

Związek między topografią zmian patologicznych a drogami hipokampa w chorobie Alzheimerera

Relationship between pathological changes topography and hippocampal tracts in Alzheimer's disease

JANUSZ MORYŚ, BOŻENA BERDEL, BEATA MACIEJEWSKA,
JERZY DZIEWIĄTKOWSKI

Z Zakładu Anatomii i Neurobiologii AM w Gdańsku

STRESZCZENIE. Przebadano liczbę oraz rozmieszczenie płytek starczych, kłębków neurofibrilarnych i ubytku neuronalnego w różnych okolicach zespołu hipokampa w mózgowiach 10 pacjentów zmarłych z rozpoznaniem choroby Alzheimerera wraz z 5 mózgowiach kontrolnych. Zmiany neurofibrilarne obecne były głównie w warstwie II kory śródwęchowej oraz sektorze CA1 hipokampa, natomiast największą liczbę płytek starczych obserwowano w głębokich warstwach kory śródwęchowej i warstwie drobinowej zakrętu zębatego. Badania morfometryczne wykazały, że zmiany patologiczne obecne są zarówno w strukturach z których biorą początek, jak i do tych, do których dochodzą główne drogi hipokampa. Stwierdzono jednak, że patologia neurofibrilarna przeważa w miejscach z których biorą początek drogi przesywające, podczas gdy w miejscach do których one dochodzą przeważają płytki starcze. Obserwowane zmiany patologiczne prowadzą do dramatycznego ubytku komórek nerwowych, który jest największy w korze śródwęchowej (56%) i sektorze CA1 (46%). Zanik neuronów prowadzi do zniszczenia głównych dróg doprowadzających informacje do hipokampa z różnych części ośrodkowego układu nerwowego.

SUMMARY. Density and distribution of senile plaques, neurofibrillary tangles and neuronal loss in various sites within the hippocampal system were examined at autopsy in the brains of 10 patients with Alzheimer's disease and in 5 control brains. The presence of neurofibrillary changes was found mostly in layer II of mid-olfactory cortex and in CA1 sector of the hippocampus, while the largest number of senile plaques was noted in deep layers of the mid-olfactory cortex and in the molecular layer of the dentate gyrus. Morphometric examination indicated the presence of pathological changes both in the structures of origin of the main hippocampal tracts as well as in those of their termination. However, neurofibrillary pathology turned out to predominate in sites of penetrating tracts departure, while in areas in which they terminate senile plaques prevailed. Observed pathological changes lead to a dramatic loss of nerve cells, most marked in the mid-olfactory cortex (56%) and in CA1 sector (46%). Neuronal loss results in damage of main afferent tracts conveying information to the hippocampus from various parts of the central nervous system.

Słowa kluczowe: hipokamp / drogi hipokampa / choroba Alzheimerera / pamięć / neuropatologia / morfometria
Key words: hippocampus / hippocampal tracts / Alzheimer's disease / memory / neuropathology / morphometry

Zespół hipokampa zbudowany jest z zakrętu zębatego, hipokampa właściwego, zespołu podkładki oraz kory śródwęchowej (entorynalnej). Zespół ten obejmuje większą część kory starej,

która położona jest na przyśrodkowej powierzchni płata skroniowego [14]. Z anatomicznego punktu widzenia zespół hipokampa jest nierozdzielalną częścią systemu związanego z pamię-

cią, w skład którego wchodzi: ciało migdałowate, jądro podstawne Meynerta, niektóre jądra wzgórza, przedmurze oraz okolice asocjacyjne kory mózgu [2, 11, 12].

