mikroskopem<sup>4</sup>. Povaha amyloidu a proteinů se v průběhu let skládala jako puzzle.

Ne všechny amyloidy jsou však škodlivé. Existují tzv. funkční amyloidy určitých proteinů, které se využívají např. u savců pro tvorbu melaninu<sup>5</sup>, u bakterií *Escherichia coli* k tvorbě biofilmu<sup>6</sup> apod. Vysoká stabilita, organizovanost a nanometrické rozměry amyloidů z nich dělají vynikající kandidáty pro výrobu nanomateriálů (např. dráty, gely, scaffoldy, tekuté krystaly atd.) za pomoci strategie „bottom-up“<sup>7</sup>. Využití amyloidových fibril jako nových biomateriálů nebo nalezení léku na amyloidózy vyžaduje lepší pochopení nejen molekulárních mechanismů skládání amyloidů, ale i řady dalších faktorů spojených s tvorbou amyloidů<sup>1</sup>.

Každá depozice proteinu, ať už fibrilární nebo nefibrilární, se vyznačuje specifickým proteinem, který tvoří hlavní složku patologického ložiska. V případě amyloidů u člověka je popsáno 27 extracelulárních proteinů, které mohou tvořit amyloid, v nichž je daný protein spojen se specifickým onemocněním<sup>8,9</sup>. Současná nomenklatura amyloidů je založena na chemické struktuře fibrilárního proteinu, který začíná písmenem A (amyloid) a k němu je připojena přípona, která je zkrácenou formou prekurzorového proteinu, např. amyloid odvozen od lehkých řetězců imunoglobulinu je označen jako AL a nemoc je AL amyloidóza<sup>9,10</sup>. Amyloidy proteinů popsané u lidí jsou vypsány v tab. I.

Některé amyloidózy mohou být systémové (týkající se několika orgánů či tkáni) nebo lokalizované (týkající se pouze jednoho orgánu nebo tkáně). Systémové formy amyloidů mohou být primární, jedná se o formy sporadické nebo získané (př. AL amyloidóza). Dále mohou být systémové formy amyloidů sekundární, tedy ty, které vznikly na základě dalšího onemocnění (př. AA amyloidóza), nebo dědičné (př. ATTR amyloidóza). Lokalizované formy amyloidů mohou být také sporadické nebo získané (př. AL amyloidóza močových cest a Alzheimerova choroba), sekundární (např. infekční Creutzfeldt-Jakobova nemoc), nebo dědičné (př. mnoho dystrofií rohovky, dědičná Alzheimerova choroba)<sup>8</sup>.

### 2. Amyloid

Všechny amyloidy mají společných několik fyzikálně-chemických vlastností: fibrilární morfologie, převažuje sekundární struktura  $\beta$ -skládaný list („ $\beta$ -sheet“), dvojlo po obarvení barvivem kongo červení, nerozpustnost v běžných rozpouštědlech a detergentech a odolnost proti proteasám. Sekvence aminokyselin a struktura proteinů spojených s amyloidózou je vysoce variabilní<sup>11</sup>. Některé amyloidogenní proteiny ve svých rozpustných stavech vytváří

Tabulka I  
Lidské amyloidy a jejich proteinové prekurzory<sup>9</sup>

Amyloid	Prekurzorový protein	Systémové (S) nebo lokalizované (L)	Syndrom nebo zúčastněné tkáně
AL	imunoglobulinové lehké řetězce	S,L	primární spojená s myelomem
AH	imunoglobulinové těžké řetězce	S,L	primární spojená s myelomem
A $\beta$ <sub>2</sub> M	$\beta$ <sub>2</sub> -mikroglobulin	S L	spojená s hemodialýzou klouby
ATTR	transthyretin	S	dědičné senilní systémová
AA	sérový amyloid A	L S	tendosynovitida sekundární, reaktivní
AApoAI	apolipoprotein AI	S L	dědičné aorta, meniskus
AApoAII	apolipoprotein AII	S	dědičné
AApoAIV	apolipoprotein AIV	S	sporadická, spojené se stárnutím
AGel	gelsolin	S	dědičné (finské)
ALys	lysozym	S	dědičné
AFib	fibrinogen $\alpha$ -řetězce	S	dědičné
ACys	cystatin C	S	dědičné
ABri	ABriPP	S	familiární demence, britské
ALect2	leukocytární chemotaktický faktor 2	S	hlavně ledviny
ADan	ADanPP	L	familiární demence, dánské
A $\beta$	amyloidový prekurzorový protein (APP)	L	Alzheimerova choroba, stárnutí
APrP	prionový protein	L	spongiformní encefalopatie
ACal	pokalcitonin	L	tumory C buněk štítné žlázy
AIAPP	amylin (amyloidový polypeptid Langerhansových ostrůvků)	L	Langerhansovy ostrůvky inzulinom
AANF	atriální natriuretický faktor	L	srdce
APro	prolaktin	L	stárnutí hypofýzy prolaktinom
AIns	insulin	L	iatrogenní poškození
AMed	laktadherin	L	aorta (hl. média)
AKer	kerato-epitelin	L	rohovka, dědičné
ALac	laktoferin	L	rohovka
AOaap	ODAM (odontogenic ameloblast-associated protein)	L	odogenní nádory
ASemI	semonogelin I	L	semenné vajíčky

globulární strukturu (př. transthyretin TTR). Ukázalo se, že tyto proteiny musí být částečně rozvinuty, aby došlo k vytváření fibril. V těchto případech většina amyloidogenních mutací destabilizuje globulární strukturu, čímž se

zvýší koncentrace v ustáleném stavu částečně složených globulárních proteinů a podpoří se tvorba fibril. U proteinů, které nejsou amyloidogenní *in vivo*, se ukázalo, že je lze přimět k tvorbě fibril, pokud je protein vysta-

ven částečným denaturačním podmínkám, které napodobí účinek destabilizující mutace. To naznačuje tomu, že schopnost vytvářet fibrily je obecnou vlastností, kterou sdílí mnoho proteinů a projeví se pouze při podmínkách částečné denaturace. Na rozdíl od globulárních proteinů se mnoho amyloidogenních proteinů v jejich nativním rozpustném stavu vyskytuje ve formě náhodného klubka (např. APP). Tyto proteiny mohou zaujmout metastabilní konformaci, ve které musí být optimální obsah  $\alpha$ -helixů, aby se upřednostnil přechod od náhodného klubka do struktury  $\beta$ -skládaného listu v průběhu fibrilace<sup>12</sup>.

