

Alzheimer hastalığında gözlenen senil plakların immunohistokimyasal metodlarda gösterilmesi

Immunohistochemical demonstration of senile plaques in Alzheimer's disease

Ranan Gülhan Aktaş¹, Robert J. Kayton²

¹ Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Edirne

² Oregon Health Sciences University, CROET, Portland, Oregon, U.S.A

Çalışmamızda; Alzheimer hastalığının farklı klinik evrelerinde senil plaklarda meydana gelen beta-amiloid ve Tau proteini birikimini immunohistokimyasal yöntemlerle karşılaştırmalı olarak göstermeyi amaçladık. Deneysel olarak Alzheimer Hastalığı oluşturulmuş primatların erken konfüzyon, geç konfüzyon, erken demans ve geç demans evrelerinde olanları saptandı. Bu hayvanlara %1 paraformaldehit / %4 glutaraldehit perfüzyonu uygulanmasının ardından, serebral kortekslerinden parafin bloklar hazırlandı. Kesitler, avidin-biotin-peroksidaz tekniği kullanılarak anti-beta-amiloid ve anti-Tau ile boyandı. Alzheimer hastalıklı deneklere ait anti- β -amiloid ile işaretlenmiş kesitlerde; hastalığın başlangıcından itibaren belirgin şekilde boyanma olduğu, klinik evre ile orantılı şekilde senil plakların boyanma yoğunluğunun, sayısının ve büyüklüğünün arttığı görüldü. Tau immunoreaktivitesi; beta-amiloid proteinine göre az yoğunlukta olup, değişik evreler arasında belirgin farklılık gözlenmedi. Bu proteinin, özellikle geç demans evresinde arttığı ve senil plak görüntüsünün belirginleştiği dikkatli çekiyordu. Bu sonuçlar; hastalığın ilk döneminden itibaren biriken beta-Amiloid proteininin gösterilmesinin tanısal amaçla kullanılabileceğini, senil plaklarda Tau proteini birikiminin ise özellikle son devrelerde gerçekleştğini göstermektedir.

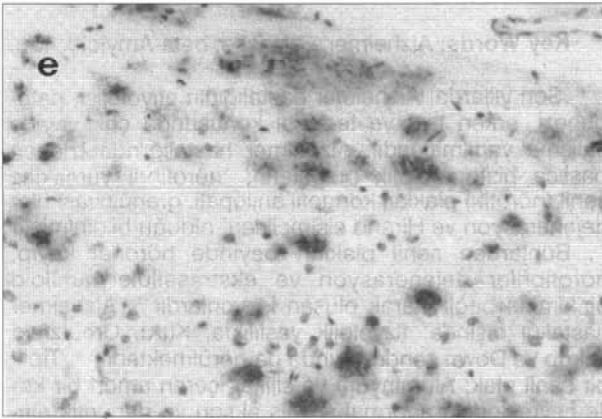
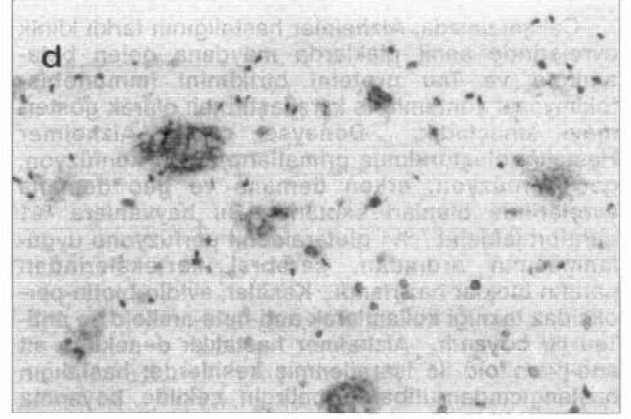
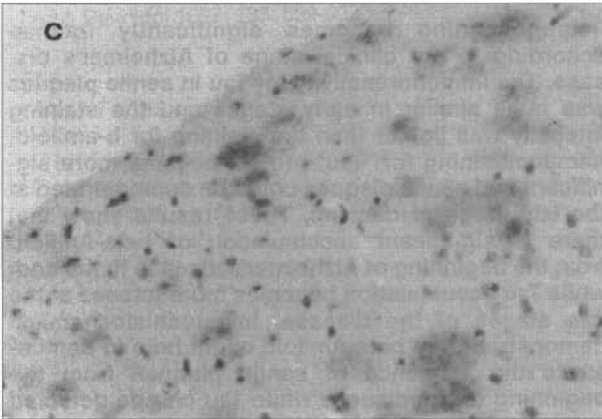
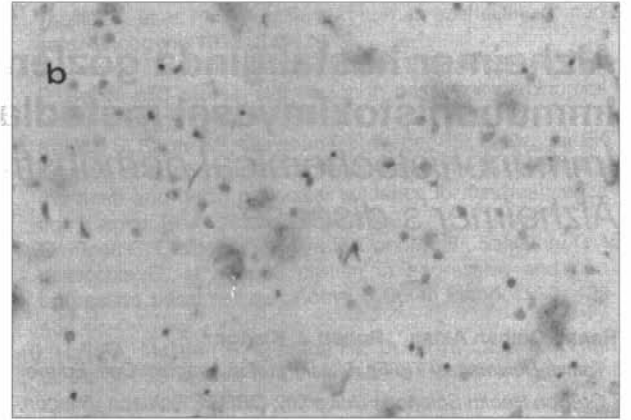
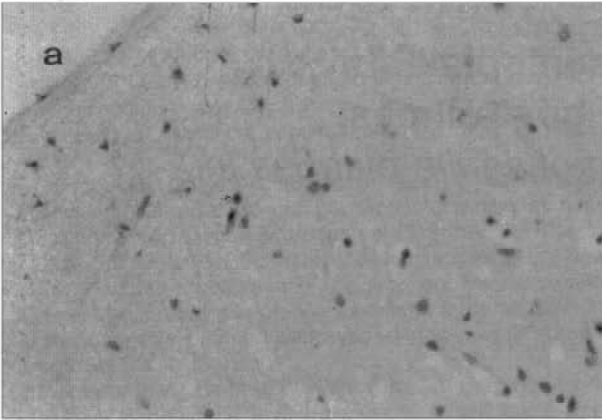
Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, beta-Amiloid, Tau.