Zajęcie hipokampa przez zmiany patologiczne w chorobie Alzheimera jest opisywane w wielu pracach, jednak jego rola w patogenezie otępienia wciąż nie jest w pełni poznana [4, 21, 23, 24, 27, 31, 35, 37]. Niektórzy autorzy uważają, że hipokamp jest zawsze uszkodzony w chorobie Alzheimera, a nawet że jego uszkodzenie jest niezbędnym warunkiem dla rozpoznania tej choroby [5, 8, 19, 32]. Typowe dla choroby Alzheimera zmiany patologiczne takie, jak: płytki starcze, kłębki neurofibrylarne, zwyrodnienie wodniczkowe oraz ubytek neuronalny są często spotykanymi zmianami w hipokampie [3, 6, 7, 9, 22, 26, 28, 29, 33, 36]. Jednakże jedynie nieliczni autorzy łączą ich rozmieszczenie z charakterystycznymi częściami zespołu hipokampa [1, 8, 10, 25, 34]. W związku z tym, głównym celem tej pracy jest znalezienie związku między rozmieszczeniem płytek starczych, kłębków neurofibrylarnych oraz ubytkiem neuronów a połączeniami zespołu hipokampa.

MATERIAŁ I METODA

Badania przeprowadzone zostały na mózgach 10 pacjentów zmarłych w późnym stadium choroby Alzheimera i 5 mózgach osób zmarłych z przyczyn pozamózgowych, u których w badaniu klinicznym nie stwierdzano cech otępienia. Wiek pacjentów z chorobą Alzheimera mieścił się w granicach od 73 do 88 lat, podczas gdy pacjentów z grupy kontrolnej od 71 do 79 lat. Mózgowia utrwalane były w 10% roztworze zbuforowanej formaliny przez okres nie krótszy niż 3 miesiące. Następnie pobierano z nich wycinki zawierające zespół hipokampa. Wycinki zatapiało się w parafinie i cięto w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 8 μm . Skrawki histologiczne barwiono klasycznymi metodami histologicznymi lub też metodami immunohistochemicznymi z użyciem techniki PAP. Do badań

kłębków neurofibrylarnych użyto swoistego barwienia z wykorzystaniem monoklonalnego przeciwciała skierowanego przeciwko nieprawidłowemu białku neurofilamentów (mAb Tau-1), podczas gdy do wykrycia β -amyloidu zawartego w płytach starczych monoklonalnego przeciwciała - mAb 4G8. Ocenę ubytku neuronów wykonywano na preparatach barwionych fioletem kryzylowym.

W celu przeprowadzenia analizy morfometrycznej obraz preparatu histologicznego rzutowany był przy pomocy mikroskopu Labophot-2 (Nikon, Japon) z przystawką do rysowania na tablicy magnetycznej sprzężony z komputerem Pentium wyposażonym w program morfometryczny Sigma-Scan (Jandel Scientific Corp., USA). Analizowano rozmieszczenie oraz gęstość płytek starczych, kłębków neurofibrylarnych i neuronów w poszczególnych częściach zespołu hipokampa.

Celem porównania uzyskanych w poszczególnych grupach wyników zastosowano test U Manna-Whitney'a, a wnioskowanie statystyczne przeprowadzano na poziomie istotności $p < 0.01$.

