

Badania immunohistochemiczne w chorobie Alzheimera

Immunohistochemical studies in Alzheimer's disease

MARIA BARCIKOWSKA

Z Zakładu Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie

STRESZCZENIE: *Praca pogładowa przedstawiająca, w oparciu o hipotezy różnych autorów, możliwe mechanizmy powstawania zmian w mózgu w przebiegu choroby Alzheimera (red.).*

SUMMARY: *The paper presents an overview of proposed by various authors hypothetical mechanisms of cerebral changes in the course of Alzheimer's disease (Eds.)*

Słowa kluczowe: choroba Alzheimera/badania immunohistochemiczne

Key-words: Alzheimer's disease/immunohistochemical studies

Pewne rozpoznanie ChA jest możliwe wyłącznie u pacjentów, u których zaistniały dwa czynniki: po pierwsze - klinicznie, na podstawie badania neurologicznego, psychiatrycznego i oceny neuropsychologicznej rozpoznano otępienie, a po drugie - w badaniu neuropatologicznym stwierdzono w mózgach pacjentów blaszki starcze (BS), niekiedy też kongofilną angiopatię (KA) i zwyrodnienie włókninkowe neuronów (ZW) w liczbie i lokalizacji charakterystycznej dla ChA.

Rozwój badań naukowych w ostatnim dziesięcioleciu udowodnił, że BS i ZW nie występują wyłącznie w mózgach chorych z otępieniem, a także w przebiegu tzw. starzenia się fizjologicznego - w liczbie rosnącej z wiekiem i bez wyraźnej zależności od pojawiania się demencji, szczególnie po 80 roku życia. Samo występowanie w mózgu starym amyloidu lub jego prekursora nie pozwala odpowiedzieć na pytanie, czy jest to amyloid typowy dla wieku starczego, czy też jest to amyloid charakterystyczny dla ChA. Wyprodukowane przez Daviesa (1987) przeciwciała Alz 50, traktowane początkowo jako różnicujące amyloid starczy od alzheimerowskiego, jak dowiedziono później, nie jest przeciwciałem przeciw swoistemu dla ChA amyloidowi a przeciw patologicznemu białku cytoskeletonu - tau sprzężonemu

tylko z amyloidem. Dlatego też, ciągle jeszcze do końca nie rozstrzygnięto sporu, czy obecność neuropatologicznych zmian typu alzheimerowskiego - jest przejawem starzenia się mózgu tzw. fizjologicznego, czy też pojawienie się tych zmian jest zjawiskiem chorobowym. I jak się wydaje zjawiskiem chorobowym uzależnionym tylko od czasu, w którym dochodzi do przekroczenia progu tolerowanej przez ośrodkowy układ nerwowy (OUN) liczby zmian w stopniu, który spowoduje, że przejawia się to klinicznie otępieniem. Według wielu autorów zagadnienie tomografii występowania BS i ZW jest oceniane jako znacznie istotniejsze od liczby samych zmian. Obok nieustalonej jeszcze, charakterystycznej lokalizacji dla zmian starczych prowadzącej w efekcie do otępienia, nie jest także jasne, jakie musi być ilościowe nasilenie występowania BS i ZW aby przejawiało się to wyraźnym klinicznym deficytem pamięci. Od 1985 roku obowiązują dane liczbowe, tzw. neuropatologiczne kryteria Khachaturiana, pozwalające na postawienie rozpoznania ChA w zależności od wieku. Oprócz kryteriów Khachaturiana obowiązują także inne oparte także na wartościach liczbowych dotyczących BS kryteria CERAD (*The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*), których wadą jest jednak także ścisłe powiązanie defi-

nycji z samą tylko obecnością zmian amyloidowych w mózgu.

Być może jest również tak, że liczne przypadki, w których stwierdza się dużą liczbę BS, bez klinicznych cech demencji mogą być po prostu przypadkami przedklinicznymi, u których objawy kliniczne otępienia nie zdążyły się pojawić przed śmiercią z innego powodu.

Powstało wiele hipotetycznych scenariuszy wydarzeń zmian prowadzących w efekcie do stwierdzanego klinicznie otępienia. Jedna z hipotez zakłada, że amyloid odkłada się pierwotnie w tkankach mózgu, a następnie wtórnie, tylko przez jego mechaniczną obecność w neuropilu, lub poprzez działanie toksyczne dochodzi do śmierci neuronu, poprzedzonej patologicznym wyrodnieniem białek cytoskeletonu (ZW). Równocześnie zakładano odwrotny przebieg wydarzeń. To znaczy patologiczny proces zaczynał się od pojawienia się ZW, a efektem uszkodzenia neuronu byłoby odkładanie się amyloidu w neuropilu.

Grupa Terrego lansuje w ostatnim okresie teorię utrzymującą, że powodem otępienia jest nie zanik neuronów będący wynikiem działania amyloidu i zmian cytoskeletonu komórki, a tylko znaczne ilościowe zmniejszenie neuronalnych połączeń synaptycznych.