Jak bylo napsáno výše, amyloidy mají fibrilární strukturu. Tyto fibrily s proměnlivou délkou jsou rigidní a nevětvené a jejich průměr je 7–12 nm (cit.<sup>2,13</sup>). Amyloidní fibrily jsou složeny nejméně ze dvou vláknitých podjednotek tzv. protofilament, které se stáčí podél osy fibrily<sup>13</sup>. Protofilamenty mají průměr 2,5–3,5 nm a skládají se z několika antiparalelních  $\beta$ -skládaných listů, které se zvolna stáčí podél osy protofilamentu a vytvářejí spirálovou strukturu<sup>2,14</sup>. Základní jednotkou  $\beta$ -skládaného listu je tzv.  $\beta$ -řetězec („ $\beta$ -strand“), který je úsekem polypeptidového řetězce a je kolmý k ose protofilamentu<sup>14</sup>. Této struktuře se říká „cross- $\beta$ “<sup>15</sup>.

Tvorba amyloidu obvykle zahrnuje kombinaci několika faktorů, jako jsou zvýšená a dlouhodobá distribuce proteinu a/nebo náchylnost proteinu tvořit strukturu  $\beta$ -skládaného listu, což může být způsobeno mutací i denaturujícími prostředí nebo může být tato vlastnost získána během proteolytického štěpení<sup>10</sup>. Amyloidogenní protějšky proteinů jsou syntetizovány a sekretovány jako nativní proteiny, ale systém intracelulární kontroly je za normálních okolností schopen je rozpoznat a odstranit. Vně buňky dojde nakonec k rovnovážnému stavu mezi zcela složenými a částečně složenými (amyloidogenními) formami proteinů. Fluktuační koncentrací obou forem je vysoká. Existuje řada faktorů, které mohou posunout rovnováhu směrem k částečně složeným stavům, např. nízké pH, oxidace, zvýšení teploty nebo ionty kovů<sup>16</sup>. K tvorbě amyloidu dochází obecně díky oligomeraci jader, které zároveň tvorbu amyloidu i urychlují. Po nukleaci dochází k rychlému růstu fibril. Některé případy tvorby amyloidních fibril mohou vyžadovat proteolýzu, při které dojde k uvolnění amyloidogenního proteinu. V tomto případě jde o tzv. fragmenty prekurzorového proteinu (fibrilogenní peptid). Obvykle je citlivost proteolytického prekurzoru k vytváření fragmentů pro amyloidní fibrily způsobena mutací, tato mutace je nezbytná pro štěpení proteinu *in vivo*<sup>12</sup>.

Pro studium procesu fibrilace se obvykle pro zjednodušení používá krátkých peptidů, jelikož se jedná o velice složitý proces. Ukázalo se, že i relativně krátké peptidy, které jsou určitými fragmenty určitého prekurzorového proteinu, mají schopnost vytvářet typické amyloidní fibrily. Malá velikost peptidů snížila složitost tvorby amyloidu a zároveň umožnila získat fyzikálně-chemický pohled na mechanismus tvorby fibril. Typickým společným rysem krátkých peptidů, které mohou tvořit amyloidní fibrily, je vysoký výskyt aromatických aminokyselinových zbytků<sup>17</sup>. Význam aromatických kruhů při vytváření amyloidu byla

prokázána u mnoha peptidů. Navíc jsou tyto interakce důležité v mnoha oblastech strukturální biologie, včetně vytváření hydrofóbních jader proteinů dávající stabilitu terciární struktury, „host-guest“ interakce, porfyrinové agregace v roztoku a stabilizace DNA bázi<sup>18</sup>. Navrhovaná role aromatických interakcí při tvorbě fibril souvisí se zjištěním, že struktura amyloidních fibril se podobá  $\beta$ -helikální struktuře, kde je jeden nebo více  $\beta$ -skládaných listů stočených šroubovitým způsobem kolem jádra<sup>19</sup>. Jednou z hlavních vlastností  $\beta$ -helixu je vrstvení podobných reziduí na plochý  $\beta$ -skládaný list.

Další významné interakce v agregaci a stabilizaci amyloidních fibril jsou hydrofóbní<sup>20</sup>. Substituce aminokyselin v sekvenci, která hraje klíčovou roli v chování celé sekvence, může snížit (nebo zvýšit) sklon k agregaci při snížení (nebo zvýšení) hydrofobicity<sup>20,21</sup>. Existují důkazy, že proteinové sekvence se vyvinuly, aby se předešlo shlukům hydrofóbních zbytků (např. skupiny tří nebo více po sobě následujících hydrofóbních zbytků jsou méně časté v proteinových sekvencích<sup>21</sup>). Další vliv na agregaci a stabilizaci mají elektrostatické interakce<sup>20</sup>. V případech, kdy je protein vysoce nabitý, je agregace proteinů energeticky nepříznivá. Pokud mají proteiny kladné a záporné nabití skupiny na povrchu, může to vést k agregaci<sup>20,22</sup>.