WYNIKI

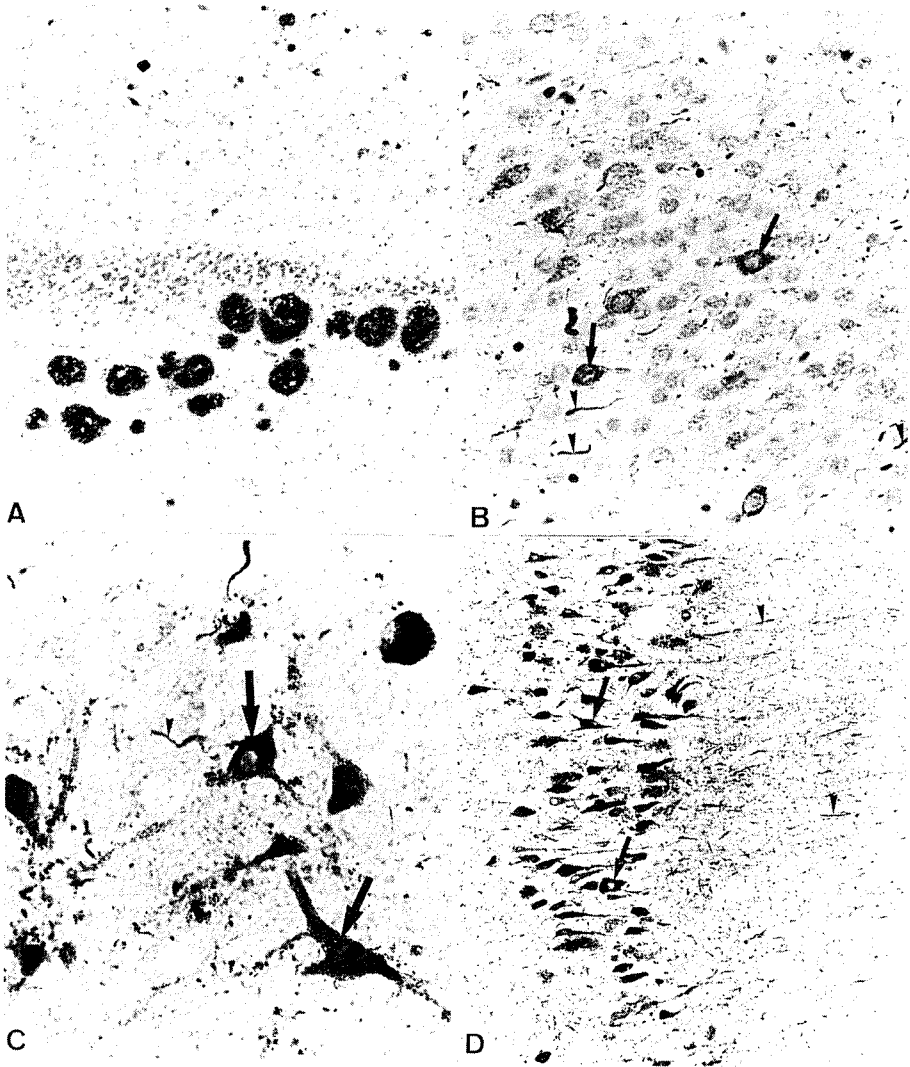
Zasadniczymi zmianami obserwowanymi w mózgach chorych na chorobę Alzheimera były płytki amyloidowe, kłębki neurofibrylarne i zmniejszenie gęstości neuronów, które prowadzi do zaniku struktur zespołu hipokampa.

Zanik struktur zespołu hipokampa. Zanik hipokampa obserwowany był we wszystkich przypadkach choroby Alzheimera. Stopień zaniku poszczególnych struktur zespołu hipokampa oceniany był na podstawie porównania pola przekroju danej struktury z odpowiadającą jej okolicą w mózgach kontrolnych. Najbardziej wyrażony on był w sektorach CA1 i CA2 hipokampa właściwego (odpowiednio 43% i 41%) oraz w korze śródwęchowej (47%). W zespole podkładki zanik dochodził do 37% w podkładce, 32% w przedpodkładce oraz jedynie 9% w przypodkładce. W pozostałych częściach zespołu hipokampu (zakręcie

zębata, sektorze CA3 i CA4) był znacznie mniejszy i nie przekraczał 10%.

Płytki starcze. W obrębie zespołu hipokampa stwierdzono znamienne różnice w rozmieszczeniu płytek starczych. Największą ich gęstość obserwowano we wszystkich przypadkach choroby Alzheimera w głębokich warstwach ko-

ry śródwęchowej ($28/\text{mm}^2$). W pozostałych częściach zespołu hipokampa (przypodkładce - $14/\text{mm}^2$, przedpodkładce - $13/\text{mm}^2$), warstwie drobinowej zakrętu zębatego - $10/\text{mm}^2$ (fot. 1A) oraz sektorze CA1 - $9/\text{mm}^2$) gęstość płytek starczych była statystycznie znamiennej mniejsza. W pozostałych strukturach zespołu hipokampa