Być może należy także wrócić do tzw. teorii transmitterowej. Wiadomo od 15 lat, że w ChA spada poziom acetyltransferazy cholinowej na skutek m.in. alzheimerowskich zmian w neuronach jądra Maynerta, ale także innych substancji, noradrenaliny, serotoniny, dopaminy, GABA, somatostatyny, neuropeptydu Y, substancji P, CRF. Dotychczasowe próby leczenia substytucyjnego przynosiły jednak nikłe wyniki w przeciwieństwie np. do choroby Parkinsona, w której defekt jest głównie (choć także nie wyłącznie) ograniczony do dopaminy.

Glennner i Wong w 1984 r. posłużyli się białkiem amyloidowym wyekstrahowanym z naczyń mózgowych w celu poznania jego sekwencji aminokwasowej. Ukierunkowało to poszukiwania na mechanizmy molekularne zjawiska. Ich celem stało się odnalezienie genu kodującego amyloid. Zsekwencjonowane przez

Glennnera i wsp. (1984) białko amyloidowe składające się z 40-42 aminokwasów zostało nazwane beta-peptydem A4. W ciągu 3 lat badacze z czterech niezależnych od siebie ośrodków opublikowali wyniki poszukiwań genetycznych. Beta-amyloid jest częścią większego prekursora (APP), którego funkcja biologiczna ciągle jeszcze nie jest całkiem jasna. Agregacja włókienek beta-amyloidu może zajść tylko wtedy, kiedy dochodzi do uszkodzenia podwójnej błony lipidowo-białkowej i tym samym uwolnienia błonowej części APP. 28 aminokwasów wchodzących w skład beta-peptydu znajduje się na zewnątrz błony, a 11-14 aminokwasów stanowi jego część wewnątrz błonową. Wiadomo już teraz, że w wyniku splicingu pierwotnego transkryptu powstaje przynajmniej 6 różnych izoform APP: APP-365, APP-563, APP-695, APP-714, APP-751 i APP-770, przy czym APP-751 i APP-770 zawierają dodatkowo 56-76 aminokwasowych wstawek, częściowo homologicznych z inhibitorem proteinazy serynowej typu Kunitza, zaś duża część NH₂-końca APP-751 i APP-770 jest w dużej mierze homologiczna z inhibitorem proteazy serynowej, proteazy Nexin-II. Odkrycie to zwróciło uwagę na rolę inhibitorów proteaz seryny w przetwarzaniu białka prekursorowego oraz udział tych inhibitorów w uwalnianiu z błony beta-amyloidu, co prowadzi do odkładania jego włókienkowej formy w neuropilu. Już przedtem immunohistochemicznie oznaczono obecność alfa-anty-chymotrypsyny w BS, a także w komórce nerwowej i glejowej.

Gen związany z produkcją amyloidu początkowo lokalizowano na chromosomie 21. Okazało się jednak, że tylko forma ChA o wczesnym początku wiąże się bezpośrednio z występowaniem genu na długim ramieniu chromosomu 21 i dziedziczy się w sposób autosomalnie dominujący. W dalszych badaniach wykazano, że w niektórych przypadkach gen dla APP znajduje się na chromosomie 19. Dla innych, bez porównania częstszych, sporadycznych przypadków ChA nie znaleziono żadnej określonej mutacji genu odpowiadającego za pojawienie się cech choroby. Poza ChA o

wczesnym początku dziedziczność amyloidozy udowodniono w przypadku choroby Downa (trisomii 21), a także dla wrodzonego krwotoku mózgowego z myloidozą typu holenderskiego i islandzkiego.

Dzięki osiągnięciom biologii molekularnej i tym samym inżynierii genetycznej, będzie zapewne możliwe w przyszłości odtworzenie drogi od genu do pojawienia się włóknikowego amyloidu w neuropilu. Znane są liczne rozważania teoretyczne na ten temat. Od lat trwa nierozstrzygnięty spór pomiędzy zwolennikami teorii pochodzenia białka prekursorowego amyloidu z surowicy krwi neuronu (Glennner, Masters) a tymi, którzy uważają, że źródłem włókien amyloidowych jest komórka mikroglejowa (Wiśniewski). A jeżeli nie źródłem włókien amyloidowych to na pewno źródłem enzymów proteolitycznych, których działanie może rozpocząć kaskadę zdarzeń prowadzących do odkładania się włóknikowego amyloidu w neuropilu, poprzez jego uwolnienie z błony.