Kromě prekurzorového proteinu byl v amyloidech různých amyloidóz nalezen sérový amyloidový protein (SAP), glykosaminoglykany (hlavně heparansulfát) a apolipoprotein E (cit.<sup>2,16</sup>). SAP je pentamerní globulární glykoprotein, který se váže reverzibilně do amyloidních fibril v závislosti na koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  a je univerzální složkou amyloidů. SAP tvoří od 12 % do 20 % sušiny amyloidu. SAP je normální protein plazmy, který je spolu s C-reaktivním proteinem produkován v játrech. SAP je klíčová komponenta vrozené imunity a zánětu a může také vytvářet amyloidní fibrily, čímž způsobí sekundární amyloidózu vzniklou po zánětu. Nefibrilární forma SAP se velmi ochotně přidružuje k amyloidním fibrilám. Role SAP v amyloidu není zcela známa, ale zdá se, že má zabránit degradaci amyloidních fibril proteolytickými enzymy.

U glykosaminoglykanů bylo prokázáno, že podporují agregaci amyloidogenních proteinů. Přesný mechanismus interakce je nejasný, ale podle jedné z teorií glykosaminoglykany jako polyanionty hrají důležitou roli v katalýze agregace proteinu a ve stabilizaci amyloidových fibril. Tato teorie je podpořena faktem, že jiné polyanionty (např. ATP, heparin) jsou také schopny podporovat agregaci amyloidových fibril. I když přesná role a vzájemné působení těchto složek nejsou dobře známé, je pozoruhodné, že *in vitro* může být amyloid vytvořen bez pomoci glykoproteinů a glykosaminoglykanů, což přispívá k nejasné roli v patogenezi amyloidu<sup>2</sup>. Podobná situace je i u apolipoproteinu E, u kterého také není zcela známa jeho role v patogenezi amyloidu<sup>2</sup>.

Amyloidy mají cytotoxické účinky, kterými jsou např. indukované selhání autofágie, zvýšení úrovně reaktivních forem kyslíku (ROS), mitochondriální dysfunkce, průchodnost buněčné membrány, dyshomeostase vápníku, nebo ztráta funkce proteinu po agregaci<sup>23,24</sup>.

### 3. Klinicky používané terapie

#### 3.1. Systémové amyloidózy

Léčba amyloidózy závisí na typu, distribuci a biologických efektech ložisek amyloidů<sup>25</sup>. Prognóza systémové amyloidózy je často infaustní, ale nedávné pokroky značně zvýšily medián přežití. V současné době je léčba ve většině případů zaměřena na snížení dodávání prekurzorového proteinu a zároveň na podporu nebo výměnu funkce orgánu. Za příznivých okolností to vede k regresi existujících amyloidových depozit, zachování nebo obnově funkce postižených orgánů a delšímu přežití pacientů<sup>26</sup>. Důležité také je, aby byla amyloidóza diagnostikována včas a léčba byla zahájena co nejdříve, aby brzy došlo ke stabilizaci onemocnění a zabránilo se pokračující progresi<sup>4</sup>.

##### 3.1.1. AL amyloidóza

AL amyloidóza je nejčastějším typem systémové amyloidózy diagnostikované v rozvinutém světě. Hlášený výskyt 5–12 případů na milion ročně je velmi pravděpodobně podhodnocený, protože *post mortem* údaje naznačují, že je to příčina smrti ~1 z 1500 lidí ve Velké Británii. Vyhledky pro neléčenou AL amyloidózou jsou špatné s mediánem přežití pouze 6–15 měsíců a desetiletá míra přežití je méně než 5 %. Onemocnění může být spojeno s jakoukoli poruchou monoklonálních B-lymfocytů. Současná léčba si klade za cíl potlačit proliferaci klonů B-lymfocytů a tedy i produkci amyloidogenního proteinu pomocí chemoterapie původně vyvinuté pro nádorová onemocnění. Existují však vedlejší faktory ovlivňující efektivitu léčby<sup>19</sup>: (1) Chemoterapeutické režimy jsou založeny na těch, které se používají u mnohočetného myelomu, ale dyskrázie plazmatických buněk u většiny pacientů s AL amyloidózou jsou relativně nízkého stupně a mohou být méně chemosenzitivní<sup>25,26</sup>. (2) Diagnóza je obtížná, často zjištěna pozdě, kdy už mnoho pacientů má nemoc v pokročilém stadiu, které omezuje použití chemoterapie, jelikož dochází k poškození imunity kvůli nízké hladině protilátka. (3) Regrese amyloidu je postupný proces, který nevede k měřitelnému klinickému přínosu po dobu mnoha měsíců nebo dokonce let, pokud dojde k úspěšnému potlačení buněčné dyskrázie<sup>26</sup>.

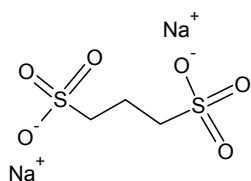
Výběr léčby je obtížný. V polovině 90. let se ukázalo, že malé dávky melfalanu a prednisonu podávaných ústně vedou k malému zlepšení a medián přežití vzroste ze 7–8 měsíců na 12–18 měsíců<sup>26</sup>. Vysoké dávky melfalanu podávaného intravenózně s transplantací autologních kmenových buněk je široce používáno k léčbě systémové AL amyloidózy, zejména ve Spojených státech s mediánem přežití 4,6 let. Bohužel, tato forma léčby je doprovázena vysokou úmrtností související s léčbou 12 až 13 % ve zkušebních centrech. V multicentrálních sériích je popsána úmrtnost dokonce 25–43 % (cit.<sup>19</sup>). Zjištěné rizikové faktory pro úmrtnost související s léčbou zahrnují zapojení více orgánů, celkový špatný stav pacienta a pokročilý věk<sup>26,27</sup>. Pečlivým výběrem pacientů, založeným také na základě hodnocení srdeční dysfunkce, výrazně

snížilo úmrtnost v souvislosti s léčbou<sup>21</sup>. Jiné přístupy v léčbě AL amyloidózy jsou založeny na vysokých dávkách na bázi dexamethasonu v kombinaci s melfalanem, cyklofosfamid-thalidomidem a thalidomidem<sup>27</sup>. V současné době neexistuje žádný způsob, jak určit, jak budou konkrétní jednotlivci snášet léčbu. Prekurzorový protein může být nyní sledována u více než 90 % pacientů a chemoterapie může být odpovídajícím způsobem přizpůsobena. Trvalé snížení sérové koncentrace volných monoklonálních lehkých řetězců snižuje ukládání amyloidu a potlačení o více než 50 % a je spojeno se zvýšenou dobou přežití<sup>26</sup>.