Fotografia 1. Typowe dla choroby Alzheimera zmiany w zespole hipokampa. A. Płytki starcze w warstwie drobinowej zakrętu zębatego. B, C, D. Zmiany neurofibrylarne (kłębki neurofibrylarne - strzałki; nici neurofibrylarne - groty strzałek) w warstwie drobinowej zakrętu zębatego (B), sektorze CA1 (C) oraz sektorze CA2 (D). A - barwienie z użyciem przeciwciała 4G8; B, C, D - barwienie z użyciem przeciwciała Tau-1.

obserwowano jedynie pojedyncze płytki starcze (podkładka - $7/\text{mm}^2$, warstwa II kory śródwęchowej - $5/\text{mm}^2$, sektory CA2-CA4 - $3-4/\text{mm}^2$). Uogólniając uzyskane wyniki można stwierdzić, że intensywność zmian amyloido- wych zmniejsza się według następującego wzorca: warstwy głębokie kory śródwęchowej > przypodkładka > przedpodkładka > zakręt zębaty > sektor CA1 > podkładka > warstwa II kory śródwęchowej > sektor CA3 > sektory CA4 i CA2.

Kłębki neurofibrylarne. W zespole hipokampa kłębki neurofibrylarne obserwowane były we wszystkich przypadkach choroby Alzheimera i podobnie jak w przypadku płytek starczych były one charakterystycznie rozłożone w poszczególnych jego częściach. Najwyższe gęstości kłębków obserwowane były w warstwie ziarnistej zakrętu zębatego - $136/\text{mm}^2$ (fot. 1B), warstwie piramidowej sektora CA1 - $76,6/\text{mm}^2$ (fot. 1C) oraz w sektorze CA2 - $79,9/\text{mm}^2$ i warstwie II kory śródwęchowej - $51,3/\text{mm}^2$. Jednak gęstość neuronów zawierających kłębki neurofibrylarne nie odzwierciedla w pełni nasilenia tej patologii. Dlatego też wprowadziliśmy pojęcie wskaźnika kłębkowo-neuronalnego, który mówi o tym, jaki procent neuronów uszkodzonych znajduje się w całkowitej populacji neuronalnej w badanej części zespołu hipokampa. Odsetek neuronów zajętych przez patologię neurofibrylarną był największy w warstwie II kory śródwęchowej (około 41%) i w warstwie piramidowej sektora CA1 (około 41%). W innych strukturach zespołu hipokampa nasilenie zmian neurofibrylarnych było statystycznie znamienne mniejsze i wahało się od 3% w przypodkładce do 19% w sektorze CA2 (fot. 1D). Na podstawie wielkości wskaźnika kłębkowo-neuronalnego struktury hipokampa można ustawić w następującym szeregu, charakteryzującym się coraz mniejszym nasileniem zmian patologicznych: warstwa II kory śródwęchowej (41%) sektor CA1 (41%) CA2 (19%) podkładka (16.3%) CA4 (12.5%) CA3 i głębokie warstwy kory śródwęchowej (11%) przypodkładka (6%) war-

stwa ziarnista zakrętu zębatego (3.5%) przedpodkładka (3%).

Ubytek neuronalny. W barwieniu fioletem krezyłowym w strukturach hipokampa często obserwowano znaczne ubytki neuronalne wypełnione licznymi komórkami glejowymi. Zmiany takie były szczególnie częste w sektorze CA1 oraz w warstwie II kory śródwęchowej. W tych rejonach, czyli w warstwie piramidowej sektora CA1 (45%) oraz w warstwie II kory śródwęchowej (54%), jak również w warstwie ziarnistej zakrętu zębatego (11.7%) obserwowano znamienne statystycznie ubytek neuronów. W innych częściach zespołu hipokampa nie obserwowano znamiennego statystycznie zmniejszenia gęstości neuronów.