The aim of the study was to demonstrate the accumulation of b-amiloid and Tau in different clinical stages of Alzheimer's disease by using immunohistochemical methods. Primates, having Alzheimer's disease experimentally, were grouped into four clinical stages: Early confusion, late confusion, early demans and late demans. After perfusion of paraformaldehit %1/glutaraldehit %4, specimens from their cerebral cortex were embedded in paraffin. The sections were immunostained with anti-beta-amiloid and anti-Tau by using avidin-biotin-peroxidase staining technique. There was significant staining with beta-amiloid from the beginning of the disease to the end. The method has demonstrated that senile plaques increase in number and size while the

immunostaining becomes significantly intense according to the clinical stage of Alzheimer's disease. The immunoreactivity for Tau in senile plaques was quite similar in early stages and the staining intensity was lighter than the staining for b-amiloid. Immunostaining for "Tau" protein became more significant and senile plaques could be demonstrated at the late stage of demans. These results show that there is significant accumulation of beta-Amiloid from the beginning of Alzheimer's disease to the end; while Tau accumulation becomes more intense at the late stages of the disease. Immunohistochemical demonstration of beta-Amiloid might help to demonstrate the existence of senile plaques from the beginning of the disease while Tau can be detected at the later stages of Alzheimer's disease.

Key Words: Alzheimer's disease, beta-Amyloid, Tau.

