

CENTRUM MEDYCyny DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
POLSKA AKADEMIA NAUK

MARIA BARCIKOWSKA-LITWIN

ŚRÓDTKANKOWE ZŁOGI
AMYLOIDOWE I ZWYRODNIENIE
NEUROFIBRYLARNE
JAKO PODŁOŻE OTĘPIENIA
W CHOROBIĘ ALZHEIMERA
BADANIA IMMUNOHISTOCHEMICZNE

ROZPRAWA HABILITACYJNA



WARSZAWA 1996
<http://rcin.org.pl>

Dublet

25175

Maria Barcikowska-Litwin



25 175
H3093

**ŚRÓDTKANKOWE ZŁOGI AMYLOIDOWE
I ZWYRODNIENIE NEUROFIBRYLARNE
JAKO PODŁOŻE OTEPIENIA
W CHOROBIE ALZHEIMERA
BADANIA IMMUNOHISTOCHEMICZNE**

Rozprawa habilitacyjna

Zakład Neuropatologii
Instytut Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
Polskiej Akademii Nauk

Warszawa 1995

<http://rcin.org.pl>

*Rodzicom, Córce i przyjaciołom,
których zachęta przyczyniła się
do powstania tej pracy*

Dziękuję serdecznie Panu Profesorowi Mirosławowi Mossakowskiemu i Pani Docent Irminie Zelman za liczne cenne wskazówki i opiekę w trakcie powstawania niniejszej pracy.

Jestem zawsze zobowiązana Pani Profesor Irenie Hausmanowej-Petrusewicz za wyjątkową rolę jaką odegrała w moim życiu lekarza.

Panu Profesorowi Henrykowi Wiśniewskiemu zawdzięczam pasję i odnalezienie się w pracy naukowej.

STRESZCZENIE

Celem przedstawionej rozprawy było ustalenie czy odkładające się śródkankowo złogi amyloidowe oraz zwyrodnienie neurofibrylarne neuronów - dwa kluczowe zjawiska patologiczne w chorobie Alzheimerera, wykazują cechy charakterystyczne dla tej choroby czy też są niezależne od typu procesu patologicznego oraz czy charakter i dynamika towarzyszącego im odczynu glejowego pozwolą na określenie roli gleju w procesie odkładania amyloidu w neuropilu. Podjęto również próbę określenia zmian strukturalnych mogących stanowić podłoże narastającego otępienia, będącego osiowym objawem klinicznym w chorobie Alzheimerera.

Badania przeprowadzono na 385 mózgach osób z niedorozwojem i na 54 mózgach osób z rozpoznąną klinicznie chorobą Alzheimerera oraz na mózgach z 26 przypadków choroby Parkinsona, 10 przypadków z zespołem parkinsonowskim i współistniejącym otępieniem, z 5 przypadków zespołu Downa, z 7 przypadków choroby Creutzfeldta-Jakoba i 2 z choroby Gerstmannna-Straüsslera-Scheinkera. Przedmiotem analizy były ponadto 132 mózgi osób zmarłych z powodu udaru i 25 przypadków osób zmarłych w podeszłym wieku bez cech otępienia. Podstawową metodą badawczą, poza rutynowymi technikami neuropatologicznymi, był szeroki wachlarz odczynów immunohistochemicznych, opartych głównie o technikę ekstrawidynowo-biotynową, przy użyciu niekomercyjnych i przemysłowych przeciwciał.

Ze względu na konieczność porównania charakterystycznych dla choroby Alzheimera zmian neuropatologicznych w badanym materiale opracowano metodę dla retrospektywnej diagnozy otępienia na podstawie istniejącej dokumentacji lekarskiej. Pozwoliło to na wykorzystanie mózgow z liczącej kilkadziesiąt lat kolekcji Jervisa a także materiału autopsyjnego pochodzącego z różnych klinicznych zbiorów archiwalnych.

Przeprowadzono badania mające na celu ustalenie, które z komórek ośrodkowego układu nerwowego produkują białko prekursorowe dla amyloidu, stanowiące źródło agregujących w neuropilu fragmentów β -amyloidu. Badania te wykonano przy użyciu przeciwciał przeciw 8 syntetycznym fragmentom białka prekursorowego. Wykazały one, że białko prekursorowe amyloidu występuje powszechnie w komórkach ośrodkowego układu nerwowego - neuronach i gleju a także w elementach strukturalnych ściany naczyń. Jego obecność stwierdzono także w komórkach narządów wewnętrznych zarówno u ludzi jak i innych ssaków. Badania te nie pozwoliły jednakże na jednoznaczne określenie, która z komórek wykazujących obecność prekursora amyloidu jest najważniejszym źródłem włóknikowego amyloidu, odkładającego się w neuropilu.

Scharakteryzowano obraz immunomorfologiczny ogniskowych i rozlanych złogów amyloidu w neuropilu w mózgach osób z chorobą Alzheimera i u ludzi w podeszłym wieku bez cech otępienia. Określono również wzajemne zależności pomiędzy występowaniem blaszek starczych i obecnością neuronów ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym w korze nowej i w hipokampie, a także przeprowadzono ocenę częstości występowania zmian amyloidowych w poszczególnych warstwach kory w chorobie Alzheimera i zespołu Downa w porównaniu z tzw. starzeniem fizjologicznym mózgu. Stwierdzono, że blaszki starcze w przypadkach choroby Alzheimera występują w sposób typowy w górnych warstwach kory w przeciwieństwie do starzenia się fizjologicznego, w którym obejmują one raczej jej dolne warstwy. Amyloid włóknikowy tworzący blaszkę starczą

występuje zarówno w mózgach osób z chA jak i u osób bez cech otępienia. W neuropilu amyloid występuje w postaci złożeń ogniskowych i rozproszonych, identycznych histologicznie i immunohistochemicznie w chA i w starzeniu przebiegającym bez cech otępienia.

Istotna różnica pomiędzy mózgiem chorego z otępieniem i bez cech demencji dotyczy liczby i lokalizacji złożeń amyloidowych a także ich współwystępowania z neuronami o cechach zwyrodnienia neurofibrylarnego. Wydaje się, że najważniejszą różnicą pomiędzy mózgiem chorego ze stwierdzonym klinicznie otępieniem a tym, który starzeje się bez objawów otępiennych jest poza określoną liczbą amyloidowych blaszek starczych w korze występowanie zwyrodnienia neurofibrylarnego neuronów. Nawet bardzo duża liczba blaszek amyloidowych w neuropilu bez równoczesnej patologii białek cytoskeletonu, nie przejawia się otępieniem. Obecność patologicznych białek cytoskeletonu w neuronie stanowi przyczynę ubytków neuronalnych i uszkodzeń synaptycznych prowadzących w efekcie do klinicznie rozpoznawanego zespołu alzheimerowskiego.

Przeprowadzono również ocenę immunoreaktywności patologicznych białek cytoskeletonu w chorobie Parkinsona to znaczy w przebiegu procesu zwyrodnieniowego nie mającego cech mózgowej amyloidozy w porównaniu z chorobą Alzheimera i ze starzeniem fizjologicznym. Przedmiotem szczególnego zainteresowania było porównanie czasowej sekwencji pojawiania się białka tau 1 i ubikwityny. Zmiany neurofibrylarne w jądrach barwnikowych: istocie czarnej i jądrach miejsca sinawego w chorobie Parkinsona i chorobie Alzheimera występują także bez złożeń amyloidu. W jądrze miejsca sinawego w obu tych procesach zwyrodnieniowych stwierdza się wyraźne opróżnienie ubikwitynizacji zmian neurofibrylarnych w porównaniu z korą półkul mózgu, a także z jądrem środkowym górnym pnia. Być może jest to wyrazem ochronnej roli białka tau 1 sprzę-

zonego z patologicznymi białkami cytoskeletonu w strukturach regulujących podstawowe czynności ustroju.

Przeprowadzono analizę odczynów glejowych w chorobie Alzheimera i w procesach zwyrodnieniowych innych niż amyloidoza, w tym także w pasażowalnych amyloidozach mózgowych (choroba Creutzfeldta-Jakoba i Gerstmann-Strauslera-Scheinkera). Rola gleju astrocytarnego w amyloidozach mózgowych jest wieloraka. Komórka astrogleju jest jednym ze źródeł białka prekursorowego dla amyloidu. Bierze ona również udział w wytwarzaniu włókien β -amyloidu. Astroglej odgrywa rolę komórki fagocytującej amyloid i neurony ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym, a także izoluje złogi amyloidu, którym przypisuje się właściwości toksyczne. Komórka mikroglejowa jest także jednym ze źródeł prekursora amyloidu w mózgu. Bierze ona udział w tworzeniu ogniskowych złogów amyloidu, głównie ich rdzenia. Obserwuje się także uogólniony rozplam komórek mikrogleju w niektórych obszarach ośrodkowego układu nerwowego nie wykazujący wyraźnego związku z obecnością złogów amyloidowych. Zjawisko to występuje zarówno w amyloidozach transmisyjnych jak i w chorobie Alzheimera. Szczególnie istotny dla kształtowania uszkodzeń tkankowych w chorobie Alzheimera wydaje się udział mikrogleju w fagocytozie zmian amyloidowych, modyfikuje on bowiem lokalizację złogów amyloidu i wpływa na ich liczbę.

**Przedstawione w rozprawie wyniki badań immunohistochemicznych
opublikowano w następujących pozycjach**

PRACE ORYGINALNE

1. Rafałowska J., **Barcikowska M.**, Wen G.Y., Wiśniewski H.M.; Laminar distribution of neuritic plaques in normal aging, Alzheimer's disease and Down syndrome. *Acta Neuropathol*, 77, 21-25, 1988.
2. Wiśniewski H.M., Bancher C., **Barcikowska M.**, Wen G.Y., Currie J.; Spectrum of morphological appearance of amyloid deposits in Alzheimer's disease., *Acta Neuropathol*, 78, 337-347, 1989.
3. **Barcikowska M.**, Silverman W., Zigman W., Kozłowski P., Kujawa M., Rudelli R., Wiśniewski H.M.; Relationship between senile plaques and neurofibrillary tangles to dementia in retrospective study of mentally retarded people: a clinical retrospective study., *Am J Ment Retard*, 93, 551-557, 1989.
4. **Barcikowska M.**, Wiśniewski H.M., Bancher C., Grundke-Iqbal I.; About the presence of paired helical filaments in dystrophic neurites participating in the plaque formation., *Acta Neuropathol*, 78, 225-231, 1989.
5. Popovitch E., Wiśniewski H.M., **Barcikowska M.**, Silverman W., Bancher C., Sersen E., Wen G.; Alzheimer neuropathology in non Down syndrome mentally retarded adults., *Acta Neuropathol*, 80, 362-367, 1990.
6. Wiśniewski H.M., **Barcikowska M.**, Kida E.; Phagocytosis of B/A4 amyloid fibrils of the neuritic neocortical plaques., *Acta Neuropathol*, 81, 588-590, 1991.

7. Kida E., **Barcikowska M.**; Ubiquitin expression in globose tangles in the locus coeruleus in Alzheimer's and Parkinson's disease brain., *Neurosci Lett*, 136, 59-62, 1992.
8. **Barcikowska M.**, Kujawa M., Wiśniewski H.M.; Amyloid deposits within cerebellum in persons 80 years and over., *Neuropath Pol.* 30, 285-293, 1992.
9. **Barcikowska M.**, Liberski PP., Budka H., Boellaard J., Brown P., Gajdusek DC.; Microglia is a component of the PrP plaque in the Gerstmann-Straüssler-Scheinker syndrome /GSS/, *Acta Neuropath.* 85, 623-627, 1993.
10. **Barcikowska M.**, Kida E.; Ferritin-positive microglia in Alzheimer's and Parkinson's disease brain., *Folia Med Lodz.* 22, 141-152, 1995.
11. **Barcikowska M.**, Friedman A.; Clinicopathological study of 10 cases with dementia and parkinsonian syndrome, *procc*, "International Symposium, Dementia in Parkinson's Disease", ed A. Korczyn, Jerusalem, march 20-25, 203-207, 1994.
12. **Barcikowska M.**, Kwieciński H., Liberski P., Kowalski J., Brown P., Gajdusek DC.; Creutzfeldt-Jakob disease with Alzheimer-type A β -reactive amyloid plaques., *Histopathology*, 26, 445-450, 1995.

SPIS TREŚCI

WSTĘP	1
CELE PRACY	28
MATERIAL	30
METODY	36
1. Badania immunohistochemiczne	36
2. Badania morfometryczne	40
3. Badania zmienności statystycznej	42
WYNIKI	43
1. Przydatność dokumentacji lekarskiej dla oceny otępienia w badaniach retrospektywnych	43
2. Poszukiwanie komórki-"producenta" białka prekursorowego amyloidu	45
2.1. Występowanie poszczególnych fragmentów prekursora dla amyloidu w korze nowej mózgu	46
2.2. APP w mózdzku w chorobie Alzheimera	48
2.3. APP w siatkówce szczura	48
2.4. APP w narządach, poza ośrodkowym układem nerwowym	49
3. Charakterystyka form morfologicznych złożeń amyloidu w oun	49
4. Topografia amyloidu w ośrodkowym układzie nerwowym w przypadkach starczych (w tym z pierwotnym opóźnieniem rozwoju) i w chorobie Alzheimera	51

5. Patologia białek cytoskeletonu	53
6. Udział astroglju i mikroglju w procesie starzenia oun	58
6.1. Reakcja glju włóknistego na złogi amyloidu w mózgach osób z rozpoznaną klinicznie chorobą Alzheimera	58
6.2. Reakcja mikrogljowa	59
6.3. Udział glju w fagocytozie zmian amyloidowych i neuronów ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym	62
DYSKUSJA	65
1. Ocena przydatności dokumentacji lekarskiej dla retrospektywnego rozpoznania otępienia	65
2. Próba określenia komórki-"producenta" białka prekursorowego dla β-amyloidu	66
3. Amyloid w procesie starzenia fizjologicznego i przebiegającego z otępieniem	72
4. Zwyrodnienie białek cytoskeletonu w chorobie Alzheimera	78
5. Co oznacza w świetle badań immunohistochemicznych termin "fizjologiczne starzenie się"?	82
6. Udział glju w procesie starzenia się tkanek mózgu	84
7. Znaczenie mikroglju w patogenezie amyloidoz	88
WNIOSKI	95
PIŚMIENNICTWO	97

WSTĘP

Rosnąca liczba osób cierpiących na chorobę Alzheimera (chA) stanowi z roku na rok coraz większy problem dla społeczeństw i rządów wielu państw. Dzięki rozwojowi medycyny oraz systematycznie poprawającym się warunkom ekonomicznym wydłuża się przeciętna długość życia. Tym samym zwiększa się liczba ludzi w podeszłym wieku, a wśród nich liczba osób z zespołami otępiennymi.

Wyniki badań epidemiologicznych dotyczących występowania otępienia są zbliżone w różnych krajach. W Europie częstość demencji w grupie wiekowej 65-74 lat wynosi 1-2%, pomiędzy 75 a 84 rokiem życia - 4% i po ukończeniu 85 lat choruje 10% populacji (Fratighoni 1993). Badania w programie EURODEM wykazały częstość występowania otępienia w grupie wiekowej 75-79 lat na 5,7%, 80-84 lata - 12,4%, a pomiędzy 85-89 na 21 % (Sulkava i wsp. 1983). Wyniki badań epidemiologicznych z Rochester w Minnesocie prowadzone w systemie longitudinalnym (USA) świadczą o wyraźnym narastaniu otępienia wraz z wiekiem (Bachman i wsp. 1993, Kokinen i wsp. 1993). W USA Mortimer i Hutton (1985) opublikowali, że otępienie pojawia się u 30 % ludzi po 80 roku życia. W Polsce badania epidemiologiczne przeprowadził w poznańskim Wender (1988). Określił on częstość pojawiania się objawów demencji na 2,2% w grupie powyżej 45 roku życia i na 6% populacji powyżej 65 lat.