DYSKUSJA

Badania różnych rodzajów zaburzeń pamięci u ludzi oraz badania doświadczalne na zwierzętach, wykazały że hipokamp stanowi główną składową układu związanego z pamięcią [2, 11, 12, 20]. Zespół ten łączy się za pomocą złożonego systemu dochodzących, jak i odchodzących połączeń z różnymi częściami ośrodkowego układu nerwowego [2, 14, 15, 17, 30]. Do zespołu hipokampa (głównie kory śródwęchowej i podkładki) dochodzą połączenia z kory limbicznej i asocjacyjnej, ciała migdałowatego, wzgórze i jąder podstawy. Natomiast neurony położone w warstwie II kory śródwęchowej dają początek włóknom tworzącym drogę przesywającą, która doprowadza informacje do dendrytów komórek ziarnistych położonych w warstwie drobinowej zakrętu zębatego. Aksony komórek ziarnistych tworzą włókna kiciaste dochodzące do dendrytów proksymalnych komórek piramidowych sektora CA3. Komórki piramidowe sektora CA3 są głównym źródłem połączeń dochodzących do komórek sektora CA1, które z kolei wysyłają połączenia do podkładki. Neurony podkładki oraz sektora CA1 zwrótnie wysyłają połączenia do kory śródwęchowej, zakrętu obręczy, kory przedczołowej, ciała

migdałowatego, przegrody, ciał suteczkowych, jądra półleżącego i wzgórza.

Zespół hipokampa w chorobie Alzheimera wykazuje specyficzny wzór rozmieszczenia zmian patologicznych, takich jak płytki starcze, kłębki neurofibrylarne oraz ubytek neuronalny. Zmiany patologiczne obecne są zarówno w miejscach, z których wychodzą, jak i do których dochodzą charakterystyczne połączenia zespołu hipokampa. Przy czym płytki starcze przeważają w miejscach, do których one dochodzą (np. warstwa drobinowa zakrętu zębatego), podczas gdy w miejscach, z których te połączenia wychodzą przeważają zmiany neurofibrylarne.

Największą liczbę płytek starych obserwowaliśmy w głębokich warstwach kory śródwęchowej, warstwie drobinowej zakrętu zębatego, warstwach promienistej i piramidowej sektora CA1. Część autorów zwraca uwagę, że właśnie te okolice są rejonami zespołu hipokampa najbardziej predysponowanymi do tworzenia się płytek starych [25, 26, 30]. W przeciwieństwie do tego sektory CA2-CA4 oraz warstwa II kory śródwęchowej mają być odporne na ten typ patologii.

Zmiany neurofibrylarne przeważają w miejscach, które są źródłem połączeń zespołu hipokampa. Największe nasilenie zmian neurofibrylarnych obserwowane było w warstwie II kory śródwęchowej oraz warstwie piramidowej sektora CA1. Ponad 40% neuronów tych struktur wykazywało obecność kłębków neurofibrylarnych. Największe zagęszczenie kłębków neurofibrylarnych w tych strukturach obserwowane było również przez innych autorów [3, 4, 7, 10, 23, 25].

Tworzenie się amyloidu włóknikowego rozpoczyna kaskadę zmian molekularnych i strukturalnych, które prowadzą nie tylko do odkładania się białka amyloidowego w tkance nerwowej, ale również prowadzą do uszkodzenia neuronów. Zwyrodnienie neuronów w następstwie zmian neurofibrylarnych jest kolejnym etapem narastania patologii Alzheimerowskiej, której ostatecznym wynikiem jest zanik komórek nerwowych i utrata połączeń

między strukturami ośrodkowego układu nerwowego [19, 24, 25, 36]. Płytki starcze i kłębki neurofibrylarne prowadzą do drastycznej utraty populacji neuronalnej w korze śródwęchowej (54%) i sektorze CA1 (45%). Doprowadza to do zmniejszenia liczby zakończeń synaptycznych we wszystkich częściach zespołu hipokampa [13, 16, 18, 26, 30]. Patologia połączeń synaptycznych i śmierć komórek nerwowych w miejscach, skąd wychodzą drogi przesywające doprowadza do czynnościowej izolacji zespołu hipokampa i jest przyczyną obserwowanych w chorobie Alzheimera zaburzeń pamięci.