Son yıllarda; Alzheimer hastalığının etiyolojisi, patogenezi, erken tanı ve tedavisi konusunda çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Alzheimer hastalığı'nda izlenen başlıca histopatolojik bulguların; "nörofibril yumaklar, senil (nörotik) plaklar, kongofil anjiyopati, granülovasküler dejenerasyon ve Hirano cisimcikleri" olduğu bildirilmiştir⁽¹⁾. Bunlardan senil plaklar; beyinde nöronal kayıp, nörofibriler dejenerasyon ve ekstrasellüler amiloid birikimine bağlı olarak oluşan lezyonlardır⁽²⁾. Alzheimer hastalığı dışında; fizyolojik yaşlılıkta, Kuru, Creutzfeld Jakob ve Down sendromunda da görülmektedir^(1,3). Tipik bir senil plak; Alüminyum ve silikat içeren amorf bir kor ile çevresindeki anormal şişmiş akson ve dendritik elemanlar, glial uzantılar, astrositler ve nörofibril yumaklarından oluşan gevşek yapıda bir kısımdan meydana gelir. Yapılan araştırmalar; senil plakların farklı tiplerdeki amiloid proteinleri, Tau proteini, alpha-1-antikimotripsin, apolipoprotein E ve ubiquitin içerdiğini göstermiştir (3-12). Senil plakların içerdiği amiloidin en yaygın formunun " β -amiloid" olduğu bildirilmiştir^(2,4,7-11,13). "Tau" ise; matür plaklarda bulunan ve şişmiş nöritlerde saptanan bir diğer proteindir^(2, 12, 14). Çalışmamızda, hastalığın farklı klinik dönemlerinde senil plaklarda meydana gelen beta-amiloid ve Tau birikimini karşılaştırmalı olarak immunohistokimyasal yöntemlerle göstermeyi amaçladık.

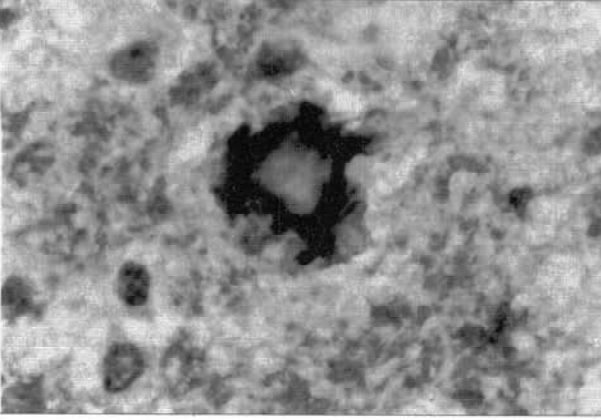


Resim 1a,b,c,d,e: Aynı lam üzerine yerleştirilerek anti -amiloid ile işaretlenmiş 5 ayrı primata ait serebral kortex örnekleri. Normal primata ait dokuda hiç boyanma gözlenmezken (1a); Alzheimer hastalığının erken konfüzyon (1b), geç konfüzyon (1c), erken demans (1d) ve geç demans (1e) evrelerindeki primatlarda klinik evreye göre senil plak sayısında, büyüklüğünde ve boyanma yoğunluğunda belirgin artış gözlenmektedir. (x100)

GEREÇ VE YÖNTEM

Oregon Sağlık Bilimleri Üniversitesi'ne bağlı Primatoloji Merkezi'nde, primatlarda deneysel olarak Alzheimer Hastalığı oluşturulmaktadır. Bu merkezde

sürdürülmekte olan çalışmaların yanı sıra; uygun görüldüğü takdirde farklı merkezlerde yapılan bilimsel çalışmalara da destek sağlanmaktadır. Çalışmamız için bu merkezde yetiştirilmiş ve klinik değerlendirilme sonucu Alzheimer hastalığı tanısı konularak erken konfüzyon, geç konfüzyon, erken demans ya da geç demans evrelerinde olduğu saptanmış primatlardan 3'er tane olmak üzere toplam 12 deneğin serebral korteksleri temin edildi. Kontrol grubu olarak da yine aynı merkezde klinik değerlendirilme sonucu normal olduğu saptanmış 3 erişkin normal primatın serebral korteksleri alındı. Bu doku örneklerinin fiksasyonu; hayvanlara %1 paraformaldehit %4 glutaraldehit perfüzyonu uygulanarak yapılmıştı. Deneklerin serebral korteksinin Gyrus Presentralis'e karşılık gelen kısımlarından alınan doku örnekleri yükselen alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi ve parafin bloklar hazırlandı. Boyama işlemlerine bağlı oluşabilecek farklılığı önleyerek, karşılaştırmalı inceleme yapabilmek amacı ile; bir normal primat ile birlikte farklı klinik evrelerdeki 5 ayrı hayvanın korteksinden alınan (geç demans evresindeki hayvanlardan 2'ser, diğer evrelerdeki deneklerden 1'er kesit) 5 mikronluk kesitler aynı lamel üzerine yerleştirildi. Bu kesitler, anti-amyloid-b (Sigma, St. Louis, MO, katalog no: A8326) ve anti-Tau (Sigma, St. Louis, MO, katalog no: T5530) primer antikorları kullanılarak avidin-biyotin peroksidaz tekniği ile (Vectastain ABC kit, Vector Laboratory, Burlingame, CA) boyandı. Kromojen olarak ise 3, 3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, St. Louis, MO) kullanıldı. Nospesifik işaretlenmeyi kontrol