Najczęściej (w 55% przypadków) otępienie spowodowane jest przez zwyrodnienie typu alzheimerowskiego; w 25% przyczyną otępienia są zmiany naczyniopochodne, w 15% są to przypadki mieszane - w których współlistnieją oba te procesy, w 8% - przyczyną demencji są inne czynniki, takie jak zaburzenia metaboliczne, hormonalne, uszko-

dzenia toksyczne i zmiany ogniskowe w ośrodkowym układzie nerwowym (oun) - guz lub krwiak (Jellinger 1995).

obj.
Choroba Alzheimera jest schorzeniem polegającym na głębokich zaburzeniach możliwości poznawczych, którym towarzyszy narastające upośledzenie pamięci świeżej i dawnej, ubożenie mowy, zaburzenia orientacji przestrzennej i apraksja bez towarzyszących im typowych zaburzeń świadomości. Choroba przebiega w kilku etapach. Rozpoczyna się niecharakterystycznymi objawami; najczęściej są to niewielkiego stopnia zaburzenia pamięci świeżej i orientacji, trudności w skupieniu uwagi, depresja albo podejrzliwość, którym często towarzyszy niewielkie spowolnienie ruchowe. Niekiedy pojawiają się pierwsze zaburzenia mowy. W drugim etapie pogłębiają się zaburzenia czynności mowy, chory przestaje być samodzielny, nie prowadzi samochodu, nie odróżnia banknotów, występuje niechęć do mycia się, do zmiany ubrania, je jednym sztucem lub ręką, narasta podejrzliwość. Chory może zgubić się w mniej znanych sobie okolicach, bywa pobudzony, cierpi na bezsenność, przestaje poznawać znajomych ale rozpoznaje dom i bezpośredniego opiekuna. W badaniu neurologicznym w tym okresie poza zespołem parkinsonowskim stwierdza się obecność objawów deliberacyjnych. Trzeci etap rozpoczyna się niekontrolowaniem oddawania moczu, potem stolca, zanika mowa, chory musi być karmiony, rozwija się pełny zespół parkinsonowski, chory przestaje chodzić i ginie najczęściej z powodu zapalenia płuc, unieruchomiony w łóżku przez ostatni rok życia. Taki typowy obraz kliniczny jak również wykonanie badań diagnostycznych biochemicznych, tomografii komputerowej, rezonansu magnetycznego i EEG pozwala na postawienie rozpoznania prawdopodobnej choroby Alzheimera. Pewna diagnoza w takich przypadkach jest jednak możliwa wyłącznie na podstawie badania neuropatologicznego. Z drugiej jednak strony stwierdzenie zmian patologicznych typu alzheimerowskie-

go w mózgu osób, u których nie rozpoznano klinicznie cech otępienia także nie pozwala na rozpoznanie chA.

Pewna diagnoza chA jest więc możliwa wyłącznie wtedy kiedy na podstawie obrazu klinicznego, opartego o badania neurologiczne, psychiatryczne i ocenę neuropsychologiczną rozpoznano otępienie, a w badaniu neuropatologicznym stwierdzono w mózgu blaszki starcze (BS) z towarzyszącą im niekiedy kongofliną angiopatią (KA) i zwyrodnienie neurofibrylarne (ZN), w natężeniu i umiejscowieniu charakterystycznym dla chA.

Blaszki starcze i zwyrodnienie neurofibrylarne w mózgu, zostały opisane na przełomie XIX i XX wieku. BS opisał po raz pierwszy Bloq i Marinesco (1892) a ZN w roku 1907 roku Alzheimer (dzięki użyciu przez nich impregnacji srebrowej).

Pierwszy przypadek choroby Alzheimera dotyczył 51 letniej kobiety, u której klinicznie rozpoznano otępienie, a w jej mózgu badanie histopatologiczne wykazało obecność blaszek starczych i zwyrodnienia neurofibrylarnego. Alzheimer (1907) sugerował, że obserwowane przyżyciowo otępienie było u chorej związane bezpośrednio z obecnością BS i ZN w mózgu, struktur patologicznych o nieznanym poprzednio znaczeniu. Sądził on, że zanik kory mózgu związany był z występowaniem srebrochlornych blaszek starczych i neuronów z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego. Pomimo, że Amaducci i wsp.(1991) sugerowali, że pierwszy oryginalny przypadek choroby Alzheimera był w istocie przypadkiem leukodystrofii metachromatycznej hipoteza ta mimo niewątpliwych cech prawdopodobieństwa nie wpłynęła na zmianę nazwy schorzenia.

W 1911 roku Simchowicz opisał trzecią zmianę patologiczną występującą w mózgach ludzi z przyżyciowymi objawami demencji - zwyrodnienie ziarnisto-wodniczkowe neuronów warstwy piramidowej hipokampa. Było ono traktowane następnie przez niektórych autorów jako jeden z istotnych diagnostycznych elementów patomorfologicznych choroby Alzheimera (Ball 1977, Ball, Lo 1977, Tomlinson, Kitchener 1982).

Również w roku 1911 Fuller przedstawił pełną charakterystykę morfologiczną blaszki starczej. Dopiero jednak Divry (1927) określił amyloid jako podstawową substancję, wchodzącą w skład BS.

Termin kongofilnej angiopatii oznacza gromadzenie się złogów amyloidowych w ścianach tętnic, a w przypadkach szczególnego nasilenia procesu patologicznego również i w żyłach. Zjawisko to scharakteryzował dokładnie Fischer już w 1910 roku. Zwyródnienie amyloidowe małych tętniczek zostało określone przez Scholza (1938) jako "Drusige Entartung der Arterien und Capillaren" i następnie przez Morela (1946) jako - "Dyshoric angiopathy".

KA występuje jako cecha charakterystyczna także w przypadkach amyloidozy wrodzonej z krwotokami typu holenderskiego i islandzkiego (Wattendorff i wsp. 1982, Palsdottir i wsp. 1989).

Jeden z pierwszych klinicznych opisów choroby Alzheimera w piśmiennictwie polskim pochodzi z roku 1913. Był to przypadek przedstawiony przez Bornsteina na posiedzeniu naukowym neurologów i psychiatrów w szpitalu na Czystym w Warszawie.

Występowanie złogów amyloidu i zwyrodnienia neurofibrylarnego w przebiegu starzenia się fizjologicznego

Zjawiskiem zasługującym na podkreślenie jest fakt, że złogi amyloidu a znacznie rzadziej zwyrodnienie neuronów typu alzheimerowskiego występują w mózgach w przebiegu tzw. fizjologicznego starzenia się - w liczbie rosnącej z wiekiem, zwłaszcza po 80 roku życia (Coria i wsp. 1988, Arriagada i wsp. 1992). Nie rozstrzygnięto, dotychczas czy obecność neuropatologicznych zmian typu alzheimerowskiego jest przejawem starzenia się mózgu tzw. fizjologicznego (Terry i wsp. 1987, Jellinger 1995), czy też jest

wyrazem procesu patologicznego (Alafuzoff i wsp. 1987b, Mann i wsp. 1987, Kaztman i wsp. 1988, West i wsp. 1994). Występowanie w mózgu starym amyloidu nie pozwala odpowiedzieć na pytanie, czy jest to amyloid typowy dla wieku starczego, czy też charakterystyczny dla chA (Spillantini i wsp. 1989). Wiadomo bowiem, że jest to związek w obu przypadkach identyczny także pod względem immunohistochemicznym. Wyprodukowane przez Daviesa (Hyman i wsp. 1988, Love i wsp. 1988) przeciwciała Alz 50 traktowane początkowo jako różnicujące amyloid starczy od alzheimerowskiego, okazało się później (Książak-Reding i wsp. 1988ab, Nukina i wsp. 1989) nie być przeciwciałem skierowanym przeciw swoistemu dla chA amyloidowi a przeciw patologicznemu białku cytoskeletonu - tau, występującemu w wieńcu BS w przypadkach, w których neurony wykazują cechy zwyrodnienia neurofibrilarnego.

Przeważa obecnie pogląd, że blaszki starcze stwierdzane w mózgach ludzi starych nie powodują objawów choroby do momentu, w którym nie dojdzie do przekroczenia progowej liczby tych zmian w ośrodkowym układzie nerwowym (oun); jej przekroczenie powoduje pojawienie się klinicznego zespołu otępiennego (Blessed i wsp. 1968, Dayan 1970ab, Morris i wsp. 1989, Bruce i wsp. 1992).

Wobec powszechności zjawiska, niektórzy autorzy uważają, że białko amyloidowe jest substancją "ze zużycia", zbędną w komórce lub niemożliwą do przetworzenia i usuwaną do neuropilu (Esch i wsp. 1990, Palmert i wsp. 1990ab). W tym kontekście liczne przypadki, w których stwierdza się znaczne nagromadzenie BS, bez klinicznych cech otępienia należałoby traktować jako przypadki przedkliniczne (Ulrich 1982, Crystal i wsp. 1988).

Blaszki starcze i neurony z cechami zwyrodnienia neurofibrilarnego poza starzeniem fizjologicznym i chA, opisywano również w innych chorobach zwyrodnieniowych oun przebiegających nawet bez cech otępienia (Wiśniewski i wsp. 1979). Amyloid stwier-

dzono także w mózgach starych ssaków takich jak: psy (Osetowska 1966, Wiśniewski i wsp. 1970a, Ishihara i wsp. 1991), niedźwiedzie (Cork i wsp. 1988) czy małpy naczelne (Selkoe i wsp. 1987).

W opinii wielu autorów istotne znaczenie ma nie tylko liczba złożeń amyloidowych w ośrodku ale również topografia ich występowania (Hirano, Zimmerman, 1962, Mann 1991). Nie udało się jednak dotychczas określić typowej mapy BS i ZN, która byłaby charakterystyczna dla mózgu chorego z otępieniem. Większość autorów uważa, że zajęcie przez proces patologiczny hipokampa (Akiyama i wsp. 1990, Kalus i wsp. 1989) powoduje zaburzenia pamięci (Ball i wsp. 1983, 1985, Hyman i wsp. 1984, 1986, Armstrong i wsp. 1992ab, Davies i wsp. 1992, Barski i wsp. 1992, Jellinger 1994). Wiadomo jednak, że uszkodzenie kory nowej może niekiedy wyprzedzać pojawienie się zmian w hipokampie (Mann i wsp. 1985).

Od 1993 roku stosuje się w celach neuropatologicznej diagnostyki chA kryteria stopniowania narastania zmian typu alzheimerskiego opracowane przez Braak i wsp. (1993). Stopniowanie to opiera się na korelacji zaawansowania cech otępienia stwierdzanych w badaniu klinicznym i nasilenia zmian neuropatologicznych w zakresie hipokampa i kory śródwęchowej z podpórką. Autorzy metody uważają, że najwcześniejsze zmiany pojawiają się w korze śródwęchowej i hipokampie a następnie dopiero w korze nowej - w płatach skroniowych i czołowych (Braak i wsp. 1993).

Znane są jednakże przypadki otępienia z wybiórczym zajęciem płatów czołowych (Foster i wsp 1983, 1984), skroniowych (Wilcock 1983), potylicznych (Leuba, Kraftsik 1994) a nawet wyłącznie jąder podkorowych (Mc Geer i wsp. 1984, Masliah i wsp. 1989, Braak, Braak 1990). Przypadki te budzą wątpliwość czy rzeczywiście hipokamp i kora śródwęchowa są jedynymi strukturami, których zajęcie przez amyloidowe złoże prowadzi do zaburzeń pamięci (Hyman i wsp. 1987). Między innymi badania Papaso-

zomenosa (1989) oraz Giannakopoulosa i wsp. (1994) i Vereecken'a i wsp. (1994) wykazały, że w przypadkach, w których otępienie trwało bardzo krótko zwyrodnienie neurofibrylarne występowało wyłącznie w jądrach migdałowatych. Liczni autorzy wskazują także, że zwyrodnienie alzheimerowskie może dotyczyć również innych struktur oon; na przykład jąder szwu, albo jąder miejsca sinawego (Tomlinson i wsp. 1981, Bondareff i wsp. 1987). Istotne znaczenie może mieć także zajęcie przez proces patologiczny jądra Meynerta, wraz z podpórką i warstwą komórek piramidowych hipokampa. Wraz z zaawansowaniem procesu patologicznego neurony z cechami ZN znajdowano we wszystkich strukturach istoty szarej oon.

Przedmiotem zainteresowania wielu autorów jest także zróżnicowanie nasilenia zmian alzheimerowskich w obrębie kory nowej, ze względu na istnienie i położenie krótkich połączeń międzyneuronalnych, których przerwanie prowadzi bez wątpienia do upośledzenia przekazywania sygnałów neuronalnych. Stwierdzono przy tym, że najwięcej zmian amyloidowych grupuje się w rowkach, a znacznie mniej na szczycie zakrętów (Gentelman i wsp. 1992, Markowitsch, Tulving 1995).

Oprócz nieustalonej jak dotąd typowej dla chA topografii charakterystycznych zmian patologicznych nie rozstrzygnięto również, jakie jest progowe ilościowe nasilenie BS i ZN niezbędne dla ujawnienia się wyraźnych niedoborów pamięci. Znanych jest jednakże współcześnie kilka skal mających służyć temu celowi.

Między innymi od 1985 roku obowiązują neuropatologiczne kryteria Khachaturiana, definiujące rozpoznanie chA. Według nich dla rozpoznania chA w poszczególnych przedziałach wieku liczba blaszek starczych przypadających na 1 mm² powierzchni kory powinna być większa niż: 2 - 5 w grupie poniżej 50 roku życia, 8 w wieku 50-65 lat, 10 pomiędzy 66 do 75 roku życia, 15 powyżej 75 roku życia.

Kryteria Khachaturiana (1985) przyjęto dla zmian ujawnionych przy pomocy impregnacji srebrowej. Nie mogą być one obecnie uznane za jedyne, w związku z rozwojem znacznie czulszych technik immunohistochemicznych. Obecnie, oprócz kryteriów Khachaturiana, stosowane są także kryteria CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease). Są one również oparte o metody klasyczne. Nie ma natomiast nadal ogólnie przyjętych wartości liczbowych, które charakteryzowałyby chA w oparciu o badania immunohistochemiczne (Wiśniewski i wsp. 1989ab, Vallet i wsp. 1992). Są jednakże podejmowane próby powiązania ilościowej definicji chA z wynikami badań immunohistochemicznych. Jedną z nich jest skala Paulusa i wsp. (1992).

Ciągle otwartym a wymagającym wyjaśnienia zagadnieniem jest podstawowe pytanie, czy istotnie przyczyną otępienia jest gromadzenie się amyloidu w mózgu (Katzman i wsp. 1988), czy też otępienie pojawia się tylko wówczas, gdy oprócz amyloidu występują również neurony z cechami zwyrodnienia neurofibrilarnego (Wilcock, Esiri 1982, Bierer i wsp. 1995). Nie wiadomo nadal czy blaszki starcze i ZN mogą występować oddzielnie w chA, czy też istnieje czasowa zależność między ich pojawieniem się.