PIŚMIENNICTWO

1. Akiyama H., Tago H., Itagaki S., McGeer P.L.: Occurrence of diffuse amyloid deposits in the pre-subicular parvocortical layer in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1990, 79, 537.
2. Amaral D.G.: Memory: anatomical organization of candidate brain region. W: Plum F. (red.): *Handbook of Physiology. Section I. The Nervous System, Volume V. Higher Functions of the Brain. Part I.* Bethesda. American Physiological Society, 1987, 211.
3. Armstrong R.A., Myers D., Smith C.U.M.: The distribution of senile plaques, neurofibrillary tangles and β /A4 deposits in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Neurosci. Res. Comm.* 1992, 10, 87.
4. Arnold S.E., Hyman B.T., Flory J., Damasio A.R., Van Hoesen G.W.: The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cerebral Cortex* 1991, 1, 103.
5. Ball M.J., Fisman M., Hachinski V., Blume W., Fox A., Kral V.A., Kirshen A.J., Fox H., Merskey H.: A new definition of Alzheimer's disease: a hippocampal dementia. *Lancet* 1985, 1, 14.
6. Ball M.J., Lo P.: Granulovacuolar degeneration in the ageing brain and in dementia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1977, 36, 474.
7. Ball M.J.: Topographic distribution of neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in hippocampal cortex of aging and demented patients. A quantitative study. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1978, 42, 73.
8. Bobinski M., Wegiel J., Wisniewski H.M., Tarawski M., Reisberg B., Młodzik B., de Leon M.J., Miller D.C.: Atrophy of hippocampal formation subdivisions correlates with stage and duration of Alzheimer disease. *Dementia* 1995, 6, 205.
9. Braak H., Braak E.: Neurofibrillary changes confined to the entorhinal region and an abundance of cortical amyloid in cases of presenile and senile dementia. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1990, 80, 479.