Resim 2: Anti- beta-amiloid ile işaretlenmiş geç demans evresindeki bir primatta, çekirdek kısmı da oluşmuş bir matür senil plak (x500).

etmek amacı ile de ikinci bir kontrol grubu olarak; aynı şekilde 6 farklı hayvandan alınan doku örneklerinin bir lam üzerine konulduğu kesitler, ilgisiz bir antikor türü ile (anti-fibroblast F5B5) işaretlendi.

BULGULAR

Senil plaklarda b-amiloid birikimi:

Aynı lam üzerine yerleştirilmiş ve anti-b-amiloid ile işaretlenmiş kesitler incelendiğinde; kontrol deneklerinde spesifik boyanma gözlenmedi (Resim1a). Alzheimer hastalıklı deneklerde ise belirgin boyanma mevcuttu. Hastalığın ciddiyeti ile orantılı şekilde boyanma yoğunluğunda belirgin artış olduğu, işaretlenmiş senil plakların büyüklüklerinin ve sayısının arttığı görülmüyordu (Resim1b-e). Erken konfüzyon, geç konfüzyon, erken demans ve geç demans evreleri arasında belirgin işaretlenme farklılığı mevcuttu (Resim1b-e). Başlangıçta nöronların hücre gövdelerinin ve uzantılarının etrafında amiloid depolandığı, giderek bu alanların genişleyip senil plakların çekirdek kısmını oluşturduğu gözleniyordu (Resim 2).

Senil plaklarda Tau proteini birikimi:

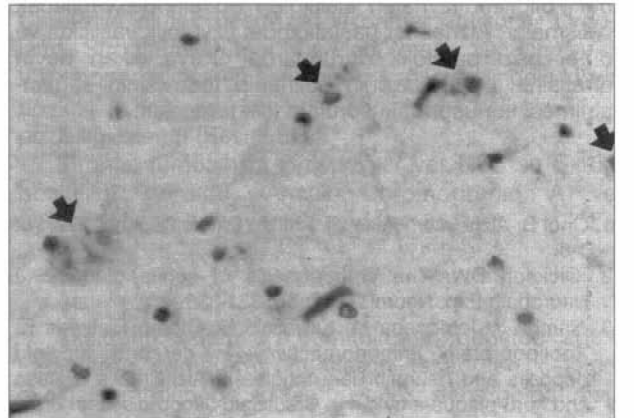
Kontrol deneklerinde ve ilgisiz antikor türü ile işaretlenmiş kesitlerde boyanma saptanmadı. Klinik olarak erken devrede bulunan Alzheimer hastalıklı deneklerdeki Anti-Tau immunoreaktivitesi; anti-b-amiloid immunoreaktivitesi kadar yoğun değildi. Nöron gövdeleri çevresinde görülen Tau immunoreaktivitesi, farklı klinik evrelerdeki deneklerde birbirine yakın yoğunlukta idi. Yalnızca geç demans evresindeki hayvanlara ait doku örneklerinde nisbeten daha koyu bir boyanma mevcuttu (Resim 3). Son dönemdeki hayvanlarda gözlenen senil plaklarda, yaygın karakterde ve b-amiloid kadar yoğun olmayan işaretlenme dikkati çekiyordu (Resim 4).

TARTIŞMA

Senil plaklar; dejenere nöronal uzantılar, reaktif glial hücreler ve peptidlerden (başta b-Amiloid olmak üzere