Wysunięto liczne hipotezy opisujące prawdopodobny przebieg procesów patologicznych prowadzących w efekcie do otępienia. Jedną z nich lansowaną między innymi przez Wiśniewskiego i wsp. (1989c) zakłada, że amyloid odkłada się pierwotnie w mózgu a następnie wtórnie, przez jego mechaniczną obecność w neuropilu, lub poprzez działanie toksyczne (Yanker i wsp. 1989) dochodzi do śmierci neuronu, poprzedzonej patologicznym wyrodnieniem białek cytoskeletonu przejawiającym się w postaci zwyrodnienia neurofibrilarnego (ZN). Równocześnie zakładano odwrotny przebieg wydarzeń, to znaczy patologiczny proces miałby zaczynać się od zwyrodnienia neurofibrilarnego neuronów, a efektem uszkodzenia komórek nerwowych byłoby odkładanie się amyloidu w neuropilu (Masters i wsp. 1985a, Bancher, Jellinger 1994).

Od kilku lat grupa Terrego (Samuel i wsp 1994ab) lansuje pogląd, że powodem otępienia nie jest zanik neuronów w następstwie odkładania się amyloidu i zmian w cytoskeletonie komórki lecz wyłącznie znaczne zmniejszenie liczby neuronalnych połączeń synaptycznych (Masliah i wsp. 1990, 1991, 1992, Lassman i wsp. 1992). Wiadomo, że w przebiegu chA gnie około 40% zakończeń presynaptycznych w II, III i V warstwie kory czołowej, skroniowej i ciemieniowej. Najwyraźniejszy związek spadku liczby synaps i nasilenia otępienia wykazano w przypadku zmian w korze czołowej (Masliah i wsp. 1992, Scheff, Price 1993). Ci sami autorzy dowodzą, że zmiany patologiczne synaps wyprzedzają pojawianie się histopatologicznych wykładników typowych dla chA. Stwierdzono ścisły związek pomiędzy nadmierną ekspresją neuronalną dla amyloidu i patologicznych białek cytoskeletonu w hipokampie i w korze śródwęchowej a 20% spadkiem liczby zakończeń presynaptycznych wyznaczonych immunohistochemicznie przez synaptofizynę (Masliah i wsp. 1994ab, Heinonen i wsp. 1994).

Ubytek liczby połączeń synaptycznych, w tym przede wszystkim cholinergicznych, łączy się ściśle z tak zwaną "cholinergiczną" teorią choroby Alzheimera. Bowen (1976) ^{AChE} wykazał, że w przebiegu choroby Alzheimera spada w mózgu zawartość acetylotransferazy cholinowej i acetylocholinyl, sugerując związek tego zjawiska ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym w neuronach jądra Meynerta (Whitchose i wsp. 1981, Wilcock i wsp. 1982, Cooper 1994, Samuel i wsp. 1994ab). W oparciu o teorię "cholinergiczną" chA. Potter i wsp. opracowali przyżyciowy test w chA. Udowodnili oni nadwrażliwość źrenicy na tropikamid u pacjentów z grupy ryzyka, nawet na 4 lata przed zachorowaniem (wg. Barinaga 1994).

Bardzo istotny jest także fakt, że w chorobie Alzheimera poza spadkiem stężenia acetylocholinyl występuje ponadto deficyt innych substancji przekąźnikowych takich jak: noradrenalina, serotonina, dopamina, GABA i innych biologicznie aktywnych związków

jak: somatostatyna, neuropeptyd Y, substancja P (Clevens, Beal 1989). Podejmowane, w oparciu o te spostrzeżenia próby leczenia substytucyjnego przyniosły dotychczas tylko ograniczone wyniki (Davies, Powchik 1995). Obok uzupełniania poziomu acetylocholin w oun, próbowano pośrednio oddziaływać na produkujące ją komórki.

Pewne nadzieje w tym zakresie wiąże się z grupą substancji uznanych za czynniki wzrostu. Jest znanym faktem, że neuronalny czynnik wzrostu - NGF (Nerve Growth Factor) bierze udział w rozwoju i zachowaniu biologicznej integralności szeregu ugrupowań neuronalnych w tym ośrodkowych neuronów cholinergicznym (Clarris i wsp. 1994, Olson i wsp. 1994), a ich zanik wiązany jest z niedostatkim NGF. Warto przy tym podkreślić, że NGF wykryto pierwotnie w neuronach hipokampa i kory nowej, w polach projekcji komórek jądra Meynerta. Interesujące wydaje się również przypomnienie że już w 1928 roku Cajal zwrócił uwagę na obecność czynników troficznych w złoгах amyloidu blaszki starczej. W blaszce starczej poza NGF stwierdzono również obecność innych substancji troficznych takich jak naskórkowy czynnik wzrostu - EGF (Epidermal Growth Factor) [Birecree i wsp. 1988], mózgowy czynnik troficzny - BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), neurotrofiny 3 i 4 (Drago i wsp. 1994) a także fibroblastyczny czynnik troficzny - bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) [Cummings i wsp. 1993]. Niewątpliwie złożony i w wielu aspektach niejasny udział czynników wzrostu w patogenezie chA wymagać będzie jeszcze dalszych wielostronnych badań zanim będzie można podjąć realne próby ich wykorzystania w leczeniu pacjentów.

Ostatnie lata przyniosły koncepcję wiązania zaniku neuronów w chorobie Alzheimera z toksycznym działaniem tlenku azotu (NO) (Seiler 1993), a jeszcze wcześniej z toksycznym wpływem aminokwasów pobudzających i zaburzeniami wewnątrzkomórkowej homeostazy jonów wapnia (Mattson i wsp. 1991, 1992, Beal 1992, Weiss i wsp. 1994,

Ellison 1995). Wiadomo przy tym, że rozpuszczalny fragment β -amyloidu jest czynnikiem obronnym przeciw działaniu kwasu glutaminowego a także bezpośrednio obniżającym poziom jonów wapnia wewnątrz komórki (Bodovitz i wsp. 1995).

Amyloid - budowa i występowanie

Przy założeniu, że przyczyną chA jest odkładanie się włóknikowego amyloidu w ośrodkowym układzie nerwowym najprostszą drogą do zrozumienia patogenyzy choroby Alzheimera wydawało się poznanie struktury cząsteczki amyloidu mózgowego (Kidd i wsp. 1985ab) i dróg jego degradacji. Pod względem budowy chemicznej amyloid jest glikozylowanym białkiem (glikoproteidem), zawierającym dodatkowo glikozaminoglikany (Dyrks i wsp. 1988, Snow i wsp. 1987, 1988). Jego właściwości fizykochemiczne, wyrażające się dwułamnością w świetle spolaryzowanym po zabarwieniu czerwienią Kongo i fluorescencją po wybarwieniu tioflawiną S wykorzystywano i wykorzystuje się w jego charakterystyce histochemicznej. W badaniu ultrastrukturalnym włókienka amyloidu mają średnicę 8-10 nm. Strukturalnie charakteryzuje się on konformacją β .

Glenner i Wong (1984a) posłużyli się białkiem amyloidowym pochodzącym z oponowych naczyń mózgowych dla określenia składu aminokwasowego amyloidu. Zsekwenconowane przez nich białko amyloidowe składające się z 40-42 aminokwasów zostało nazwane β -peptydem A4 (β -amyloid) (Glenner i Wong 1984 ab). Jest ono, częścią znacznie większej cząsteczki białka prekursorowego (Amyloid precursor protein - APP). Funkcja biologiczna białka prekursorowego amyloidu nie jest dotychczas wyjaśniona. Hipotetycznie przypisuje się mu wpływ na proliferację komórek, udział w międzykomórkowej adhezji, oddziaływanie na odrost neurytów (sprouting), na plastyczność sy-

naps oraz uczestnictwo w przekazywaniu sygnałów komórkowych (Smith, Anderton 1994). W okresie kolejnych trzech lat sklonowano cDNA a następnie gen komórkowy dla APP (Goldgaber i wsp. 1987, Kang i wsp. 1987, Robakis i wsp. 1987 ab, Tanzi i wsp. 1987 ab). Gen dla APP został zlokalizowany na chromosomie 21. Znane jest przynajmniej kilkanaście różnych izoform APP; powstających w wyniku różnicowego cięcia i składania pierwotnego transkryptu genu dla APP. Są to izoformy określone liczbą aminokwasów jako APP-365, APP-563, APP-695, APP-714, APP-751 i APP-770, przy czym nie wszystkie z nich zawierają β -amyloid jako część składową.

Beta-amyloid występuje w neuropilu w postaci włóknkowej po uwolnieniu z błon, w których umocowana jest cząsteczka APP. Agregacja włókienek β -amyloidu następuje tylko wówczas kiedy dojdzie do uszkodzenia komórkowej błony lipidowo-białkowej i uwolnienia błonowej części APP. Dwadzieścia osiem aminokwasów wchodzących w skład cząsteczki β -peptydu znajduje się na zewnątrz błony, a 11-14 aminokwasów stanowi jego część wewnątrz błonową.

Dzięki badaniom Yankera i wsp. (1989,1990) i innych autorów wśród, których wymienić należy: Carette i wsp. (1993), Sopher i wsp. (1994), wiadomo, że toksyczny fragment β -amyloidu odpowiada odcinkowi zawartemu pomiędzy 25 a 35 aminokwasem cząsteczki. Uważa się przy tym, że β -amyloid poza działaniem toksycznym wykazuje właściwości troficzne (Calligaro i wsp.1993, Pauwels i wsp. 1993). Na podstawie badań Pike'a i wsp. (1993), oraz Soto i Frangione'go (1995) wiadomo, że β -amyloid wchodzący w skład rdzenia blaszki starczej zbudowany jest z 42-43 aminokwasów podczas gdy amyloid tworzący śródścienne złoże naczyniowe (kongofilna angiopatia) utworzony jest w przeważającej liczbie przypadków przez łańcuchy krótsze o długości 39-40 aminokwasów. Wydłużenie amyloidowego łańcucha aminokwasowego zwiększa jego

zdolność do wytrącania się w postaci włókienkowej (Mullan i wsp. 1993). Badania mikroskopowo-elektronowe naczyń ze zlogami amyloidu w kongofilnej angiopatii wykazały dwójaki amorficzny i włókienkowy charakter amyloidu naczyniowego. Jego śródściemne gromadzenie prowadzi wtórnie do zwyrodnienia komórek śródblonka (Wiśniewski i wsp. 1992). Komórką stanowiącą źródło amyloidu jest komórka mięśniówki gładkiej (Shoji i wsp. 1990, Frąckowiak i wsp. 1994, Wiśniewski i wsp. 1995). Wskazują na to badania prowadzone na pozaustrojowej hodowli mięśniówki gładkiej naczyń psów. Wiśniewski i Węgiel (1994) uważają, że przemiana amyloidu amorficznego we włókienkowy odbywa się w błonie podstawnej naczyń. Nie ma jednakże danych pozwalających na jednoznaczne przyjęcie, że amyloid produkowany przez komórki ściany naczynia jest jedynym źródłem amyloidu blaszek starczych. Wiadomo natomiast, że wtórnie do kongofilnej angiopatii mogą rozwijać się zmiany patologiczne takie, jak rozlane uszkodzenie istoty białej typu Binswagera (Yoshimura i wsp. 1992).

Białko prekursorowe amyloidu (APP):

pochodzenie i przetwarzanie

Jak wspomniano poprzednio gen odpowiedzialny za produkcję amyloidu znajduje się na chromosomie 21 (Kang i wsp. 1987). Okazało się jednak, że tylko u chorych z rodzinną postacią chA o wczesnym początku, mutacje genu dla APP znajdującego się na długim ramieniu chromosomu 21 są przyczyną wystąpienia choroby (Dyrks i wsp. 1988, George-Hyslop i wsp. 1987, Tanzi i wsp. 1987ab, Van Broeckhoven i wsp. 1987). W niektórych przypadkach gen "wspomagający" może znajdować się także na chromosomie 1 (SMT 2), 14 (S 182) lub 19 (Apo E). Dla innych, bez porównania częstszych, sporadycznych przypadków chA nie znaleziono w ogóle genu odpowiedzialnego za po-

jawienie się tej cechy choroby (Tanzi i wsp 1987ab). Poza chorobą Alzheimera o wczesnym początku dziedziczność amyloidozy mózgowej udowodniono dla wrodzonej amyloidozy przebiegającej z krwotokiem mózgowym typu holenderskiego (hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of the Dutch type, HCHWA-D) i islandzkiego (hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of Icelanding type, HCHWA-I). HCWA-I i HCHWA-D charakteryzują się odkładaniem złożeń amyloidu w ścianach naczyń, których uszkodzenie jest przyczyną spontanicznych wylewów krwawych. We wrodzonej amyloidozie typu islandzkiego (128 przypadków z 8 znanych rodzin) złoże amyloidu znajdują się w naczyniach wszystkich kalibrów, w lokalizacji zarówno korowej jak i oponowej. Masywne krwotoki mózgowe pojawiają się już około 40 roku życia. W badaniu neuropatologicznym tych przypadków nie stwierdza się blaszek starczych ani neuronów z cechami zwyrodnienia neurofibrilarnego (Gudmundsson i wsp. 1972, Wattendorf i wsp. 1995). We wrodzonej amyloidozie typu islandzkiego złoże amyloidowe utworzone są z cystatyny C - białka stanowiącego inhibitor lizosomalnych proteaz cysteinowych. Błąd genetyczny leżący u podłoża zespołu polega na zamianie leucyny przez glutaminę, co związane jest z mutacją kodonu 68 genu normalnej cystatyny (Ghiso i wsp. 1986). W amyloidozie typu holenderskiego, w przeciwieństwie do islandzkiej krwotoki pojawiają się pomiędzy 50 a 60 rokiem życia, a badanie neuropatologiczne ujawnia obecność blaszek starczych w neuropilu (Maat-Schieman i wsp. 1992, 1994). Poznana została również mutacja genu dla APP, w której występuje zamiana glutaminy na kwas glutaminowy na pozycji 22 β -amyloidu (Wattendorff i wsp. 1982). W chorobie Downa, w przypadkach o długim przeżyciu pojawiają się zawsze alzheimerowskie zmiany neuropatologiczne w postaci blaszek starczych i zwyrodnienia neurofibrilarnego w mózgu (Jervis i wsp. 1948, Wiśniewski i wsp. 1985, Mann 1989a). Można było więc założyć, że wobec trisomii chromosomu 21 (Delabar i wsp. 1987) gen dla amyloidu wy-

stępuje w tych razach potrójnie (Rumble i wsp. 1989). W chorobie Alzheimera uszkodzenie byłoby natomiast "łagodniejsze" wobec nie występowania trzech kopii genu. Hipotezie tej zaprzeczają jednak sporadyczne przypadki chA, w których demencja pojawia się znacznie później i u których nie stwierdza się mutacji w obrębie genu APP na chromosomie 21 (Podlisny i wsp. 1987).

Genetyczne podłoże procesu udowodniono przede wszystkim dla przypadków rodzinnych chA, u których objawy otępienia pojawiają się pomiędzy 30 a 40 rokiem życia (Breitner, Folstein 1984, Devine-Gage i wsp. 1988). W ostatnim okresie poznano dalsze mutacje genu APP na chromosomie 21: 1/ APP (kodon 717) z zamianą waliny na izoleucynę, opisana przez Goate i wsp. (1991) jako rodzinna choroba Alzheimera - FAD 1, (Familial Alzheimer disease); 2/ APP (kodon 717) z zamianą waliny na fenyloalaninę - FAD 2 (Murell i wsp. 1991, Mann i wsp. 1992a); 3/ APP (kodon 717) z walina zastąpioną przez glicynę - FAD 3 (Chartier-Harlin i wsp. 1991).