Diskutabilní léčbou je transplantace orgánu v případě AL amyloidózy vzhledem multisystémové povaze této nemoci a riziku recidivy transplantovaného štěpu. Transplantace orgánů se proto u AL amyloidózy provádí zřídka<sup>28</sup>.

##### 3.1.2. AA amyloidóza

Reaktivní systémová AA amyloidóza je možnou komplikací jiných onemocnění, které vedou ke vzniku trvalé odpovědi akutní fáze. Takové spouštěče jsou např. chronická zánětlivá, infekční nebo nádorová onemocnění, jako jsou revmatoidní artritida, tuberkulóza, HIV/AIDS, cystická fibróza, Crohnova nemoc apod. Biopsie *post mortem* naznačují, že prevalence AA amyloidu u pacientů s chronickým zánětlivým onemocněním je 3,6 až 5,8 %. AA amyloidní fibrily jsou odvozeny z fragmentů cirkulujícího reaktantu akutní fáze sérového amyloidu A (SAA). Přestože AA amyloidóza se může rozvinout rychle, medián latence mezi přítomností chronického zánětlivého onemocnění a klinicky významnou amyloidózou je téměř dvacet let. AA amyloidóza se obvykle projevuje proteinurií, následovanou progresivní renální dysfunkcí často doprovázenou nefrotickým syndromem. Jaterní postižení a autonomní neuropatie se obvykle vyskytuje v pokročilejší fázi nemoci. Prognóza AA amyloidózy závisí na míře poruchy funkce ledvin a jde-li předcházející zánětlivé onemocnění potlačit<sup>26</sup>. Léčba AA amyloidózy začíná kontrolou zánětlivého stavu, což není vždy snadné, ale bylo prokázáno, že protizánětlivé a cytotoxické terapie mají určitou účinnost. Pozitivních výsledků bylo dosaženo podáváním chlorambucilu u pacientů s juvenilní revmatoidní artritidou. Azathioprin se zase často používá ke zpomalení onemocnění u dospělých pacientů s revmatoidní artritidou<sup>29</sup>. Metotrexát<sup>4</sup> a zejména nové biologické léky (př. anakinra<sup>4</sup>, tocilizumab<sup>4</sup>) zacílené na cytokinové mediátory zánětu (např. TNF a IL-1), silně potlačují reakce akutní fáze u mnoha pacientů např. s revmatoidní artritidou a Crohnovou nemocí. Léčba kolchicinem je povinná u familiární středomořské horečky, aby se zabránilo AA amyloidóze. Excise lymfatické tkáně produkující IL-6 u Castlemanovy nemoci, kterou komplikuje AA amyloidóza, vede ke zmírnění příznaků a usnadňuje regresi amyloidu<sup>26</sup>. Pro léčbu onemocnění ledvin u AA amyloidózy se používá eprodisát sodný. Jedná se o 1,3-propandisulfonát sodný (viz obr. 1), který má strukturu podobnou heparansulfátu. Eprodisát se kompetitivně váže na vazebná místa pro glykosaminoglykany na SAA a inhibuje tvorbu



Obr. 1. Chemická struktura eprodisátu sodného

fibril a ukládání amyloidu<sup>30</sup>.

Sníží-li se dodávání SAA po delší dobu, ložiska AA amyloidů často ustoupí a renální funkce se můžou zlepšit a doba přežití je dlouhodobá. V případě, že odpověď akutní fáze stále pokračuje, postupné ukládání amyloidů má často za následek selháním ledvin. U jedinců s pokročilým onemocněním ledvin nemusí být dostatečné dokonce i kompletní potlačení jejich zánětlivého onemocnění, aby se zachovala funkce jejich ledvin, a ve všech případech je poškození ledvin urychleno hypertenzí<sup>26</sup>.

### 3.1.3. Dědičné amyloidózy

Dědičné systemické amyloidózy jsou autosomálně dominantní onemocnění, ve kterých jsou amyloidní fibrily odvozené od genetických variant např. transthyretinu (TTR), apolipoproteinu AI, AII, lysosomu, gelsolinu nebo fibrinogenu. V případech, kdy je varianta amyloidogenního proteinu pouze nebo převážně syntetizována v játrech, může být efektivní léčbou transplantace jater. Tato forma „genové chirurgické terapie“, byla úspěšně použita u mnoha pacientů s dědičnou amyloidní polyneuropatií (FAP), která je spojena s genetickou variantou TTR, a také se ukázala účinná u pacientů s AFib a AApoAI amyloidózou<sup>26</sup>. Játra explantované od pacientů s FAP obsahují pouze mikroskopické amyloidní ložiska v cévách a nervech a jinak se onemocnění neúčastní<sup>31</sup>. Taková játra nabízí možnost opětovného použití pro tzv. domino transplantaci pro pacienty s chorobami jater v konečném stádiu, pro které zdravá játra nebyla k dispozici<sup>26</sup>. Avšak existují případy, kdy došlo po několika letech k vývoji systematické FAP. I když dárci jater s FAP zůstávají cenným zdrojem, tato data ukazují, že je potřeba přísného dlouhodobého sledování příjemců<sup>31</sup>.