Niewątpliwym, chociaż ubocznym sukcesem rozwoju badań immunohistochemicznych w ChA, była możliwość wysoce swobodnego opisu wszystkich form pojawiania się amyloidu w tkankach mózgu. Klasyczny podział oparty na metodach impregnacyjnych srebrowych zakładał następujący scenariusz wydarzeń: najpierw pojawia się w neuropilu BS zwana "pierwotną" będąca skupiskiem luźnych włókien amyloidu, potem zmiana pierwotna przekształcać się miała w BS klasyczną. Tworzyło się serce blaszki - amyloidowy trzon, a wokół niego część neurytyczna zwana koroną. Ostatnim etapem wydawała się być blaszka wypalona, będąca tylko grudką amyloidu bez cech obecności korony neurytycznej. Poza neuropilową lokalizacją zmian amyloidowych, białko to stwierdzono w ścianie naczyń różnego kalibru. Rozwój technik immunohistochemicznych, a tym samym szerokie użycie przeciwciał przeciw beta-amyloidowi pozwoliło opisać formy obecności amyloidu w oun nieznanego do tej pory. Zjawiskiem zupełnie nowym, uważanym często na podstawie barwień klasycznych za

artefakcyjne, było stwierdzenie amyloidu rozproszonego. Nie ma on uformowanego kształtu BS, a jest nieograniczonym, rozlanym ogniskiem amyloidu, w którym zawieszony są pozornie niezmiennione neurony. Według Probst (1987) i innych jest to faza początkowa, potem dochodzi do ograniczania jej do BS. Inni autorzy (Węgiel, Wiśniewski, doniesienie własne) są zdania, że ta forma istnienia amyloidu jest ostateczną fazą jego obecności w mózgu po sfagocytowaniu ogniskowych blaszek amyloidowych. BS jest, jak to wynika z powyższego opisu, formą morfologiczną łączącą dwa główne procesy patologiczne toczące się w starczym mózgu - obecność amyloidu i zwyrodnienie włóknikowe. Zmiany te to głównie zwyrodnienie wewnątrzkomórkowe, ale także i zewnętrzne. ZW zostało opisane szczegółowo w oparciu o badania w mikroskopie elektronowym już w latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych prowadzone przez Kidda (1963) i Wiśniewskiego i wsp. (1970). Wykazali oni po raz pierwszy, że obserwowane w mikroskopie świetlnym zmiany włóknikowe NFT (*neurofibrillary tangles*) w badaniu na poziomie ultrastrukturalnym odpowiadają w dużej części PHF (*paired helical filaments*).

Badania immunohistochemiczne struktury PHF prowadzone są przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciw białkom z nimi sprzężonymi lub wchodzącym w ich skład białku tau-1 i ubikwitynie. Wiadomo przy tym, że epitopy tau są patologicznie ufosforylowane. Dodatkowo dla tau-1 barwią się również neurytyczne korony BS, a także część tzw. *ghost tangles* (cieni ZW) - PHF występującego pozakomórkowo po rozpadzie błon komórkowych. Charakterystyczne jest także występowanie w tym okresie licznych tzw. nitek neuropilowych. W okresie późniejszym dochodzi do sprzężenia ZW z ubikwityną, która jak się przypuszcza wypiera białko tau-1. Sugerowana rola ubikwityny jako białka biorącego czynny udział w syntezie DNA nie jest wyjaśniona do końca. Ubikwityna jest być może jednym z inhibitorów proteaz i występuje powszechnie w oun, biorąc udział w procesach proteolitycznych. Przeciwciała

przeciw ubikwitynie barwią ZW także cienie ZW i nitki neuropilowe w stopniu zbliżonych do 60% tego obrazu, który uzyskuje się barwiąc przy użyciu surowicy przeciw białku tau-1.

Wydaje się, że otępienie pojawia się częściej w przypadku współwystępowania BS i ZW.

Podsumowując można zaproponować następujący scenariusz wydarzeń:

Defekt genetyczny chromosomu 21 prowadzi do przeładowania nieznannej komórki stanowiącej źródło prekursora amyloidu (neuron, komórka astroglejowa, mikroglej, komórka ściany naczynia lub nawet surowica krwi) APP. Następnie na skutek patologicznej proteolizy (ponowny błąd genetyczny lub jedyny błąd genetyczny) lub z powodu niewydolności komórki glejowej dochodzi do odkładania się włóknikowej formy amyloidu w neuropilu w postaci rozproszonej. Z czasem depozyty amyloidu ulegają ograniczeniu. Otacza je astroglej izolując BS wypustkami tworzącymi bliznę

glejową na obwodzie i komórki mikrogleju zlokalizowane wewnątrz BS. W tym czasie poprzez toksyczne działanie pewnych fragmentów amyloidów na neuryty dochodzi do patologicznych przemian białek cytoskeletonu, zaburzeń fosforylacji także białka tau, zwolnienia przepływu aksonalnego. W efekcie prowadzi do odkładania się NFT wewnątrzkomórkowo i wtórnie, do pojawiania się patologicznych białek cytoskeletonu w neuropilu pozabłonowo. Białka te są następnie ubikwitynowane, a ubikwityna ma m.in. działanie stymulujące wytwarzanie się amyloidu (*amyloid enhancing factor*). Śmierć licznych neuronów pociąga za sobą dramatyczny spadek połączeń międzyneuronalnych, a także wtórnie deficyt neurotransmitterów m.in. acetylcholiny. W tym okresie zanik mózgu jest już widoczny w badaniach radiologicznych, a klinicznie chory jest otępiały.

Adres: Dr Maria Barcikowska, Klinika Neurologiczna AM, ul. Banacha 1A, 02-097 Warszawa