Kolejny etap badań fenotypowych stanowiły poszukiwania mRNA dla β -amyloidu (hybrydyzacja *in situ*) prowadzone przez Ponte i wsp. (1988), a także przez Cohen'a i wsp. (1988), Kitaguchi i wsp. (1988), Tanzi i wsp. 1988) i in., które wykazały występowanie mRNA dla β -amyloidu niemal we wszystkich komórkach ośrodkowego układu nerwowego w tym w neuronach i komórkach glejowych oraz w strukturalnych składnikach ściany naczyniowej: śródbłonkach i w mięśniówce.

Badania immunohistochemiczne prowadzone przy zastosowaniu swoistych przeciwciał przeciwko różnym fragmentom prekursora amyloidu, nie pozwoliły na jednoznaczne wskazanie komórki, która byłaby odpowiedzialna pośrednio lub bezpośrednio za jego produkcję. W badaniach tych wykazywano związek amyloidu zarówno z komórką nerwową (Masters i wsp. 1985b, Neve i wsp. 1988, Armstrong i wsp. 1995), jak i mikroglejem i astroglejem (Joachim i wsp. 1991, Mc Geer i wsp. 1988ab, Haass i wsp. 1992).

Przy czym białko prekursorowe dla β -amyloidu występuje powszechnie zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym, jak i w innych narządach i tkankach (Joachim i wsp. 1989a, Spillantini i wsp. 1989).

źródło
inne
2) źródło
3) mikro
ostrodę
Hipoteza wskazująca komórkę nerwową jako główne źródło patologicznego białka prekursorowego, które ostatecznie odkłada się w neuropilu w postaci włóknikowego amyloidu, była wysuwana już poprzednio (Neve i wsp. 1988). Użycie technik genetycznych pozwoliło na wyhodowanie myszy transgenicznej z genem amyloidu na chromosomie 16. Obserwacje poczynione w tym modelu wskazują jeszcze raz na neuron jako źródło prekursora (Kawabata i wsp. 1991, Mann i wsp. 1992a). Jednakże tylko w materiale Games i wsp. (1995) uzyskano przekonywujące złogi amyloidu w neuropilu, identyczne z blaszkami starczymi u ludzi.

Z drugiej strony istnieją liczne dane wskazujące na nie neuronalne pochodzenie białka prekursorowego amyloidu. Glenner (1985) przyjmuje pochodzenie amyloidu z surowicy krwi, szereg autorów za jego głównego producenta uważa komórkę mikroglejową (Mc Geer i wsp. 1988ab, Wiśniewski i wsp. 1990, 1991b, Banati i wsp. 1993, Bucland i wsp. 1993) albo astroglejową (Abraham i wsp. 1988). Na ile hipoteza, że komórka mikrogleju jest miejscem wytwarzania włókien amyloidowych jest dyskusyjna (Ohgami i wsp. 1991), na tyle nie podlega dyskusji fakt, że jest ona źródłem enzymów proteolitycznych i cytokin, których niewłaściwe działanie może doprowadzić do odkładania włóknikowego amyloidu w neuropilu (Shea 1995). Poszukiwania białka prekursorowego w surowicy krwi prowadzone już w latach osiemdziesiątych (Glenner, Wong. 1984ab) podejmowano między innymi w oczekiwaniu, że pozwolą one na opracowanie przyżyciowego, diagnostycznego testu z surowicy krwi (Bush i wsp. 1992, Zlokovic i wsp. 1993). Oznaczanie stężenia β -amyloidu w płynie mózgowo-rdzeniowym, chociaż budzące zastrzeżenia natury etycznej, będzie miało zapewne w przyszłości istotne znaczenie diag-

nostyczne (Pahnert i wsp. 1990b). Wobec istnienia bariery krew-mózg oznaczanie białek charakterystycznych dla patologii alzheimerowskiej w płynie mózgowo-rdzeniowym wydaje się bowiem bardziej zasadne (Pahnert i wsp. 1990b, Ghiso i wsp. 1989, Van Nostrand i wsp. 1992).

Nie ma dowodów na to, że chA spowodowana jest zakażeniem wirusowym lub innym czynnikiem zakaźnym. Waga tego zagadnienia pojawiła się z chwilą poznania innej amyloidozy mózgowej PrP-dodatniej, w której udowodnione zostało działanie przekazywalnego czynnika "infekcyjnego" (Gajdusek 1966, Liberski 1993). Istnieje wiele podobieństw w patogenezie obu amyloidoz, podobnie jak i w obrazie fenotypowym chA (nieprzekazywalna amyloidoza β -amyloidowa) i chorobami należących do amyloidoz przekazywalnych, spowodowanych przez prion, do których należy u ludzi choroba Creutzfeldta-Jakoba (CJD) i choroba Gerstmannna-Straüsslera-Scheinkera, (GSS) (Cook i wsp. 1994). Opisano przy tym przypadki współwystępowania choroby CJD i choroby Alzheimera (Liberski i wsp. 1987, Barcikowska i wsp. 1995), a także wiele przypadków CJD i chA rozpoznanych błędnie przyżyciowo, ze względu na znaczne podobieństwo kliniczne obu zespołów.

W 1988 roku wykazano, że w skład białka prekursora amyloidu wchodzi tzw. białko Kunitza - inhibitor proteazy (Castano, Frangione 1988, Kitaguchi i wsp. 1988, Ponte i wsp. 1988, Tanzi i wsp. 1988). Odkrycie to zwróciło uwagę na rolę inhibitorów proteaz w przetwarzaniu białka prekursorowego. APP-751 i APP 770 zawierają dodatkowo 56-76 aminokwasowe wstawki, częściowo homologiczne z inhibitorem proteazy serynowej typu Kunitza (Hyman i wsp. 1992, Lador i wsp. 1994). Już wcześniej przy użyciu metod immunohistochemicznych wykazano obecność α -anty chemotrypsyny w blaszce starczej a także w komórkach nerwowych i glejowych (Gloor i wsp. 1986, Abraham i wsp. 1988, Shoji i wsp. 1991, Miyakawa i wsp. 1992b). Badania Kitaguchi

i wsp. (1988, 1990) wykazały, że duża część fragmentu końcowego NH₂ APP-751 i APP-770 jest identyczna z inhibitorem proteazy serynowej - neksyny-11 (Tanzi i wsp. 1988, Von Nostrand i wsp. 1989, 1990, Oltersdorf i wsp. 1989, Shea 1995).

Badania immunohistochemiczne wykazały występowanie w złogach amyloidu także innych białek, w tym katepsyny (Cataldo i wsp. 1994), komponentu P (Coria i wsp. 1987) i frakcji komplementu (Eikelenboom i wsp. 1982), a także acetylocholinesterazy (Gomez-Ramos i wsp. 1992).

Ustalenie, które z układów enzymatycznych powodują wtórne wytrącanie się amyloidu w postaci włókienkowej poprzez szczególne "wycięcie" z błony komórkowej β -amyloidu ma podstawowe znaczenie dla wyjaśnienia patogenyzy chA. Większość autorów uważa, że we włókienkowej agregacji amyloidu najistotniejsze znaczenie ma hydrofobowy końcowy C-fragment β -amyloidu w przeciwieństwie do hydrofilnego fragmentu N-końcowego β -amyloidu (Smith, Anderton 1994, Yang i wsp. 1994). Pewną rolę w procesie agregacji odgrywa także glikozylacja β -amyloidu zachodząca w trakcie jego przemian (Mattson i wsp. 1995). Znane są dwie drogi przetwarzania APP, pierwsza fizjologiczna zwana drogą α -sekreazy (Shoji i wsp. 1992, Sisodia 1992), prowadząca do uwalniania rozpuszczalnego APP a druga patologiczna, zwana drogą β -sekreazy, której efektem jest odkładanie włókienkowej postaci amyloidu w neuropilu (Selkoe 1994, Smith, Anderton 1994). Rozpuszczalny "produkt" prawidłowej degradacji APP występuje w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym zarówno u ludzi zdrowych jak i w chA, w tym ostatnim przypadku w mniejszej ilości (Pirttila i wsp. 1994). Uwalnianie fragmentu β -amyloidu zachodzi prawdopodobnie na drodze alternatywnej, prowadzącej do wytworzenia dwu nowych białek w obrębie β -peptydu; β -amyloidu i białka P3. Białko P3 zawiera aminokwasy od 17 do 40 wchodzące w skład β -amyloidu (Bodovitz

i wsp. 1995). Poza przedstawionymi powyżej wewnątrzcząsteczkowymi przemianami APP istnieje również droga jego fizjologicznej wewnątrzkomórkowej degradacji zachodzącej w układzie lizosomalno-endosomalnym (Cole i wsp. 1989, Schwagerl i wsp. 1995, Zhao i wsp. 1995).

W ostatnim okresie pojawiły się sugestie, że białko prekursorowe amyloidu jest jednym z białek szoku termicznego. W chorobie Alzheimera obserwuje się podwyższenie ich poziomu (Ciallella i wsp. 1984). W niedokrwieniu mózgu stwierdza się podwyższenie zawartości białka prekursorowego amyloidu w neuronach i w głęju (Roberts i wsp. 1991, 1994, Mc Kenzie i wsp. 1994, Graham i wsp. 1995), towarzyszy ono wzrostowi poziomu białek szoku termicznego (Tanno i wsp. 1993). Z badań na materiale ludzkim wiadomo z kolei, że po urazie złogi amyloidu włóknkowego (β -amyloidu) pojawiają się już po 4 godzinach nawet u ludzi bardzo młodych.

W badaniach nad patogenezą amyloidozy mózgowej zasadnicze znaczenie miało wykazanie przez Rosesa i wsp. (1994) udziału apolipoproteiny E (Apo E) w przemianach prekursora β -amyloidu. Gen dla Apo E znaleziono na chromosomie 19 (Roses i wsp. 1994). Apolipoproteina E produkowana jest przez makrofagi i astrocyty (Yamada i wsp. 1995); znajduje się ona także w neuronach (Han i wsp. 1994) i w obrębie złogów amyloidu. Związana jest również z patologicznymi białkami cytoskeletonu, charakterystycznymi dla chA (Namba i wsp. 1992, Saunders i wsp. 1993, Hansen i wsp. 1994, Huang i wsp. 1994, Strittmater i wsp. 1994). Początkowo uważano Apo E jedynie za cząsteczkę współlistniejącą z β -amyloidem. Później przypisywano jej udział w transporcie amyloidu przez barierę krew-mózg (Wiśniewski, Frangione 1992). Obecnie wiadomo że apolipoproteina E sprzężona z fragmentem C-końcowym β -amyloidu bierze aktywny udział w jego agregacji (Wiśniewski i wsp. 1995) a obecność izoformy Apo E4 wydaje się być jedynym znanym molekularnym czynnikiem ryzyka dla chA. Gen dla apo E występuje

w trzech izoformach, tworząc następujące możliwe pary alleli 2/2, 2/3, 3/4, 3/3, 4/4. Para alleli 2/2 wydaje się spełniać w pewnym sensie funkcje ochronne. Nie stwierdza się prawie zupełnie zapadalności na chA wśród ludzi ją posiadających (Oyama i wsp. 1995). Natomiast u osób, które mają dwa allele 4/4 prawdopodobieństwo zachorowania na chA wzrasta czternastokrotnie. Udowodniono związek Apo E z chA i z zespołem Downa (Royston i wsp. 1994ab). Wydaje się, że jest on swoisty, nie stwierdzono bowiem charakterystycznego powiązania rozkładu alleli dla genu Apo E ani z innymi chorobami zwyrodnieniowymi, z amyloidozą np. HCHWA-D (Haan i wsp. 1994) ani też z chorobą Creutzfeldta-Jakoba - amyloidozą PrP, (Nakagawa i wsp. 1995).

Charakterystyka zmian amyloidowych

w chorobie Alzheimerera

Rozwój badań immunohistochemicznych nad patogenezą chA stworzył możliwość opisanie innych form amyloidu w mózgu niż poznane uprzednio w oparciu o jego ujawnianie metodami impregnacji srebrowej. Klasyczny podział (van Braumühl 1956) zakładał następujące etapy rozwoju blaszki starczej. Najwcześniejszym zjawiskiem było pojawienie się w neuropilu blaszki starczej, zwanej blaszką pierwotną, stanowiącej skupisko luźno leżących włókien amyloidu. Kolejną fazę stanowiło przekształcenie się pierwotnej blaszki w klasyczną blaszkę starczą, składającą się z rdzenia zbudowanego z amyloidu, otoczonego wieńcem patologicznie zmienionych wypustek nerwowych. Zakładano, przy tym, że neuryty komórek nerwowych otaczające rdzeń blaszki były wtórnie penetrowane przez włókna amyloidowe i wraz z nimi tworzyły wieńiec blaszki. Ostatnim etapem ewolucji blaszki starczej była tzw. blaszka wypalona, stanowiąca wyłącznie grudkę amyloidu pozbawioną wieńca neurytycznego. Poza neuropilową lokalizację

zacja, amyloid stwierdzono w ścianach naczyń różnego kalibru (KA). Barwienie czerwienią Kongo pozwalało na wykazanie w świetle spolaryzowanym włókienkowej struktury białka amyloidowego, identycznej w BS zlokalizowanych w neuropilu i w ścianach naczyń.

Inny podział BS przedstawił Ulrich i wsp. (1987) wykorzystując do jego sformułowania pewne spostrzeżenia immunocytochemiczne. Wyróżniają oni cztery rodzaje blaszek starczych, określanych jako typ - A, B, C, D. Blaszkki A, B, C zawierają sieć wypustek astrocytarnych, ograniczających je od neuropilu. Blaszkka A nie barwi się surowicami przeciw kłębkom neurofibrylarnym, dodatnią reakcją z tymi przeciwciałami dają natomiast blaszki B i C. Blaszkka D przypomina blaszkę wypaloną opisaną w oparciu o techniki impregnacji srebrowej.

Zastosowanie przeciwciał przeciw β -amyloidowi pozwoliło wyróżnić inne morfologiczne postaci amyloidu w oun (Yamaguchi i wsp. 1988ab). Nowym spostrzeżeniem było wykazanie tzw. amyloidu rozproszonego, uważanego często w oparciu o metody impregnacyjne za zjawisko artefaktyczne. Nie ma on bowiem kształtu uformowanej blaszki starczej. Jest rozlanym złogiem barwiącym się przy użyciu przeciwciał przeciw β -peptydowi. Niektórzy autorzy nazywają amyloid rozlany złogiem amorficznym, niewłókienkowym. Nie jest on widoczny w świetle spolaryzowanym w barwieniu czerwienią kongo ani w fluorescencji z zastosowaniem tioflawiny S. Według Probst (1987) Yamaguchi i wsp. (1988ab, 1990), Rozemuller'a i wsp. (1989a), Joachim i wsp. (1989c), Yamazaki i wsp. (1991, 1992), Miyakawa i wsp. (1992a) stanowi on początkową fazę odkładania się amyloidu w oun. Wtórnie dochodzi do zformowania się z niego blaszki starczej. Amyloid rozproszony występuje najczęściej w korze śródwęchowej, w warstwie drobinowej mózdzku (Kosik i wsp. 1987, Yamazaki i wsp. 1992), a także w korze nowej w jej warstwie podoponowej. Złogi amyloidu rozproszonego, w więk-

szości niewłókienkowego, stwierdzono również poza korą mózgu i jądrami podstawy (Gearing i wsp. 1993). Opisywano je również w istocie białej (Brun, Englund 1986, Englund i wsp. 1988, Yamaguchi i wsp. 1988a). Amyloid rozproszony występuje w sposób typowy w przypadkach zespołu Downa (Amstrong 1994, Royston i wsp. 1994ab). Jest on również charakterystycznym zjawiskiem patologicznym w mózgach psów (Moryś i wsp. 1994a). Złogi amyloiu rozproszonego są widoczne w barwieniach immunohistochemicznych przy użyciu surowic przeciw β -amyloidowi, nie wykazuje się ich natomiast ani w barwieniu czerwienią kongo ani tioflawiną S. Wiśniewski i Węgiel (1994) uważają, że amyloid amorficzny jest amyloidem "łagodnym", nie prowadzącym do uszkodzeń tkankowych a jego forma włókienkowa stanowi formę "złośliwą", odpowiedzialną za szereg zjawisk patologicznych rozwijających się w on.