## 3.2. Lokalizované formy amyloidózy

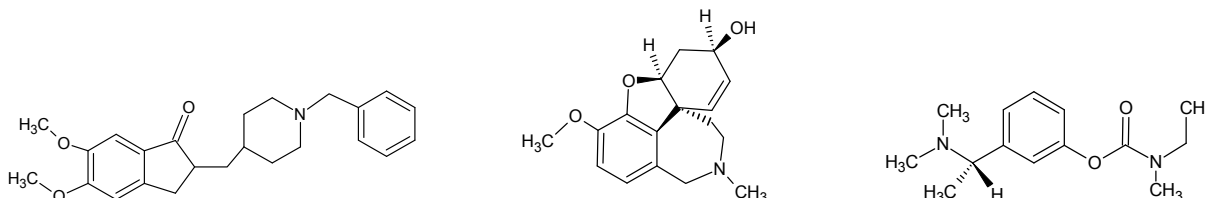
U ložisek amyloidu, která se vyskytují v izolovaných oblastech (např. močový měchýř nebo dýchací cesty), může zpomalit postup tohoto onemocnění radioterapie. Další možnou léčbou je chirurgické odstranění ložisek. V případě lokálního způsobu terapie je kontrola nemoci úspěšná a je neobvyklé, aby pacient zemřel na amyloidózu<sup>2,10</sup>. Problém nastává, když jsou amyloidní ložiska soustředěna v centrální nervové soustavě (CNS), v těchto případech není efektivní léčba. Jedna z nejběžnějších forem amyloidóz postihující CNS je Alzheimerova choroba<sup>32</sup>.

### 3.2.1. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je nejčastější příčinou demence. Podle Světové zdravotnické organizace 37 milionů lidí na celém světě v současné době trpí demencí a Alzheimerova choroba postihuje asi 18 milionů z nich. Vyšší věk je největší rizikový faktor pro AD. Její prevalence se přibližně zdvojnásobuje každých pět let po dosažení 60 let (cit.<sup>33</sup>). Současná léčba AD řeší symptomy onemocnění<sup>34</sup>. Snahy o snížení produkce amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ) jsou v experimentálním stádiu<sup>35</sup>. V současné době existují dva druhy léků schválených pro léčbu symptomů: (1) Inhibitory acetylcholinesterasy (IACHe) prodlužují účinek acetylcholinu v synapsích tím, že brání jeho degradaci. Tato strategie má za následek zlepšení kognitivních funkcí, nálady a chování. (2) Antagonista *N*-methyl-D-asparagové kyseliny (NMDA) memantin, u kterého se předpokládá, že pomáhá regulovat hladinu neurotransmiteru glutamátu, který je nezbytný např. pro paměť<sup>33</sup>.

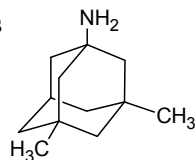
IACHe jsou první linií prostředků použitých pro léčbu a nasazení těchto inhibitorů je doporučeno okamžitě po určení diagnózy AD. IACHe jsou určeny pro lehké až středně těžké formy AD<sup>33,34,36,37</sup>. Prvním IACHe byl tacrin, který byl schválen v roce 1993, ale jedním z vedlejších účinků tohoto léčiva byla výrazná hepatotoxicita<sup>33</sup>. Používanými IACHe v současné době jsou donepezil, galantamin a rivastigmin (viz obr. 2).

Donepezil a galantamin inhibují selektivně acetylcholinesterasu. Galantamin navíc ještě zlepšuje cholinergní přenos tím, že působí jako ligand na nikotinový acetylcholinový receptor, což vede ke zvýšení presynaptického uvolňování acetylcholinu a postsynaptického přenosu nervových vzruchů. Rivastigmin inhibuje kromě acetylcholi-

Obr. 2. Zleva chemická struktura donepezilu, galantaminu a rivastigminu<sup>39</sup>

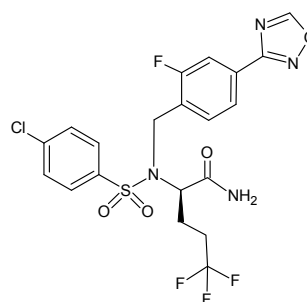
nesterasy také butyrylcholinesterasu, která tvoří asi 10 % z celkového množství cholinesteras v lidském mozku a je spojena především s gliemi<sup>34</sup>. V průběhu postupu AD se aktivita acetylcholinesterasy snižuje, zatímco aktivita butyrylcholinesterasy se stabilizuje a dokonce zvyšuje. Ukazuje se, že butyrylcholinesterasa může působit jako vyrovnávací mechanismus pro metabolismus acetylcholinu<sup>34,38</sup>. I když zmiňovaný donepezil, galantamin a rivastigmin patří do stejné skupiny léčiv, jejich farmakologie a farmakokinetika se od sebe liší. Donepezil je piperidinový derivát, který nekompetitivně a reverzibilně inhibuje acetylcholinesterasu. Jeho poločas eliminace je přibližně 70 h, a proto se podává jednou denně. Rivastigmin je pseudoireverzibilní inhibitor acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy a je hydrolyzován esterasami. Jeho kratší poločas eliminace vyžaduje dávkování dvakrát denně. Galantamin je selektivně reverzibilní inhibitor acetylcholinesterasy a je pozitivním modulátorem nikotinových acetylcholinových receptorů. Jeho poločas eliminace je přibližně 5 h, a proto jsou zapotřebí dvě dávky denně<sup>34</sup>. Ukazuje se, že IACHe jsou obecně dobře snášeny, ale mohou se vyskytnout nežádoucí účinky jako je nevolnost, zvracení, nechutenství a bradykardie<sup>33,36</sup>.