10. Brady D.R., Mufson E.J.: Alz-50 immunoreactive neuropil differentiates hippocampal complex subfields in Alzheimer's disease. *J. Comp. Neurol.* 1991, 305, 489.
11. Corsellis J.A.N.: The limbic areas in Alzheimer's disease and in other conditions associated with dementia. W: Wolstenholme G.W.E., O'Connor M. (red.): *Alzheimer's disease and Related Conditions.* J & A Churchill, London 1970, 37.
12. Damasio A.R.: The anatomic basis of memory disorders: *Semin. Neurol.* 1984, 4, 226.
13. Davies P.: Neurotransmitter - related enzymes in senile dementia of the Alzheimer type. *Brain Res.* 1979, 171, 319.
14. Duvernoy H.M.: *The human hippocampus. An atlas of applied anatomy.* J.F. Bergmann Verlag, München 1988, 1.
15. Goto S., Hirano A.: Neuronal inputs to hippocampal formation in Alzheimer's disease and in parkinsonism-dementia complex on Guam. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1990, 79, 545.
16. Hamos J.E., De Gennaro L.J., Drachman D.A.: Synaptic loss in Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology* 1989, 39, 354.
17. Hyman B.T., Kromer L.J., Van Hoesen G.W.: A direct demonstration of the perforant pathway terminal zone in Alzheimer's disease using the monoclonal antibody Alz-50. *Brain Res.* 1988, 450, 392.
18. Hyman B.T., Kromer L.J., Van Hoesen G.W.: Reinnervation of the hippocampal perforant pathway zone in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1987, 21, 259.
19. Hyman B.T., Van Hoesen G.W., Damasio A.R., Barnes C.L.: Alzheimer's disease: cell - specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 1984, 225, 1168.
20. Hyman B.T., Van Hoesen G.W., Kromer L.J., Damasio A.R.: Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1986, 20, 472-481.
21. Hyman B.T., Van Hoesen G.W.: Hippocampal and entorhinal cortex cellular pathology in Alzheimer's disease. W: Chan-Palay V., Köhler C. (red.): *The hippocampus. New vistas.* Alan R. Liss, Inc., New York 1989, 499.
22. Kalus P., Braak H., Braak E., Bohl J.: The presubicular region in Alzheimer's disease: topography of amyloid deposits and neurofibrillary changes. *Brain Res.* 1989, 494, 198.
23. McKee A.C., Kosik K.S., Kennedy M.B., Kowall N.W.: Hippocampal neurons predisposed to neurofibrillary tangle formation are enriched in type II calcium/calmodulin - dependent protein kinase. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1990, 49, 49.
24. Mizutani T., Amano N., Sasaki H., Morimatsu Y., Mori H., Yoshimura M., Yamanouchi H., Hayakawa K., Shimada H.: Senile dementia of Alzheimer type characterized by laminar neuronal loss exclusively in the hippocampus, parahippocampus and medial occipitotemporal cortex. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1990, 80, 575.
25. Morys J., Narkiewicz O., Sadowski M., Barcikowska M., Berdel B., Kida E., Maciejewska B., Wisniewski H.M.: Topography of pathological alterations in hippocampal formation in aging, vascular dementia and Alzheimer's disease. *Ann. Acad. Med. Gedan.* 1994, 24, 9.
26. Morys J., Sadowski M., Barcikowska M., Maciejewska B., Narkiewicz O.: The second layer neurones of the entorhinal cortex and the perforant path in physiological ageing and Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol. Exp.* 1994, 54, 47.
27. Price J.L., Davis P.B., Morris J.C., White D.L.: The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 1991, 12, 295.
28. Probst A., Basler V., Bron B., Ulrich J.: Neuritic plaques in senile dementia of Alzheimer type: A Golgi analysis in the hippocampal region. *Brain Res.* 1983, 268, 249.
29. Sadowski M., Morys J., Barcikowska M., Narkiewicz O.: Astrocyte and microglia reaction in Alzheimer's disease in the hippocampal formation - a quantitative analysis. *Alzheimer's Res.* 1995, 1, 71.
30. Samuel W., Masliah E., Hill L.R., Butters N., Terry R.: Hippocampal connectivity and Alzheimer's dementia: effects of synapse loss and tangle frequency in a two-component model. *Neurology* 1994, 44, 2081.
31. Shefer V.F.: Hippocampal pathology as a possible factor in the pathogenesis of senile dementias. *Neurosci. Behav. Physiol.* 1978, 8, 236.
32. Struble R.G., Polinsky R.J., Hedreen J.C., Nee L.E., Frommelt P., Feldman R.G., Price D.L.: Hippocampal lesions in dominantly inherited Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1991, 50, 82.
33. Tomlinson B.E., Kitchener D.: Granulovacuolar degeneration of hippocampal pyramidal cells. *J. Pathol.* 1972, 106, 165.
34. Van Hoesen G.W., Hyman B.T., Damasio A.R.: Entorhinal cortex pathology in Alzheimer's disease. *Hippocampus* 1991, 1, 1.
35. Van Hoesen G.W., Hyman B.T.: Hippocampal formation: anatomy and the patterns of pathology in Alzheimer's disease. *Prog. Brain Res.* 1990, 83, 445.
36. West M.J., Coleman P.D., Flood D.G., Troncoso J.C.: Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 1994, 344, 769.
37. Wisniewski H.M., Wegiel J., Morys J., Bobinski M.: *Alzheimer dementia neuropathology.* W: Emery V.O.B., Oxman T.E. (red.): *Dementia presentations, differential diagnosis and nosology.* John Hopkins University Press, Baltimore 1993, 79.