Zwyrodnienie neurofibrylarne w chorobie Alzheimera

Opisana powyżej klasyczna blaszka starcza zawiera w swoim składzie dwa rodzaje nieprawidłowych białek: rdzeń zbudowany z amyloidu i tworzące wieniec wypustki nerwowe wypełnione patologicznymi białkami cytoskeletonu.

W oparciu o klasyczne barwienia stwierdzono, że część neurytyczna blaszek jest często utworzona przez wypustki komórek nerwowych wykazujących cechy zwyrodnienia neurofibrylarnego (Duyckaerts i wsp. 1988). Już impregnacje srebrowe Bielschowskiego (1904), Gallyasa (1970) czy Yamamoto, Hirano (1986) pozwoliły dość dokładnie scharakteryzować zmiany patologiczne w obrębie cytoskeletonu komórki nerwowej.

W wyniku dezintegracji i patologicznego ufosforylowania mikrotubul i neurofilamentów stanowiących składnik prawidłowego cytoskeletonu komórki nerwowej dochodzi do pojawiania się w jej cytoplazmie zmian o cechach zwyrodnienia neurofibrilarnego.

Zwyrodnienie neurofibrilarne występuje głównie wewnątrzkomórkowo, obserwuje się je także w umiejscowieniu zewnątrzkomórkowym. Obraz mikroskopowo-elektronowy ZN został szczegółowo scharakteryzowany już w latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych (Kidd 1963, Wiśniewski i wsp. 1970b). Znane z mikroskopu świetlnego wewnątrzneuronalne zmiany włókienkowe (NFT - neurofibrillary tangles) składają się w znacznej części z parzystych spiralnie skręconych włókienek (PHF - paired helical filaments), opisanych po raz pierwszy przez Kidda w 1963 a następnie szczegółowo scharakteryzowanych przez Rassol i wsp. (1984). Początkowo, sądzono, że są one wyłącznie włókienkami lewoskrętnymi (Wiśniewski, Wen 1985ab), później stwierdzono, że mogą być one także prawoskrętne (Wiśniewski i wsp. 1986) lub "proste" (Appelt, Balin 1993). Są one najczęściej w sposób niezorganizowany rozmieszczone w cytoplazmie komórki (Ruben i wsp. 1995).

Przez dłuższy okres czasu panowało przeświadczenie, że patologiczne białka szkieletowe są nierozpuszczalne (Iqbal i wsp. 1986ab, Wiśniewski i wsp. 1987), co stanowiło przeszkodę w poznaniu ich składu chemicznego. Pomimo to prowadzono badania nad ich strukturą a ich pierwsze wyniki opublikowano już w 1987 roku (Neve i wsp. 1988). Zapoczątkowane w roku 1987 przez Iqbal'a badania pozwoliły na określenie warunków ich rozpuszczalności. Stworzyło to warunki zasadniczego postępu w ich charakterystyce.

Poświęcone im badania immunohistochemiczne prowadzone są przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciw białkom sprzężonym z parzystymi, spiralnie skręconymi filamentami lub też wchodzącemu w ich skład, białku tau 1 (Delacourte, Dcfossez 1986,

Grundke-Iqbal i wsp. 1986ab, Goedert i wsp. 1988, Wischik i wsp. 1988ab) i ubikwitynic (Mori i wsp. 1987, Perry i wsp. 1987, Love i wsp. 1988).

Prześledzono sekwencje zmian prowadzących do ukształtowania ZN. Według Ban- chera i wsp. (1987) ich pojawienie się poprzedzone jest fazą "0" charakteryzującą się homogennym barwieniem komórki nerwowej surowicą przeciw białku tau 1. Kolejno dochodzi do ukształtowania się ZN w kształcie płomykowatych włókienek, wypełniają- cych cytoplazmę komórki nerwowej. W tym okresie włóknikowy charakter zmian wi- doczny jest również w odczynie z surowicami anty tau 1. Dodatni odczyn z przeciwcia- łami anty tau 1 wykazują także neurytyczne wieńce blaszek starczych, opisane po raz pierwszy w oparciu o impregnację srebrową przez Morela i wsp. w roku 1946 oraz część tzw. cieni ZN (ghost tangles). Cienie ZN stanowią pęczki włókien opisane przez Gorce- vica i wsp. (1986), Wooda i wsp. (1986) położone pozakomórkowo, najprawdopodob- niej na skutek rozpadu błon zwyrodniałych neuronów (Yamaguchi i wsp. 1991a). W późnym okresie procesu chorobowego barwią się one także przy użyciu markerów immunohistochemicznych astro- i mikrogleju (Ikeda i wsp. 1992ab, Cras i wsp. 1995), a także dla β -amyloidu (Yamaguchi i wsp. 1991b).

Charakterystyczne jest ponadto występowanie w neuropilu tzw. nitek neuropilowych tau- i ubikwityno-dodatnich (Braak i wsp. 1986, 1994ab). Są one prawdopodobnie, zwy- rodniałymi wypustkami komórek nerwowych o swoistej budowie białkowej wytwarzają- cymi gęstą sieć w neuropilu (Braak i wsp. 1994ab). Neuryty zawierające PHF występują niekiedy w skupieniach wokół naczyń (Delacourte, Defossez 1986).

Wyodrębniono 6 izoform białka tau, składających się z 352-441 aminokwasów. Cha- rakterystyczną cechą tau jest obecność trzech lub czterech podwójnie ułożonych, powta- rzających się sekwencji, z których każda zawiera sekwencję Pro-Gly-Gly. Sekwencje te tworzą domeny wiążące mikrotubule (Iqbal i wsp. 1987). W celu poznania struktury i roli

białka tau 1 w PHF wyprodukowano liczne przeciwciała przeciw poszczególnym jego fragmentom. Fragment białka tau 1, odporny na działanie pronazy, wydaje się być najmocniej związany z PHF (Kosik i wsp. 1984, 1986, 1988, Wischik i wsp. 1988ab). Dzięki technice hybrydyzacji *in situ* ustalono, że mRNA dla tau 1 występuje w neuronach, nie zawsze jednakże w tych, w których wykazuje się obecność PHF np. w komórkach Purkiniego), a także w komórkach glejowych (Kosik i wsp. 1989).

Wydaje się wysoce prawdopodobne, że w czasie ewolucji zmian neurofibrylarnych dochodzi do ich sprzężenia z ubikwityną, która, jak się przypuszcza, wypiera białko tau 1 (Murti i wsp. 1988, Mori i wsp. 1987). Sugerowana rola ubikwityny - jako białka biorącego czynny udział w syntezie DNA do końca nie jest jednoznacznie wyjaśniona (Herschko, Cicchanower 1986, Fried i wsp. 1987, Jentsch i wsp. 1990). Przypuszcza się, że ubikwityna może być jednym z inhibitorów proteaz (Abe i wsp. 1994, Savedia, Kiernan 1994). Przeciwciała przeciw ubikwitynie wyznaczają ZN, a także cienie ZN i nitki neuropilowe (Ikeda i wsp. 1992ab). Obraz immunohistochemiczny z przeciwciałami anty ubikwitynowymi jest podobny do uzyskiwanego przy użyciu surowicy przeciw białku tau 1. Przypuszcza się również, że ubikwityna może pełnić rolę białka stymulującego amyloidogenezę (Alizadeh-Khiavi i wsp. 1991). Należy brać jednak pod uwagę możliwość, że występowanie ubikwityny może nie mieć cech swoistości. Jest to tym bardziej prawdopodobne ze względu na jej obecność w licznych innych chorobach zwyrodnieniowych (Kosik 1990).

Patologiczne zmiany cytoskeletonu komórki nerwowej mogą pojawiać się jako zjawisko towarzyszące gromadzeniu amyloidu w neuropilu, w sposób charakterystyczny dla chA. Mogą one występować niezależnie od amyloidozy. Opisano je w szeregu procesów chorobowych np. w wodogłowie wrodzonym (Wiśniewski i wsp. 1987). Stwierdzono je w dużej ilości w parkinsonizmie z wyspy Guam (Guiroy i wsp. 1987), w encefalo-

patii bokserów (Hof i wsp. 1992), w parkinsonizmie pozapalnym, w chorobie Hallervordena-Spatza (Wiśniewski i wsp. 1979) i w podoстрыm stwardniającym zapaleniu mózgu - SSPE (Wiśniewski i wsp. 1991a). PHF występują również w stosunkowo niewielkiej ilości w mózgzach ludzi starych nie wykazujących cech otępienia. Opisywano je ponadto w mózgzach zwierząt: małp (Wiśniewski i wsp. 1979), owiec i kóz (Braak i wsp. 1994ab).

Wydaje się, że otępienie pojawia się częściej w przypadkach równoczesnego występowania blaszek starczych i neuronów z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego (Crystal i wsp. 1988, Dickson i wsp. 1988, Arriagada i wsp. 1992). Terry i wsp. (1987) udowodnili, że w wieku starczym powyżej 80 roku życia, znacznie częściej spotyka się cechy amyloidozy mózgzowej niż zwyrodnienie neurofibrylarne.

Strukturami ośrodkowego układu nerwowego, w których ze szczególną predykcją występuje ZN są: hipokamp (Ball i wsp. 1985), jądro miejsca sinawego (Ishino i wsp. 1975), i jądro Meynerta. Nierzadko spotyka się je w wypustkach neuronów w istocie białej mózgz, zwłaszcza w przypadkach znacznego nasilenia procesu patologicznego (Wiśniewski i wsp. 1989d).

W oparciu o badania immunohistochemiczne od dawna poszukiwano wspólnego ogniwa amyloidu blaszek i ZN, uważając, że mogłoby być nim wspólne białko występujące w strukturze obu zmian (Kidd i wsp. 1985a, Iqbal i wsp. 1986a, Joachim i wsp. 1991). W 1987 roku Defossez i Delacourte wysunęli koncepcję, że pierwotnie uszkodzone neurofilamenty przetwarzają się w dalszej ewolucji w amyloid typu alzheimerowskiego. Współwystępowanie NFT i β -amyloidu w jednej komórce zostało opisane przez Spillantini i wsp. (1990). Udowodniono przy tym, że sekrecyjna forma amyloidu stymuluje kinazę białkową, wpływającą na wzmożenie patologicznej fosforylacji białka tau 1. Mogłoby to stanowić wsparcie hipotezy sugerującej istnienie biochemicznego pomostu po-

między patologią amyloidową a zwyrodnieniem neurofibrylarnym neuronów (Lewis i wsp. 1988, Greenberg i wsp. 1994, Mena i wsp. 1995).

Patomechanizm choroby Alzheimera - próba podsumowania istniejących hipotez

Nieznana komórka lub nieznane komórki ośrodkowego układu nerwowego stanowią źródło prekursora amyloidu APP. Mogą być nimi - neuron, komórka astroglejowa, mikroglej, komórki ściany naczyń, lub nawet surowica krwi. Defekt genetyczny prowadzi do patologicznej przemiany białka prekursorowego amyloidu. W efekcie w neuropilu odkłada się włóknkowa, nierozpuszczalna forma amyloidu prawdopodobnie przy udziale β -sekretyazy. Na skutek toksycznego działania amyloidu na neurony, dochodzi do patologicznych przemian białek szkieletowych neuronu (zaburzenie fosforylacji białka tau, i zwolnienie przepływu aksonalnego). Prowadzi to do śródkomórkowego a wtórnie zewnątrzkomórkowego gromadzenia się NFT. Białka te w dalszej kolejności ulegają ubikwitynizacji, a ubikwityna wykazuje między innymi działanie stymulujące wytwarzanie amyloidu (amyloid enhancing factor). Rozpad i ubytek licznych neuronów pociąga za sobą zniszczenie połączeń międzyneuralnych a także wtórnie - niedobór neurotransmiterów, w tym głównie acetylocholino i spadek liczby synaps. W tym okresie w badaniach radiologicznych widoczny jest już zanik mózgu a w obrazie klinicznym chory wykazuje cechy otępienia.

CELE PRACY

Celem przeprowadzonych badań było ustalenie czy odkładające się śródkankowo złogi amyloidowe oraz zwyrodnienie neurofibrylarne, dwa kluczowe zjawiska patologiczne w chorobie Alzheimera, wykazują charakterystyczne dla niej cechy czy też są niezależne od typu procesu chorobowego oraz czy charakter i dynamika towarzyszącego im odczynu glicyjowego pozwoli na określenie jego roli w procesie odkładania się amyloidu w neuropilu.

Cele szczegółowe:

1. Opracowanie metody dla retrospektywnej diagnozy otępienia na podstawie istniejącej dokumentacji lekarskiej.
2. Poszukiwanie komórki produkującej lub przetwarzającej białko prekursorowe amyloidu drogą barwień immunohistochemicznych przy użyciu przeciwciał przeciw 8 syntetycznym fragmentom prekursora, w mózgach osób z chorobą Alzheimera i ludzi bez cech otępienia, a także w mózgach zwierząt. Ocena obecności prekursora w tkankach poza ośrodkowym układem nerwowym u ludzi i zwierząt.
3. Charakterystyka morfologiczna ogniskowych i rozlanych złożeń amyloidu, w neuropilu w oparciu o immunohistochemiczne barwienia przeciw β -peptydowi w mózgach osób z chorobą Alzheimera i u ludzi bez cech otępienia. Określenie wzajemnych zależności pomiędzy blaszkami starczymi a występowaniem neurofibrilarnego zwyrodnienia neuronów w korze nowej i w hipokampie, a także ocena

częstości występowania zmian amyloidowych w warstwach kory w chorobie Alzheimera i zespole Downa w porównaniu ze starzeniem się fizjologicznym. Ocena współlistnienia zmian amyloidowych w przebiegu procesów zwyrodnieniowych nie mających charakteru pierwotnej amyloidozy mózgowej (choroba Parkinsona).

4. Charakterystyka zmian neurofibrylarnych w innych procesach zwyrodnieniowych, w tym w chorobie Parkinsona oraz w starzeniu fizjologicznym, nie spowodowanych przez amyloidozę mózgową, w celu poznania czasowej sekwencji pojawiania się białka tau-1 i ubikwityny.
5. Określenie morfologicznych różnic pomiędzy procesem typu alzheimerowskiego a fizjologicznym starzeniem ośrodkowego układu nerwowego bez cech otępienia.
6. Wyjaśnienie roli gleju gwiaździstego i mikrogleju w patogenezie choroby Alzheimera. Porównanie znaczenia gleju w chA i procesach zwyrodnieniowych innych niż amyloidoza (choroba Parkinsona), a także w pasażowalnych amyloidozach mózgowych, jakimi są choroba Creutzfeldta-Jakoba i Gerstmann-Sträussler-Scheinkera.