Glutamát je hlavní excitační neurotransmiter v CNS a má úlohu v neurotransmisí. Glutamátové receptory se dělí na *N*-methyl-D-asparagové (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalonové (AMPA) a kainátové. NMDA receptor má složitou strukturu s několika vazebnými místy pro NMDA a glutamát. Aktivace NMDA receptoru generuje dlouhotrvající příliv  $\text{Ca}^{2+}$  do neuronů, což je podstatou toho, aby došlo k zapojení dlouhodobé potenciace buněčného procesu, který je základem učení a paměti. U patogeneze, která představuje nárůst extracelulárního glutamátu, se předpokládá, že vede k nadměrné aktivaci NMDA receptorů s následnou intracelulární akumulací  $\text{Ca}^{2+}$ . Akumulace vápníku pak iniciuje kaskádu dějů, které mají za následek smrt neuronů. Memantin je adamantiový derivát (viz obr. 3)<sup>36</sup> a NMDA antagonist, který může chránit neurony před glutamátem zprostředkovanou excitotoxicitou, aniž by došlo k zabránění fyziologické aktivace NMDA receptoru. Memantin je první schválený lék pro léčbu středně těžké až těžké AD<sup>33</sup> a je obecně dobře snášen<sup>34</sup>, z nežádoucích účinků se objevují závratě, bolest hlavy a nespavost<sup>36,37</sup>. Lék je často používán s IACHe<sup>34,36</sup>.

Obr. 3. Chemická struktura memantinu<sup>40</sup>

#### 4. Experimentální terapie

Lepší pochopení mechanismů, které jsou základem vytváření a perzistence amyloidu, definovalo řadu nových směrů pro léčebné postupy amyloidózy<sup>35</sup>. Jedním z velice

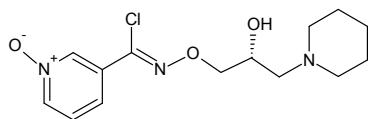


Obr. 4. Chemická struktura BMS-708163

rizikových faktorů pro rozvoj nemoci je zvýšená koncentrace amyloidogenního proteinu. Toto platí pro přirozeně se vyskytující proteiny, které se mohou abnormálně hromadit při patologických stavech (např. A $\beta$  ve sporadických formách AD) a také abnormální formy nativních proteinů patologicky generovaných buď specifickými enzymy (např. hyperfosforylované tau proteiny při tauopatii), nebo v důsledku mutací kódovaných genů<sup>24</sup>.

Inhibice enzymů štěpící prekurzorový protein na fragmenty proteinu představuje jeden z terapeutických přístupů prevence patologického hromadění a agregace amyloidogenních proteinů. Příkladem je A $\beta$ , který vzniká z glykoproteinu APP postupným působením dvou enzymů  $\beta$ -sekretasy (BACE-1) a  $\gamma$ -sekretasy. Naopak od  $\alpha$ -sekretasy, která štěpí APP v A $\beta$  oblasti a zabraňuje tvorbě A $\beta$ . V tomto případě inhibice BACE-1, aktivace  $\alpha$ -sekretasy a inhibice  $\gamma$ -sekretasy mohou být použity jako potenciální terapeutické přístupy k prevenci akumulace A $\beta$  (cit.<sup>24</sup>). Nicméně jejich úplná inhibice může vést k závažným vedlejším účinkům, jelikož mají další substráty, které jsou spojeny s buněčnými procesy, proto je vhodnější vyvážená inhibice. Příkladem inhibitoru  $\gamma$ -sekretasy je BMS-708163 (viz obr. 4), který se dostal do fáze klinických testů<sup>24</sup>.

Další slibnou strategií pro zablokování agregace je inhibice konformačního přechodu, který zahrnuje: 1) stabilizaci nativní konformace proteinu (např. indukce fyziologických chaperonů), 2) zásahy do procesu přechodu (např. inhibitory na bázi peptidů a malých molekul) a 3) inhibice indukující látky (např. inhibice patologických chaperonových molekul)<sup>24</sup>. Úkolem chaperonů je zprostředkovat správné sbalení proteinů a usnadnit přenos špatně složeného proteinu do proteazomu k degradaci. Z tohoto důvodu molekulární aktivace chaperonu může zvýšit přirozenou schopnost buňky přemoci poškozené nebo špatně složené proteiny. Jako příklad lze uvést Hsp70 (heat shock protein 70), který je schopen interagovat s rozpustnými  $\alpha$ -synukleinovými monomery zamezením jejich oligomerizaci. Látka, která aktivuje odezvu na Hsp (pravděpodobně Hsp70), je arimoclomol (viz obr. 5) a výrazně oddaluje progresy onemocnění amyotrofické laterální sklerózy na

Obr. 5. Chemická struktura arimoclomolu<sup>24</sup>

modelu myši, a to i v případě, že byla léčba zahájena po nástupu příznaků<sup>24,41</sup>.

Stabilizace prekurzorových proteinů může být dosažena pomocí proteinů nebo malých molekul, které se vážou na prekurzorový protein, inhibují jeho nežádoucí konformační změny a následnou agregaci<sup>41</sup>. Protein blokujiící určitý cílový amyloidogenní protein se skládá z modifikované základní sekvence cílového proteinu, která vykazuje vysokou afinitu pro cílový protein a není schopná organizace do  $\beta$ -skládaného listu<sup>24</sup>. Teorie aromatických interakcí jako hnací síly pro tvorbu amyloidu hraje roli ve vývoji malých molekul inhibitorů<sup>17</sup>. Bylo prokázáno, že některé polyfenoly dokáží významně inhibovat tvorbu fibrilárních sestav *in vitro* a jejich následnou cytotoxicitu<sup>23,41,42</sup>. Polyfenoly, zejména pak fenolické kyseliny a flavonoidy, rovněž působí jako lapače volných radikálů a prokázaly se u nich prospěšné účinky při chronickém a degenerativním onemocnění. Ukazuje se, že řada polyfenolů inhibuje tvorbu amyloidů *in vitro*<sup>42</sup> (např. apomorfín inhibuje tvorbu amyloidů *in vitro*<sup>42</sup> (např. apomorfín inhibuje tvorbu amyloidů *in vitro*<sup>42</sup>), kurkumin inhibuje TTR fibrilaci<sup>43</sup>). Pro inhibici mechanismu tvorby amyloidních fibril malými polyfenolickými molekulami jsou dva předpoklady: (1) Specifická strukturální konformace je nezbytná pro interakci  $\beta$ -skládaných listů a stabilizaci komplexu s inhibítorem proteinu. (2) Aromatické interakce mezi fenolickými sloučeninami v molekule inhibitoru a aromatických zbytků (hlavně fenylalaninu) v sekvenci může nasměrovat inhibitor na amyloidogenní jádra, čímž se usnadní interakce a zabrání se následně tvorbě fibril<sup>23</sup>. Jinou látkou, která má silný inhibiční účinek konkrétně na agregaci A $\beta$ 40 peptidu, je aniontový polyelektrolyt poly(4-styrenulfonát)<sup>44</sup>.