farklı tiplerdeki amiloid proteinleri, Tau proteini, alpha-1-antikimotripsin, apolipoprotein E, ubiquitin) meydana gelen komplike lezyonlardır. Başlangıçta nöron gövdeleri ve uzantıları etrafında diffüz amiloid birikir. Ardından bu maddelerin birikimi yoğunlaşarak ve genişleyerek senil plakları oluşturur. Senil plakların çekirdekleri, amiloid ve beraberindeki farklı proteinleri içermektedir. Neden senil plaklarda amiloid biriktiği henüz anlaşılamamıştır. Ancak bölgedeki heparin sülfat proteoglikanlarının, apo-E ve apo-J proteinlerinin önemli rol oynadığı bildirilmiştir ⁽¹⁵⁾. Bu plaklarda erken dönemde nöron uzantılarında distrofi gözlenmez. Normalde yaşlarına sürecinde ortaya çıkan senil plaklar; bu devrenin ötesine geçmemektedir. Oysa Alzheimer hastalığında, nöron uzantılarının harabiyeti ve artmış mikrogial reaksiyon belirginleşmektedir. Son çalışmalar; yaşlanma sırasında ve Alzheimer Hastalığı'nda biriken amiloid komponentlerinin farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır ⁽²⁾. Yaşlanma sırasında sekretuar yolun işleme sonucu P3 proteinin üretildiği; Alzheimer hastalıklı bireylerde ise endozomal-lizozomal amiloidojenik yol olarak isimlendirilen mekanizmanın devreye girmesi sonucu β -Amiloid biriktiği bildirilmiştir. Elektron mikroskopik düzeyde yapılan yeni bir çalışma; amiloid birikiminin başlangıçta hücre zarı altında olduğunu, giderek hücresel uzantılara yayıldığını göstermiştir ⁽¹⁶⁾.

Çalışmamız; β -Amiloid proteininin hastalığın başlangıcından itibaren senil plaklarda belirgin şekilde biriktiğini göstermektedir. Bu da; immunohistokimyasal metodlarla β -Amiloid proteini işaretlenmesinin, hastalığın ilk dönemlerinden itibaren senil plakların mevcudiyetinin gösterilmesini sağlayabileceğini göstermektedir. Farklı klinik evrelere göre β -Amiloid proteini birikimine bağlı olarak boyanma yoğunluğu ve boyanan alanların büyüklüğünde ve sayısında belirgin artış vardı. Bu gözlemler; hastalığın evresi hakkında β -Amiloid birikiminin fikir verebileceğini göstermektedir. Arens ve ark.nın çalışmasında da ⁽¹⁷⁾ farklı teknikler kullanılarak demans ile amiloid birikimi arasındaki korelasyon gösterilmiştir. Amiloid birikiminin neden demansa yol açabileceğinin araştırıldığı bir diğer ilginç deneysel çalışmada ⁽¹⁸⁾; amiloid biriken nöronal uzantılarda meydana gelen morfolojik değişiklikler sebebi ile aksiyon potansiyel-



Resim 3: Anti-Tau ile işaretlenmiş olan ve Resim 1'e'deki geç demans evresindeki Alzheimer hastalıklı primata ait serebral korteks doku örneğinde; senile plakların daha az sayıda ve düşük yoğunlukta işaretlendiği görülmektedir (x100).



Resim 4: Geç demans evresindeki bir primata ait serebral korteks dokusunda, Anti-Tau ile işaretlenmiş bir senil plak (x500).

lerinin, dolayısı ile iletimin geciktiği bildirilmiştir.

Bir diğer araştırmada amiloid birikiminin üst kortikal tabakalarda daha diffüz, alt kortikal tabakalarda ise daha yoğun olduğunu bildirilmiştir⁽²⁾. Çalışmamızda bu açıdan belirgin bir farklılık yoktu.

Plaklarda Tau birikiminde ise; hastalığın klinik evresine göre belirgin farklılık gözlemleyemedik. Çalışmamız, bu proteinin depolanma miktarının β -Amiloid kadar yoğun olmadığını, "Tau" birikiminin hastalığın son dönemlerinde belirginleştiğini düşündürmektedir. Daha önceki çalışmalarda da Tau proteininin matür senil plaklarda tesbit edilmesi^(2,12,14); bu bulgumuzu desteklemektedir. 12 Alzheimer hastasına ait doku örneklerinin değerlendirildiği bir çalışmada Tau proteini %90'dan daha fazla oranda pozitif saptanmış; demans görülmeyen yaşlı hastalarda bu oran % 1.3'e inmiştir⁽¹⁴⁾. Hardy ve ark.nın çalışmasında⁽¹⁹⁾; Alzheimer hastalığında gözlenen demans ile Tau proteini birikimi ve disfonksiyonu arasında ilişki olabileceği bildirilmiştir. Galasko⁽²⁰⁾; serebrospinal sıvıda β -Amiloid ve Tau proteinleri ölçümünün Alzheimer hastalığı erken tanısında yardımcı olabileceğini bildirmişlerdir.