MATERIAŁ

1. Wypracowanie metod do retrospektywnej diagnozy otępienia przeprowadzono na podstawie analizy klinicznych historii chorób osób z opóźnieniem rozwoju, zmarłych po 65 roku życia. Spowodowane ono było różnymi przyczynami takimi jak: nieznanymi defekt genetyczny (39 chorych), uszkodzenie okołoporodowe (16), stany po przebytych zapaleniu mózgu i opon (10), inne (5). Z badanej grupy wyłączono przypadki z zespołem Downa. Dokumentacja i mózgi siedemdziesięciu chorych pochodziły z kolekcji Jervis'a*. Chorzy ci byli badani co 3 lata, w trakcie obserwacji w domu opieki. W kolekcji Jervis'a znajdowało się 107 mózgów osób zmarłych w wieku powyżej 65 roku życia ale tylko w siedemdziesięciu przypadkach zgromadzona dokumentacja była kompletna. Przyczyną zgonu w analizowanej grupie chorych był nowotwór złośliwy w 11 przypadkach, obustronne zapalenie płuc w 14, choroby układu krążenia w 24, udary mózgowie w 6 i inne w 15. Otępienie, oceniane retrospektywnie, korelowano z wynikami oceny neuropatologicznej. Badanie neuropatologiczne przeprowadzono w każdym przypadku na skrawkach pobranych z płata czołowego (pole Brodmana - 11-12), skroniowego (pole 21-21), kory ostrogowej (pole 17, 18, 19) oraz kory hipokampalnej wraz z podpórką i korą śródwęchową.

*Kolekcja Jervis'a powstała w latach 1931-1975 w zamkniętym zakładzie psychiatrycznym w Willowbrook, przeznaczonym dla populacji Nowego Jorku. W jej skład wchodziło 2300 mózgów pochodzących od osób z opóźnieniem rozwoju, częściowo wraz z ich dokumentacją.

2. Rozszerzone badania neuropatologiczne mózgów chorych z opóźnieniem rozwoju z przyczyn innych niż choroba Downa, zmarłych w wieku 23 do 90 lat, przeprowadzono w 385 przypadkach. W badanej grupie niedorozwój był spowodowany przez uszkodzenie okołoporodowe - w 89 przypadków, niedorozwój rodzinny (nieznany czynnik genetyczny) w 51 przypadkach, zaburzenia wewnątrzwydzielnicze w 16 przypadkach, wrodzony niedorozwój w 23 przypadkach. W 158 przypadkach etiologia była nieznana. W 112 przypadkach w wywiadzie notowano napady drgawkowe. Poziom ilorazu inteligencji, pochodzący z danych zawartych w dokumentacji pozwolił na podzielenie badanych przypadków na trzy grupy; w grupie pierwszej iloraz inteligencji kształtował się poniżej 35 punktów, w drugiej pomiędzy 35 a 49 punktami, a w trzeciej powyżej 50 punktów. Badanie neuropatologiczne w każdym przypadku przeprowadzono na fragmentach tkankowych pobieranych z półkuli lewej obejmujących; 1. zakręt czołowy prosy (pole Brodmanna 11-12), 2. zakręty górny i środkowy płata skroniowego (pole 21-21), 3. zakręt przyśrodkowy (pole 4), 4. bruzdę ostrogową (pole 17), 5. hipokamp z okolicą parahipokampalną (pole 28 i 34), 6. przednią część jąder podstawy wraz z jądrem Meynerta, 7. pień mózgu, a w niektórych przypadkach 8. - mózdzek.

3. Badania poświęcone poszukiwaniu komórki, stanowiącej źródło białka prekursorowego amyloidu przeprowadzono na pięciu mózgach pacjentów z klinicznie rozpoznaną chorobą Alzheimera, trzech mózgach chorych w zbliżonym wieku, u których nie stwierdzono klinicznie otępienia, oraz w dwu przypadkach ludzi młodych, którzy zmarli w wieku 14 i 27 lat z powodów różnych niż schorzenia mózgu. Poszukiwanie komórki stanowiącej źródło prekursora prowadzono również w innych tkankach - w tym w płucach, śledzionie, wątrobie i mięśni prądkowanym, pochodzących od ludzi zdrowych i osób z otępieniem. Przeprowadzono także badania uzupełniające materiału zwierzęce-

go, w tym użyto mózgi: młodej małpy, szczura dwumiesięcznego, kota, a także trzech starych psów (15-25 lat). Poza mózgiem badano także inne narządy u małpy i szczura. W przypadku małpy były to: płuca, śledziona, wątroba. W przypadku szczura: płuca, śledziona, wątroba, jądra, oko, serce i mięsień poprzecznie prążkowany.

4. W celu morfologicznego scharakteryzowania rodzajów złożeń amyloidu w oun, użyto 9 mózgów osób z rozpozną klinicznie chorobą Alzheimera (64-86 lat). W celu ilościowej oceny występowania zmian amyloidowych w poszczególnych warstwach kory mózgu użyto 5 mózgów osób w wieku 83-93 lata nie wykazujących cech otępienia, 4 mózgi osób z chorobą Alzheimera w wieku 75-88 lat oraz 5 mózgów chorych z zespołem Downa w wieku 51-60 lat.

5. Oceniano częstość występowania zmian amyloidowych i neuronów z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego w płacie czołowym, w korze śródwęchowej, w hipokampie i podpórce, oraz w mózdzku w stu przypadkach osób (68 kobiet i 32 mężczyzn), zmarłych z powodu udaru mózgu, obciążonych uogólnioną miażdżycą naczyń (średnia wieku $\pm 85,5$ lat), w tej liczbie osiemnastu chorych na podstawie obrazu klinicznego oceniono jako osoby z zespołem psychoorganicznym (otępienie).

6. W celu odpowiedzi na pytanie czy otępienie jest spowodowane przez łączne występowanie amyloidu i zmian neurofibrylarnych użyto 5 mózgów z chA (62-88 lat) i 5 mózgów osób starych (72-88 lat) nie wykazujących cech otępienia. Oceniano korę czołową i okolicę parahipokampalną wraz z hipokampem.

7. Ocenę występowania zmian neurofibrylarnych w istocie czarnej przeprowadzono w mózgach 10 przypadków w wieku $\pm 74,4$ lat z rozpoznaną klinicznie chA, 10 przypadków w wieku $\pm 70,5$ lat z chP i 6 przypadków osób w wieku $\pm 79,8$ lat bez cech otępienia.

Porównanie liczby neuronów ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym i czasu ubikwitylizacji tych zmian w jądrze miejsca sinawego przeprowadzono w 7 przypadkach choroby Alzheimera w wieku 62-95 lat, w 3 przypadkach choroby Parkinsona w wieku 59-90 lat, w 3 przypadkach starczego parkinsonizmu (75-85 lat) oraz w 3 przypadkach osób nie wykazujących otępienia (85 lat).

Częstość występowania patologicznych białek cytoskeletonu i ich immunoreaktywność oceniono w grupie 10 przypadków, w których klinicznie stwierdzono współistnienie otępienia i zespołu parkinsonowskiego. Były to mózgi 7 kobiet i 3 mężczyzn, w wieku $\pm 67,4$ dla przypadków rozpoznanych pierwotnie jako choroba Alzheimera i $\pm 78,2$ lat dla osób z początkowo rozpoznaną chorobą Parkinsona. Średni czas trwania choroby wynosił $\pm 5,5$ lat w przypadkach z chA i $\pm 9,8$ lat dla osób z chP.

8. Porównanie reakcji mikrogleju w chA i chP przeprowadzono na 10 mózgach pacjentów z chA ($\pm 74,4$ lat), 10 z chP ($\pm 70,5$ lat) i 6 mózgach chorych bez cech otępienia ($\pm 79,8$ lat). Przedmiotem oceny była istota czarna, kora czołowa i hipokamp z podpórką i korą śródwęchową. Odczyn mikrogleju oceniono także w 7 przypadkach z chorobą Creutzfeldta-Jakoba (w tym jeden przypadek z amyloidozą mieszaną β - i PrP- dodatnią) oraz w 2 przypadkach choroby Gerstmannia-Straüsslera-Scheinkera. Reakcję gleju astrocytarnego oceniono na podstawie badań 3 przypadków z rozpoznanyim zespołem psychoorganicznym porównanych z 3 mózgami osób bez cech otępienia, zmarłych po 80 roku życia. Założeniem doboru materiału była ocena reakcji GFAP w obrębie

blaszki starczej przy zbliżonej liczbie złożeń amyloidu w mózgach osób w tym samym wieku, różniących się tylko obecnością objawów otępienia.

9. W trzydziestu dwu mózgach chorych ($\pm 85,8$ lat) ze zmianami amyloidowymi i z neuronami ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym, którzy zmarli z powodu udaru mózgu oceniono udział gleju w fagocytozie obu typów zmian. W każdym z przypadków badano: płat czołowy, hipokamp z okolicą parahipokampalną i obszar martwicy z pograniczem nieuszkodzonych tkanek.

Mózgi, stanowiące materiał badany w pracy pochodziły z kilku źródeł. Z Klinik Neurologicznych, I i II Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Warszawie a także z Kolekcji Jervisa, Institute for Basic Research for Developmental Disabilities w Nowym Jorku (IBR). Dwa przypadki GSS pochodziły: pierwszy z Instytutu Neurologii Uniwersytetu Wiedeńskiego, drugi zaś z Laboratorium Badań Centralnego Układu Nerwowego, NIH Bethesda w Waszyngtonie.

Informacje dotyczące stanu klinicznego chorych czerpano z historii chorób. Dane o stanie świadomości i zaburzeń pamięci pochodziły także z archiwizowanej dokumentacji klinicznej. Często było to badanie psychologa, wywiad od rodziny albo ocena zdolności do samoobsługi określana przez postronnych informatorów. Przyjęto, że chorego można było uważać za otępiełego jeżeli przed hospitalizacją nie był zdolny do samodzielnego życia, a prowadzący neurolog rozpoznawał zespół psychoorganiczny. Dziesięć mózgow pochodziło od chorych zdiagnozowanych w Poradni dla Osób z chorobą Alzheimera. Dla wyłączenia z badanej grupy przypadków otępienia wielozawalowego (OW) posłużono się następującymi kryteriami; nie włączano do badań przypadków, w których dane z wywiadu i/lub stan neurologiczny wskazywały na przebyty poprzednio udar móz-

gu, a obraz tomografii komputerowej wskazywał na uszkodzenia naczyniopochodne i określany był przez radiologa jako encefalopatia miażdżycowa. Starano się również wykluczyć przypadki z wyraźnym obciążeniem czynnikami sprzyjającymi zaawansowanej patologii naczyniowej, w tym przypadki z cukrzycą, nadciśnieniem, z chorobą wieńcową lub przebyłym zawałem mięśnia serca.

Mózgi stanowiące przedmiot badań były przechowywane w 10% formalinie, średnio przez 3 lata. Wyjątek stanowiły przypadki z kolekcji Jervisa, obejmującej mózgi kolekcjonowane od 1931 do 1975 roku. Mózgi z materiałów archiwalnych Akademii Medycznej pochodziły z sekcji wykonywanych w latach 1974-1995.

Badane fragmenty tkankowe mózgu i narządów wewnętrznych utrwalano w 10 % formalinie i następnie zatapiano w sposób typowy w parafinie. Wszystkie mózgi poddane były wstępnej ocenie neuropatologicznej w oparciu o barwienia rutynowe (hematoksyli-na-eozyna) i impregnację srebrną metodami wg. Bodiany/PAS lub Bielschowskiego w modyfikacji Yamamoto).

METODY

1. Badania immunohistochemiczne

Parafinowe bloczki tkankowe, krojono seryjnie na skrawki grubości 7 mikrometrów dla potrzeb morfometrii. Pozostały materiał badano na skrawkach nieseryjnych. Rutynowo wykonywano barwienie hematoksyliną-eozyną (HE), oraz przy zastosowaniu metody Klüvera-Barrery, a także impregnację srebrową według metody Bodiana/PAS, albo Bielschowskiego w modyfikacji Yamamoto. Z zasady wykonywano również barwienie tioflawiną S i czerwienią kongo. Tioflawina S jest fluorochromem, po wybarwieniu którym β -amyloid wykazuje w mikroskopie fluorescencyjnym charakterystyczne zielono-żółte świecenie. Amyloid zabarwiony czerwienią kongo daje jaskrawo-zielone świecenie w świetle spolaryzowanym. Odczyny immunohistochemiczne wykonywano na skrawkach parafinowych, metodą ekstrawidynowo-biotynową. W celu mocniejszego przytwierdzenia skrawka tkankowego do szkiełka podstawowego, przed rozpoczęciem barwienia preparaty ogrzewano do temperatury 37°C w ciągu 24 godzin. Po odparafinowaniu i uwodnieniu skrawki poddawano działaniu metanolu z 0,06% H_2O_2 przez 20 minut, w celu zablokowania endogennej peroksydazy, po czym preparaty płukano w buforze fosforanowym przez 30 minut. W celu uniknięcia wiązań krzyżowych przez 30 minut działano na tkankę 20% cielęcą surowicą (GIBCO). Po usunięciu surowicy blokującej działano przeciwciałem pierwotnym. Wilgotną, szczelną komorę, zawierającą badany materiał zostawiano na noc w temperaturze +4°C. Po wypłukaniu w buforze fosfo-

ranowym (PBS) przez okres 30 minut, skrawki inkubowano z wtórnym przeciwciałem przez okres 60 min. w temperaturze pokojowej (Hsu, Raine 1981). Używano wtórnych biotylnowanych przeciwciał przeciw immunoglobulinom mysim dla przeciwciał monoklonalnych i króliczym dla przeciwciał poliklonalnych. (Amersham 1:200). Skrawki ponownie płukano w PBS i działano na nie ekstrawidyną (ExtrAvidin-Peroxidase, SIGMA). Reakcję barwną wywoływano przy użyciu diaminobenzzydiny z 0,01% H_2O_2 , zmieniając czas działania w zależności od rodzaju przeciwciała pierwotnego. Po przetrwaniu reakcji płukaniem wodą bieżącą, preparaty podbarwiano wodnym roztworem hematoksyliny, następnie odwadniano, i pokrywano balsamem kanadyjskim.

Dla potrzeb prowadzonych badań używano liczne przeciwciała znajdujące się w produkcji przemysłowej oraz oryginalnych, pozyskiwanych laboratoryjnie. Wykorzystywane przeciwciała zestawiono w tabelach 1 i 2. Przeciwciała przemysłowe obejmowały immunohistochemiczne znaczniki astrogleju, (GFAP-kwaśne białko włókienkowe gleju), mikrogleju (anty ferrytyna, HLA-DR - antygen zgodności tkankowej - CR3/43, LCA - powszechny antygen leukocytarny, LN 1 - ludzki antygen B-limfocytów, i lektyna RCA 1 - ricinus communis - rącznik pospolity), makrofagów (α 1-anty chemotrypsyna, α , anty trypsyna i anty muramidaza), elementów ściany naczyniowej (SMA - antygen mięśniówki gładkiej, fibronektyna), mielinny (zasadowe białko mieliny - MBP), ciał Lewy'ego (ubikwityna) (Tab. 1).