Další strategie v oblasti léčby je za pomoci inhibice patologických chaperonových molekul. Termín patologické chaperony zavedli Wisniewski a Frangione pro popis skupiny proteinů, které aktivně podporují konformační přechody specifických proteinů pro určité onemocnění a stabilizují konformace, které jsou náchylné pro agregaci. Příkladem patologického chaperonu pro A $\beta$  agregaci v AD je E4 isoforma apolipoproteinu E. Navrhované strategie v této oblasti jsou soustředěna na vývoj buď chaperonových mimetik (sloučeniny podobné chaperonovým molekulám, které by se přednostně vážaly na agregující peptid a bránily by jim reagovat s patologickými chaperony), nebo rozpustná netoxická peptidová analoga (které napodobují interagující sekvenci, ale nejsou schopné se špatně složit). Je dokázáno, že kovy mohou působit jako „patologické chaperony“, díky esenciálním rolím těchto kovů v mnoha biologických procesech je výzkum směro-

ván spíše na látky zeslabující komplex kov-protein než na chelatační činidla<sup>24</sup>.

Jelikož všechny amyloidy sdílí společné strukturální motivy, jednou z dalších nových strategií léčby je možnost, že protilátky proti amyloidovým ložiskům mohou zvýšit jejich degradaci. V minulosti se ukázalo, že vakcinace sebou nese vysoká rizika, ale i přes vysoká rizika zůstává imunoterapie zajímavou strategií a v současnosti se zkoumají jak pasivní, tak aktivní imunologické přístupy. Příkladem je protilátka MABT5102A, také známá jako anti-A $\beta$ , která byla použita pro aktivní imunizaci ke zvýšení progresivního štěpení A $\beta$  (cit.<sup>24</sup>).

Selhání proteolytických systémů je společným rysem poruch agregace a ukazuje se, že má klíčovou roli v patogenezi onemocnění. Z tohoto důvodu urychlení „odklizení“ agregátu, posílením hlavních buněčných cest pro odstraňování mutantních proteinů nebo podpora specifických aktivit proteasy, může představovat další přístup pro léčbu onemocnění. Jednou z možností tohoto směru je regulace ubiquitin-proteasomového systému (UPS) a autofágie. Obecně platí, že buňky odstraňují špatně složené cytosolické proteiny dvěma hlavními cestami: pomocí UPS a autofágie. UPS je zodpovědný za degradaci krátce žijících špatně složených nebo poškozených rozpustných proteinů a může hrát výraznou roli při odstraňování amyloidogenních proteinů. Autofágie je primárním mechanismem podílejícím se na odbourávání stabilních proteinů s dlouhou životností. Z terapeutického hlediska UPS ideálním cílem pro odstranění rozpustných krátkých špatně složených proteinů/peptidů, zatímco posílení autofágie dává přednost odstranění větších toxických oligomerních komplexů.

## 5. Závěr

Amyloidózy jsou různé nemoci či patologické stavy, při kterých je konečným výsledkem přechodu normálně rozpustných proteinů v nerozpustný útvar zvaný amyloid, který má fibrilární strukturu. Kromě proteinu, u kterého převažuje v amyloidech sekundární struktura  $\beta$ -skládaný list, osahuje další komponenty, jako jsou glykosaminoglykany, SAP a apolipoproteiny. Amyloidy se ukládají v tkáních a narušují jejich funkci<sup>10</sup>.

Léčba se liší v závislosti na typu amyloidózy. Vážným typem amyloidóz jsou systémové, jelikož problémem současné léčby je, že pouze prodlužuje pacientův život, a i když se medián přežití zvýšil, často je prognóza infaustní. U lokalizovaných forem bývá po léčbě úspěšně dosaženo kontroly nemoci. Výjimkou u těchto forem je např. Alzheimerova choroba, protože současná léčba pouze mírní symptomy nemoci. Nových možností léčby je celá řada a experimentální léčba není zaměřena pouze na vývoj látek, které mají specifickým způsobem působit na amyloidogenní protein a zamezit tak jeho fibrilaci, ale je zaměřena i na okolní komponenty, jako jsou např. enzymy štěpící prekurzorové proteiny, chaperony, SAP a apolipoproteiny.

*Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci Národního programu udržitelnosti I (NPU I), projekt POLYMAT LO1507.*

## Seznam zkratk

AD	Alzheimerova choroba
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalon
A $\beta$	amyloid beta
BACE-1	$\beta$ -sekretasa
CNS	centrální nervová soustava
FAP	dědičná amyloidní polyneuropatie
Hsp70	heat shock protein 70
IACHÉ	inhibitory acetylcholinesterasy
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-asparagová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAA	sérový amyloid A
SAP	sérový amyloidový protein
UPS	ubiquitin-proteasomový systém

## LITERATURA

- Radford S. E., Weissman J. S.: *J. Mol. Biol.* 421, 139 (2012).
- Sideras K., Gertz M. A.: *Adv. Clin. Chem.* 47, 1 (2009).
- Sipe J. D.: *Amyloid Proteins. The Beta Sheet Conformation and Disease.* Wiley-VCH, Weinheim 2005.
- Hazenber B. P. C.: *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 39, 323 (2013).
- Fowler D. M., Koulov A. V., Alory-Jost C., Marks M. S., Balch W. E., Kelly J. W.: *PLoS Biol.* 4, 0100 (2006).
- Dueholm M. S., Nielsen S. B., Hein K. L., Nissen P., Chapman M., Christiansen G., Nielsen P. H., Otzenet D. E.: *Biochemistry* 50, 8281 (2011).
- Cherny I., Gazit E.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 47, 4062 (2008).
- Benson M. D., v knize: *Emery and Rimoin's Essential Medical Genetics* (Rimoin D. L., Pyeritz R. D., Korf B. R., ed.), kap. 78. Elsevier Ltd., Amsterdam 2013.
- Sipe J. D., Benson M. D., Buxbaum J. N., Ikeda S-I., Merlini G., Saraiva M. J. M., Westermarck P.: *Amyloid* 17, 101 (2010).
- Picken M. M.: *Adv. Anat. Pathol.* 20, 424 (2013).
- Iannuzzi C., Maritato R., Irace G., Sirangelo I.: *Int. J. Mol. Sci.* 14, 14287 (2013).
- Rochet J-C., Lansbury P. T.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 60 (2000).
- Serpell L. C., Sunde M., Benson M. D., Tennent G. A., Pepys M. B., Fraser P. E.: *J. Mol. Biol.* 300, 1033 (2000).
- Lazo N. D., Downing D. T.: *Biochemistry* 37, 1731 (1998).
- Sipe J. D., Cohen A. S.: *J. Struct. Biol.* 130, 88 (2000).
- Merlini G., Bellotti V.: *N. Engl. J. Med.* 349, 583 (2003).
- Gazit E.: *FEBS J.* 272, 5971 (2005).
- Makin O. S., Atkins E., Sikorski P., Johansson J., Serpell L. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 315 (2005).
- Makin O. S., Serpell L. C.: *FEBS J.* 272, 5950 (2005).
- Marshall K. E., Morris K. L., Charlton D., O'Reilly N.: *Biochemistry* 50, 2061 (2011).
- Chiti F., Dobson C. M.: *Annu. Rev. Biochem.* 75, 333 (2006).
- Chi E. Y., Krishnan S., Randolph T. W., Carpenter J. F.: *Pharm. Res.* 20, 1325 (2003).
- Porat Y., Abramowitz A., Gazit E.: *Chem. Biol. Drug. Des.* 67, 27 (2006).
- Bartolini M., Andrisano V.: *ChemBioChem* 11, 1018 (2010).
- Hawkins P. N.: *Ann. Rheum. Dis.* 56, 631 (1997).
- Lachmann H. J., Hawkins P. N.: *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 214 (2006).
- Palladini G., Merlini G.: *Haematologica* 94, 1044 (2009).
- Sattianayagam P. T., Gibbs S. D. J., Pinney J. H., Wechalekar A. D., Lachmann H. J., Whelan C. J., Gilbertson J. A., Hawkins P. N., Gillmore J. D.: *Am. J. Transplant.* 10, 2124 (2010).
- Benson M. D., v knize: *Encyclopedia of Life Sciences*, kap. 2146, J. Wiley, Chichester 2001.
- Javadi M. M., Rumjon A., Coats T.: *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.* 2012, 37.
- Stangou A. J., Heaton N. D., Hawkins P. N.: *N. Engl. J. Med.* 352, 2356 (2005).
- Ghiso J., Frangione B.: *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 54, 1539 (2002).
- Mount C., Downton C.: *Nat. Med.* 12, 780 (2006).
- Scarpini E., Scheltens P., Feldman H.: *Lancet Neurol.* 2, 539 (2003).
- Hirschfield G. M., Hawkins P. N.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 1608 (2003).
- Bednářik J., Ambler Z., Růžička E.: *Klinická Neurologie.* Triton, Praha 2010.
- Winslow B. T., Onysko M. K., Stob C. M., Hazlewood K. A.: *Am. Fam. Phys.* 83, 1403 (2011).
- Nordberg A., Ballard C., Bullock R., Darreh-Shori T., Somogyi M.: *Prim. Care Companion CNS Disord.* 15, PCC.12r01412 (2013).
- Kozurkova M., Hamulakova S., Gazova Z., Paulikova H., Kristian P.: *Pharmaceuticals* 4, 382 (2011).
- Simoni E., Daniele S., Bottegoni G., Pizzirani D., Trincavelli M. L., Goldoni L., Tarozzo G., Reggiani A., Martini C., Piomelli D., Melchiorre C., Rosini M., Cavalli A.: *J. Med. Chem.* 55, 9708 (2012).
- Hård T., Lendel C.: *J. Mol. Biol.* 421, 441 (2012).
- Doig A. J., Derreumaux P.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 30, 50 (2015).
- Ferreira N., Saraiva M. J., Almeida M. R.: *FEBS Lett.* 585, 2424 (2011).
- Ojha B., Liu H., Dutta S., Rao P. P., Wojcikiewicz E. P., Du D.: *J. Phys. Chem. B* 117, 13975 (2013).



**M. Holubová and M. Hrubý** (*Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Therapeutics Against Amyloidosis**

The first part of this review deals briefly with the concept of amyloid, which is associated with the group of diseases called amyloidoses. The second section brings a brief overview of current clinically used therapeutics for selected types of amyloidoses. In the last section, examples are described of new experimental therapies of amyloidoses, which are currently under investigation.