Görüldüğü gibi; senil plakları oluşturan yapısal elementler ve bu plakların oluşum mekanizması konusundaki bilgilerimiz halen kısıtlıdır. Bu alanda yapılacak çalışmalar; Alzheimer hastalığında, fizyolojik yaşlılıkta ve diğer bazı patolojik durumlarda ortaya çıkan beyin atrofisinin patogenezinin belirlenip tedavisinin sağlanabilmesi konusundaki sorulara ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Önel B: Alzheimer Hastalığı. Ankara Patoloji Bülteni 1991; 8: 1-8.
2. Dickson DW: The pathogenesis of senile plaques. J Neuropath Exp. Neurol. 1997; 56: 321-339.
3. Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K: Apolipoprotein immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jacob disease. Brain Res 1991; 541: 163-166.
4. Nakamura S, Kiatipattabasakul W, Nakayama H, Ono F, Sakakibara I, Yoshikawa Y ve ark: Immunohistochemical characteristics of the constituents of senile plaques and amy-

- loid angiopathy in aged cynomolgus monkeys. J Med. Primatol. 1996; 25: 294-300.
5. Selkoe DJ: The molecular pathology of Alzheimer's disease. Neuron. 1991; 6: 487-498.
6. Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H: Immunohistochemical identification of the serine protease inhibitor α 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. Cell 1988; 52: 487-501.
7. Shoji M, Hirai S, Yamaguchi H, Herigaya Y, Ishiguro K, Matsubara E: Alpha1-antichymotrypsin is present in diffuse senile plaques: A comparative study of β -protein and 1-antichymotrypsin immunostaining in the Alzheimer brain. Am. J Pathol. 1991; 138: 247-257.
8. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS: Apolipoprotein E: high avidity to binding β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci 1993; 1977-1981.
9. Cras P, Kawai M, Siedlak S, Mulhivill P, Gambetti P, Lowery D ve ark.: Neuronal and microglial element in beta-amyloid protein deposition in Alzheimer's disease. Am J Pathol 1990; 137: 241-246.
10. Cras P, Kawai M, Lovery D, Gonzalez-DeWhitt P, Greenberg B, Perry G: Senile plaques neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 7552-7556.
11. Shoji M, Hirai S, Yamaguchi H, Harigaya Y, Kawarabayashi T: Amyloid β -protein precursor accumulates in dystrophic neurites of senile plaques in Alzheimer-type dementia. Brain Res 1990; 512: 164-168.
12. Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ: Microtubule-associated protein, tau, is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 4044-4048.
13. Glenner GG ve Wong CW: Alzheimer's disease and Down's syndrome: Sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. Biochem Biophys Res Comm 1984; 122: 1131-1135.
14. Shin RW, Ogomori K, Kitamoto T, Tateishi J: Increased Tau accumulation in senile plaques as a hallmark in Alzheimer's disease. Am J Pathol 1989; 134: 1365-1371.
15. Brandan E, Inestrosa NC: Extracellular matrix components and amyloid in neuritic plaques of Alzheimer's disease. Gen Pharmacol 1993; 24: 1063-1068.
16. Yamaguchi H, Maat-Schieman ML, van Duinen SG, Prins FA, Neeskens P, Natta Roos RA: Amyloid beta protein (A β) starts to deposit as plasma membrane-bound form in diffuse plaques of brains from hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type, Alzheimer disease and nondemented aged subjects. J Neuropathol Exp Neurol 2000;59:723-732.
17. Arends YM, Duyckaerts C, Rozemuller JM, Eikelenboom P, Hauw JJ: Microglia, amyloid and dementia in Alzheimer disease. A correlative study. Neurobiol Aging 2000; 21:39-47.
18. Knowles RB, Wyart C, Buldyrev SV, Cruz L, Urbanc B, Hasselmo ME, Stanley HE, Hyman BT: Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96:5274-5279.
19. Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M: Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. Nat Neurosci 1998; 1:355-358.
20. Galasko D: Cerebrospinal fluid levels of A beta 42 and tau: potential markers of Alzheimer's disease. J Neural Transm Suppl 1998; 53:209-221.