Tabela 1. Przeciwciała przemysłowe zastosowane w badaniach immunohistochemicznych

Cel barwienia	Nazwa przeciwciała	Pochodzenie	Rozcieńczenie
Astrocyty	GFAP	DAKO	1:1000
Mikroglej	Anty ferrytyna	SIGMA	1:1000
Mikroglej	HLA-DR	DAKO	1:50
Mikroglej	LCA	DAKO	1:5000
Mikroglej	LN 1	ICN	bez rozcień.
Mikroglej	RCA1 (lektyna)	DAKO	1:200
Makrofagi	α 1-anty chemotrypsyna	DAKO	1:1000
Makrofagi	α -anty trypsyna	DAKO	1:1000
Makrofagi	Anty muramidaza	DAKO	1:1000
Mięśniówka naczyń	SMA	DAKO	1:200
Ściana naczyń	Anty fibronektyna	DAKO	1:500
Mielina	MBP	SIGMA	1:1000
ZN, ciała Lewy'ego	Anty ubikwityna	SIGMA	1:30

Wykorzystywane przeciwciała oryginalne wyprodukowane laboratoryjnie pochodziły w większości z Institute for Basic Research (IBR), Staten Island. Dla uwidocznienia blaszek starczych używano przeciwciała monoklonalne skierowane na β -peptyd, wyprodukowane przez dr K. S. Kima (Kim i wsp. 1988): monoklonalne przeciwciała 4G8 - przeciw epitopom położonym w łańcuchu od 17 do 24 aminokwasu β -peptydu, i 6E10 przeciw epitopom na pierwszych 17 aminokwasach β -peptydu, a także surowice przeciw patologicznym białkom cytoskeletonu, parzystym spiralnie skręconym filamentom (PHF) (I.Grundke-Iqbal i wsp. 1985). Stosowano również przeciwciała monoklonalne anty tau 1 (Binder i wsp. 1985) skierowane przeciw PHF, monoklonalne przeciwciała 3.39 prze-

ciw epitopom na 50-65 aminokwasie łańcucha ubikwityny (Grundke-Iqbal i wsp. 1985), wyznaczającym PHF i ciała Lewy'ego (Tab. 2).

Tabela 2. Oryginalne przeciwciała stosowane w barwieniach immunohistochemicznych

Nazwa przeciwciała monoklonalnego	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Element wybarwiony
4G8	IBR	1:4000	β -amyloid Epitop 17-24
6E10	IBR	1:10000	β -amyloid Epitop 1-17
Anty tau 1	IBR	1:10000	PHF
3.39	IBR	1:10000	Ubikwityna Epitop 50-65

Przeciwciała poliklonalne i monoklonalne skierowane przeciwko poszczególnym fragmentom prekursora β -amyloidu produkowano posługując się otrzymanymi w Laboratorium Peninsula w Belmont, syntetycznymi peptydami. Umieszczenie poszczególnych peptydów na cząsteczce prekursora przedstawia rycina 1.

Dla ułatwienia wiązania epitopu z przeciwciałem lub w celu odsłonięcia epitopu stosowano różne działania przygotowawcze. Między innymi działano fosfatazą alkaliczną (SIGMA) w przypadku przeciwciała przeciw białku tau 1, proteinazą K (SIGMA), i heparynazą siarczanową. W badaniach nad prekursorem amyloidu działano na badaną tkankę dehydrogenazą glutaminową. W celu zwielowania dodatkowych nieswoistych barwień, składających się na tło, a także ułatwienia wiązania epitop - przeciwciału używano detergentów - tritonu lub tween'u. Przed inkubacją z przeciwciałem pierwotnym

skierowanemu przeciw β -peptydowi działano na skrawki przez 30 minut stężonym kwasem mrówkowym (Kitamoto i wsp. 1987).

W przypadku jednoczesnego stosowania dwóch różnych przeciwciał, przy barwieniach podwójnych, używano 0.005% roztworu soli kobaltu jako drugiego barwnika.

Swoistość barwień immunohistochemicznych kontrolowano przy użyciu następujących prób; w przypadku przeciwciał oryginalnych przeprowadzano próbę barwiąc surowicą przedimmunizacyjną, jak również opuszczając pierwotne przeciwciało. W odczynach ujawniających β -amyloid wykonywano kontrolę dodatnią z zastosowaniem skrawków pochodzących ze zweryfikowanego przypadku choroby Alzheimera.

Dla potrzeb mikroskopii elektronowej zastosowano technikę immunocytochemiczną z wykorzystaniem złota koloidalnego do wyznaczenia włókienek amyloidu.

2. Badania morfometryczne

2.1. Badania morfometryczne dla ilościowej oceny blaszek starczych i zwyrodnienia neurofibrylarnego w mózgach chorych z opóźnieniem rozwoju, przeprowadzano przy pomocy automatycznego analizatora obrazu (Quantimet 970, Cambridge Instrument), współpracującego z mikroskopem Axiophot. W przypadku kory nowej i hipokampa oceniano odpowiednio 9 i 6 nie zachodzących na siebie pól. Zliczano średnią liczbę blaszek starczych przypadających na 1 mm², automatycznie, po obrysowaniu ręcznym i usunięciu z analizowanych automatycznie pól profili innych niż blaszki, charakteryzujących się zbliżonym odcieniem szarości. W przypadku neuronów ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym posługiwano się mikroskopem świetlnym Zeissa, przy powiększeniu 400x. Obrazy mikroskopowe rzucano na papier i obrysowywano neurony z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego. Dla każdego przypadku obrysowywano 25-40 nie zachodzą-

cych na siebie pól. Z otrzymanych rysunków obliczano średnią liczbę badanych struktur na powierzchni 1 mm², używając półautomatycznego analizatora obrazu (Videoplan, Zeiss).

2.2. Dla porównawczej oceny stosunku liczby złożeń amyloidu i ich występowania w obrębie poszczególnych warstw kory do liczby neuronów z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego w grupach przypadków z otępieniem i bez otępienia, liczono patologiczne struktury w pięciu kolejnych nie zachodzących na siebie polach w powiększeniu 100 x i określano średnią liczbę badanych struktur przypadających na 1 mm². Badania przeprowadzano na seryjnych skrawkach oddzielnie dla kory czołowej i hipokampa. W ten sam sposób liczono neurony ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym i blaszki starcze a także ciała Lewy'ego w jądrze miejsca sinawego i istocie czarnej. Przy zastosowaniu tej samej metody określano średnią liczbę komórek mikroglejowych w istocie czarnej w przypadkach choroby Alzheimera, choroby Parkinsona i w przypadkach kontrolnych.

2.3. W celu określenia współwystępowania β -amyloidu i astrogleju w blaszce starczej, obrysowywano blaszki starcze z dodatnim odczynem przeciwko β -amyloidowi a następnie rzucano na ten sam schemat blaszki dodatnie w odczynie przeciwko GFAP w 10 nie zachodzących na siebie polach. Oba nakładane obrazy pochodziły z sąsiednich skrawków krojonych seryjnie co 7 mikronów, na których naprzemiennie wykonywano oba odczyny immunohistochemiczne. Badano po 20 skrawków z płata czołowego w powiększeniu 100x, a uzyskane wartości liczbowe przeliczano na liczbę badanych struktur przypadających na 1 mm².

3. Badania znamienności statystycznej

3.1. Dla potrzeb znalezienia właściwych narzędzi retrospektywnej oceny otępienia na podstawie dokumentacji (przez dwie niezależnie badające osoby) używano: test phi dla płci, test Cramera dla przyczyny śmierci, test Pearsona dla wieku w chwili śmierci, stosowano także test χ^2 i analizę wielokrotnej regresji dla korelacji kliniczno-patologicznych.

3.2. Dla oceny statystycznej znamienności zróżnicowania, topograficznego występowania złogów amyloidu w obrębie poszczególnych warstw kory wykorzystano test studenta-t, i χ^2 , analizowane w systemie SAS, a także analizą wielowariantową.

3.3. Używano również test ANOVA dla wielokrotnych porównań mających na celu ustalenie statystycznej znamienności wyników dotyczących liczby komórek mikroglejowych w obrębie istoty czarnej w przypadkach choroby Alzheimera i choroby Parkinsona w porównaniu z grupą przypadków starczych.

WYNIKI

1. Przydatność dokumentacji lekarskiej dla oceny otępienia w badaniach retrospektywnych

Badania przeprowadzono na podstawie dokumentacji pochodzącej z kolekcji Jervisa. Kolekcję tę stanowiła szczególna populacja pensjonariuszy domu opieki, do którego trafili z powodu opóźnienia rozwoju. Materiał kliniczny oceniano częściowo (30%) dwukrotnie. Wykonywał to w każdym przypadku neurolog a w grupie 21 historii chorób, niezależnie od niego psycholog. Zadanie polegało na postawieniu rozpoznania otępienia na podstawie historii choroby i zawartych w niej informacji na temat stanu fizycznego i psychicznego chorych. Na podstawie retrospektywnej oceny u 16 osób w badanym materiale rozpoznano otępienie. Okazało się, że zgodność ogólnego wrażenia co do możliwości retrospektywnego rozpoznania demencji przez neurologa i psychologa wynosi średnio 83,6%. Brak 100% zgodności oceny wynikał z niskiej jakości badanej dokumentacji, jej niejednorodności, zmienności w zależności od czasu w jakim powstała. Innym problemem był fakt, że oceniani pacjenci wykazywali znacznego stopnia zaburzenia wynikające z upośledzenia ogólnego stanu zdrowia, w tym zaburzenia układu krążenia, co często ograniczało ich wydolność ruchową a przez to możliwości ich funkcjonowania były gorsze, niżby to wynikało z upośledzenia funkcji poznawczych. Na podstawie oceny całego materiału (Tab. 3) należy stwierdzić, że retrospektywne rozpoznanie otępienia było możliwe u pensjonariuszy zdrowych fizycznie (25 osób), u których pojawiły się zabu-

rzenia ruchowe i spadek ilorazu inteligencji co najmniej o 10 punktów, którym towarzyszyły nieprawidłowości zachowania.

Tabela 3. Kliniczne przejawy upośledzenia stanu zdrowia i funkcji psycho-społecznych ocenianych na podstawie analizy historii chorób

Wskaźnik kliniczny	Degradacja		
	Tak	Nic	F.E.
Pogorszenie sprawności ruchowej	14	47	9
Wystąpienie drgawek	3	61	6
Leczenie psychotropowe	13	53	4
Spadek ilorazu inteligencji o 10 pkt.	18	45	1
Zaburzenia zachowania	23	37	10
Nieprzystosowanie społeczne	12	46	9
Zaburzenia mowy	5	62	3
Nieumiejętność jedzenia	6	62	2
Utrata nawyków sanitarnych	17	47	6
Nieumiejętność ubierania się	14	49	7
Utrata umiejętności pisania i czytania	1	21	48
Utrata zatrudnienia	29	16	20
Rozpoznanie otępienia na podst. dokumentacji	16	54	0

Wyjaśnienie skrótów, F.E.- floor effect- niemożność oceny pogorszenia funkcji wobec ich skrajnie niskiego poziomu wyjściowego. Uwaga ! W przypadkach, w których suma danych jest mniejsza niż 70, oznacza to luki w posiadanej dokumentacji.

Żaden typ stwierdzonych zmian neuropatologicznych nie był w sposób znamieny skorelowany z ocenianym retrospektywnie ośpieniem (Tab. 4).

Tabela 4. Częstość występowania kongofilnej angiopatii, blaszek starczych i neuronów z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego w 70 przypadkach osób opóźnionych w rozwoju

Wynik badania neuropatologicznego*	Liczba przypadków	Procent badanej populacji
Kongofilna angiopatia	22	31,4
BS, hipokamp	17	24,3
BS, kora nowa	28	40,0
ZN, hipokamp	18	25,7
ZN, kora nowa	2	2,9

* Ocena na podstawie impregnacji srebrzej wg. Bielschowskiego w modyfikacji Yamamoto.

Liczba mózgów, w których stwierdzono obecność blaszek starczych (31,4 %) w populacji pacjentów z opóźnieniem rozwoju była taka sama jaka według danych z piśmiennictwa występuje w populacji ludzi w tym samym wieku, bez opóźnienia rozwoju. Było to prawdziwe także dla grupy 385 przypadków zmarłych w wieku pomiędzy 23 a 90 lat.

2. Poszukiwanie komórki - "producenta" białka prekursorowego amyloidu

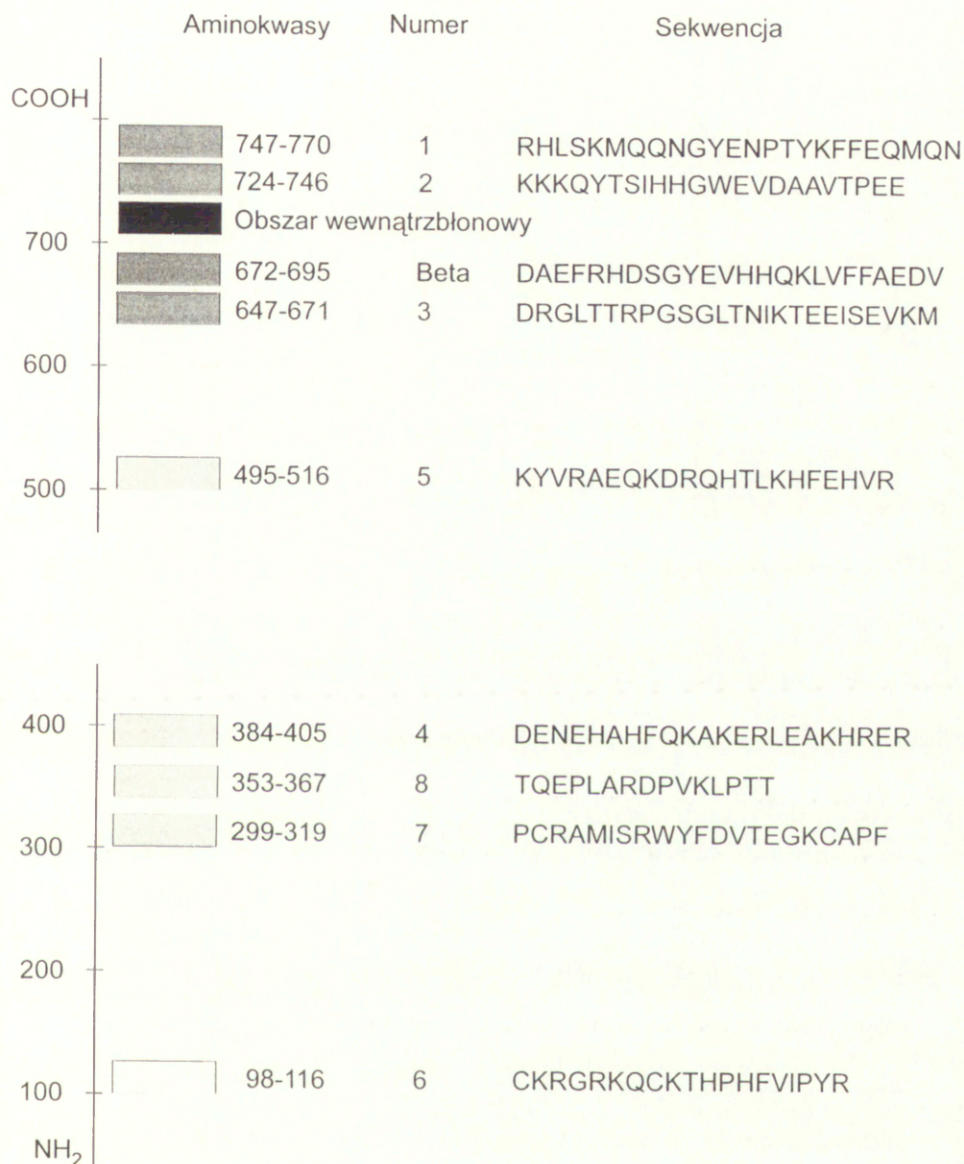
Badania przeprowadzono używając poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciw syntetycznym fragmentom białka prekursorowego amyloidu (APP) (Ryc. 1).

2.1. Występowanie poszczególnych fragmentów prekursora dla amyloidu

w korze nowej mózgu

Dla kory nowej mózgow osób z rozpozną klinicznie chorobą Alzheimera uzyskano następujące wyniki. Przeciwciała przeciw peptydowi nr 1 (epitopy pomiędzy 747-770 aminokwasem APP) barwiło aksony i mielinę, (Ryc. 2.), przeciw peptydowi nr 2 (epitopy pomiędzy 724-746 aminokwasem APP) nie dawało dodatniego odczynu z żadną komórką w korze mózgu. Przeciwciała skierowane przeciw β -peptydowi (672-695 aminokwasem APP) wyznaczały amyloid w oponach miękkich i w ścianach naczyń (Ryc. 3.). W neuropilu widoczne były zmiany amyloidowe zarówno rozlane (Ryc. 4) jak i ogniskowe (Ryc. 5). Obserwowano także dodatnie barwienie w tanacytach i komórkach spłotu naczyniówkowego. Przeciwciała przeciw β -peptydowi wyznaczało także ziarna lipofuscyny w neuronach (Ryc. 6). Surowice przeciw peptydowi nr 3 (647-671 aminokwasem APP) barwiły naczynia oponowe, oraz wypustki astrogleju wokół blaszek starczych. Dodatnią reakcję z przeciwciałem przeciwko peptydowi nr 5 (495-516 aminokwasem APP) obserwowano głównie w aksonach (Ryc. 7) i w ścianach naczyń. Ten typ barwienia występował w powierzchniowych warstwach kory ograniczając się do jej I i II warstwy. Surowice przeciw peptydowi nr 4. (MR-27) (384-405 aminokwasem APP) barwiły komórki mikroglejowe wraz z wypustkami (Ryc. 8ab), zarówno w mózgu chorych z chA, mózgu starczych, jak i w mózgu młodych ludzi, bez amyloidu. W mózgu chorych z chA komórki mikroglejowe stwierdzano prawie zawsze wewnątrz złogów amyloidu. Przeciwciała skierowane przeciw peptydowi 8 (353-367 aminokwasem APP) wyznaczało włókna tkanki łącznej i fibroblasty zgromadzone wokół naczyń w sposób identyczny do surowicy przeciw fibronektynie (Ryc. 9). Przeciwciała wyprodukowane przeciwko peptydowi 7 (299-319 aminokwasem APP), odmiennie do 8 barwiło mięs-

Rycina 1. Antygeny syntetycznego peptydu



Rycina 2.

Przypadek chA. Barwienie immunohistochemiczne przy użyciu surowicy przeciw peptydowi 2 białka prekursorowego amyloidu. Wybarwione zmie-linizowane aksony. Pow. 200x

Rycina 3.

Przypadek chA. Barwienie przy użyciu przeciwciała skierowanego prze-ciw peptydowi- β . Widoczny dodatnio wybarwiony podoponowy obszar drobinowej kory, opona i naczynia oponowe. Pow. 200x

Rycina 4.

Przypadek chA. Rozlane złogi amyloidu uwidocznione przez przeciwciało przeciw β -amyloidowi. Pow. 200x

Rycina 5.

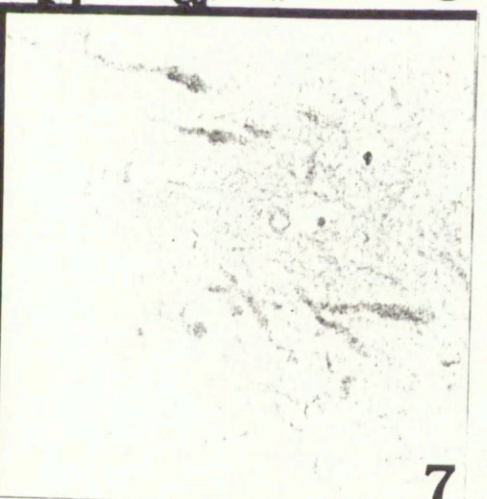
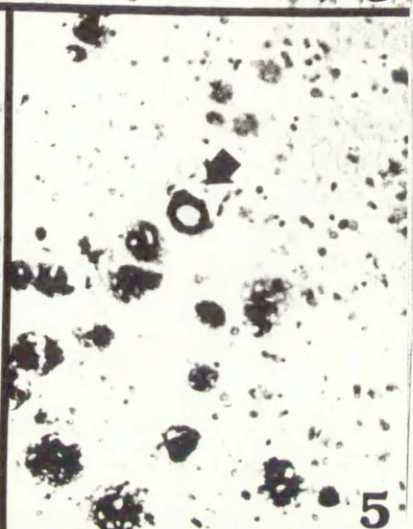
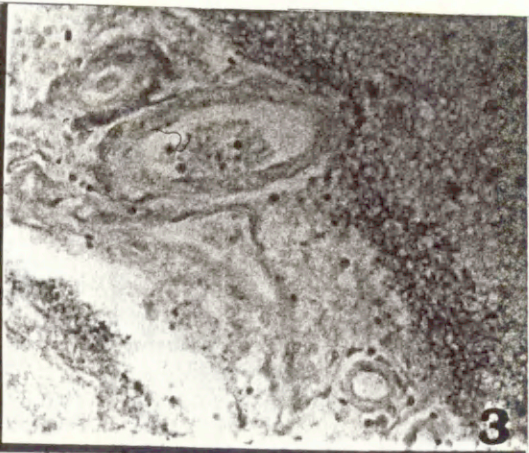
Ogniskowe złogi amyloidu wybarwione surowicą przeciw β -peptydowi. Strzałka wskazuje naczynie ze śródściennymi złogami amyloidu - cechy kongofilnej angiopatii. Pow. 200x

Rycina 6.

Przypadek chA. Neurony z ziarnami lipofuscyny wyznaczonymi przez su-rowicę przeciw β -peptydowi (strzałki). Widoczny także ogniskowy depo-zyt amyloidu - blaszka prymitywna. Pow. 400x

Rycina 7.

Przypadek kontrolny, młody (27 lat). Surowica przeciw peptydowi 5. Widoczne dodatnie dla barwienia aksony. Pow. 200x



niówkę naczyń w sposób zbliżony do anty aktywny (SMA) (Ryc. 10). Poza błoną środkową naczyń dodatni odczyn wykazywały także neurony oraz komórki makrogleju. Przeciwciała (dwa przeciwciała poliklonalne: MR13 i MR14) przeciwko peptydowi nr 6 (98-116 aminokwasy APP) dawały dwa różne obrazy. MR 13-6 wybarwiło dodatnio astrocyty, ich wypustki i ciała komórek nerwowych (Ryc. 11abc). Po preinkubacji z dehydrogenazą glutaminową barwienie to nie pojawiało się. MR 14-6 natomiast, dawało dodatni odczyn z jądrami komórek nerwowych a niekiedy również glejowych (Tab. 5).

Tabela 5. Wyniki badań immunohistochemicznych przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciw fragmentom białka prekursorowego dla amyloidu

Badany fragment prekursora	Kora nowa	Mózdzek
Peptyd 1 (747-770)	Aksony, mielina	Ujemny
Peptyd 2 (724-746)	Ujemny	Komórki Purkinjego
β -peptyd (672-695)	Złogi amyloidu ogniskowe i rozproszone, naczynia, tanocyty, splot naczyńiówkowy i lipofuscyna	Złogi amyloidu, naczynia
Peptyd 3 (647-671)	Naczynia, astroglej	Neuryty (warstwa drobinowa kory)
Peptyd 4 (384-405)	Mikroglej	Mikroglej
Peptyd 5 (495-516)	Naczynia	Ujemny
Peptyd 8 (353-367)	Fibroblasty	Ujemny
Peptyd 7 (299-319)	Mięśniówka naczyń	Wypustki neuronów
Peptyd 6 (68-116)	Astrocyty, jądra neuronów i mikrogleju	Wypustki neuronów (warstwa ziarnista kory)

Badania przeprowadzone w mózgach zwierzęcych były negatywne poza obecnością złożeń β -amyloidu u 15-letniego psa. Stwierdzono także dodatnie barwienie dla mikrogleju małpy przy zastosowaniu przeciwciała przeciw peptydowi 4.

2.2. APP w mózdzku w chorobie Alzheimera

Przeciwciała przeciwko peptydowi nr 2. barwiło ciała i dendryty komórek Purkiniego (Ryc.12). Surowice przeciw β -peptydowi wyznaczały naczynia oraz amyloid w warstwie drobinowej, ziarnistej i w istocie białej. Przeciwciała skierowane przeciw epitopom peptydu nr 3 barwiły wypustki komórek nerwowych w warstwie drobinowej. Surowica przeciw peptydowi 4, dawała wynik dodatni z komórkami mikroglejowymi związanymi ze złożami amyloidu a rzadziej niepowiązanymi z nimi, we wszystkich warstwach kory (Ryc. 13ab). Przeciwciała przeciw peptydowi 7 barwiło wypustki komórek nerwowych w warstwie drobinowej (Ryc. 14). Surowica skierowana przeciwko peptydowi 6 także wyznaczała wypustki komórek nerwowych, ale zastosowanie preinkubacji z dehydrogenazą glutaminową niwelowało odczyn.

2.3. APP w siatkówce szczura

Przeciwciała przeciw peptydowi nr 1. wybiórczo wybarwiała komórki Mullera. Surowice przeciw β -peptydowi dawały dodatni odczyn we wszystkich warstwach siatkówki. Przeciwciała przeciw peptydowi 7 barwiło wyłącznie mięśniówkę naczyń (Ryc. 10).

Rycina 8a-b.

Przypadek chA, kora płata skroniowego. Strzałki na obu rycinach wskazują komórki mikrogleju wyznaczone przez surowicę skierowaną przeciw peptydowi 4. Pow. 400x

Rycina 9.

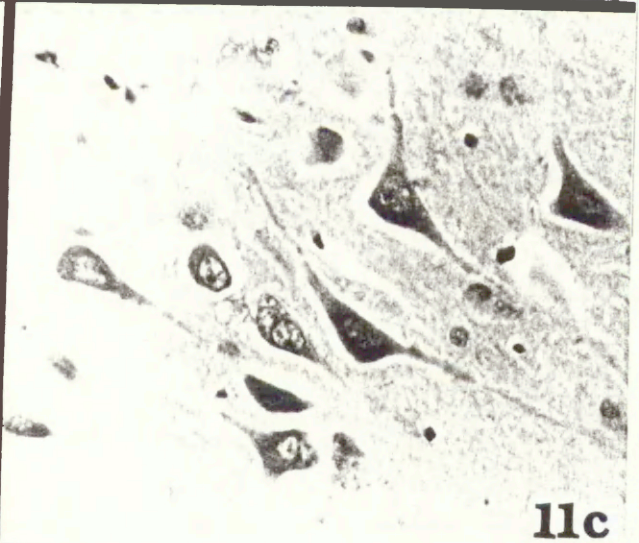
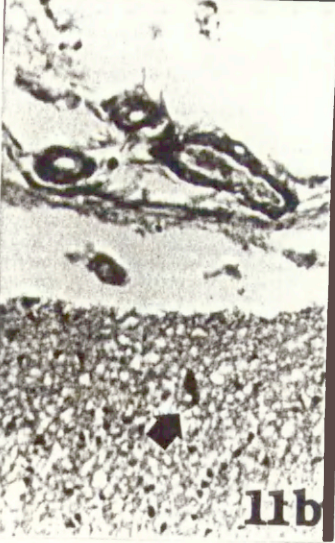
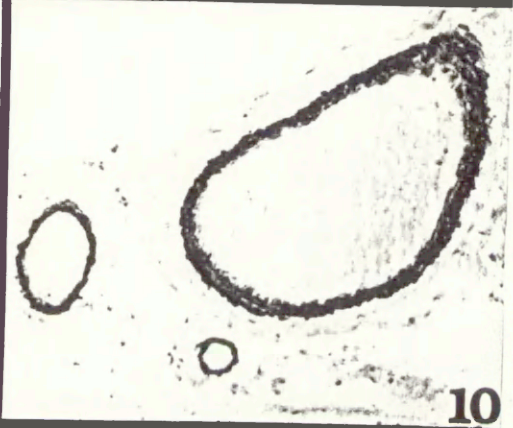
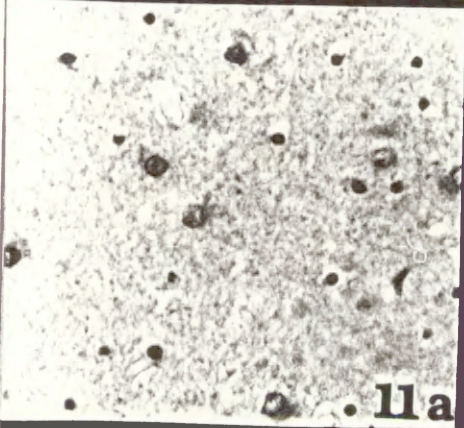
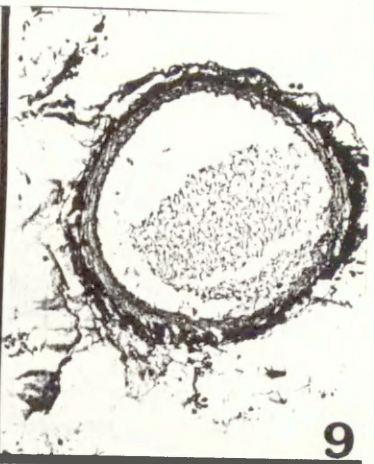
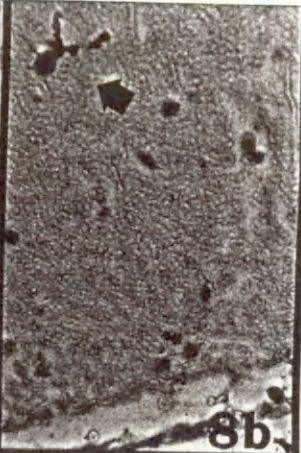
Starczy przypadek kontrolny. Przeciwciało skierowane przeciw peptydowi 8 prekursora amyloidu. Ściana naczynia wybarwiona w sposób typowy dla fibronektyny. Pow. 400x

Rycina 10.

Przypadek starczy, kontrolny. Przeciwciało przeciw peptydowi 7 białka prekursorowego amyloidu barwiło ściany naczyń w sposób typowy dla przeciwciał przeciw mięśniówce gładkiej naczyń. Pow. 400x

Rycina 11a-c.

Przypadek chA. **a.** surowica skierowana przeciw peptydowi 6-13, wybarwione astrocyty. Pow. 200x; **b.** widoczne dodatnie dla surowicy astrocyty w warstwie drobinowej kory (strzałka). Pow. 200x; **c.** dodatnie dla barwienia przy użyciu surowicy przeciw peptydowi 6-13 prekursora amyloidu ciała neuronów. Pow. 400x



Rycina 12.

Fragment mózdzku z przypadku chA. Barwienie przy użyciu surowicy skierowanej przeciw peptydowi 2 prekursora amyloidu. Dodatkowo wybarwione ciało komórki Purkinjego. Pow. 400x

Rycina 13a-b.

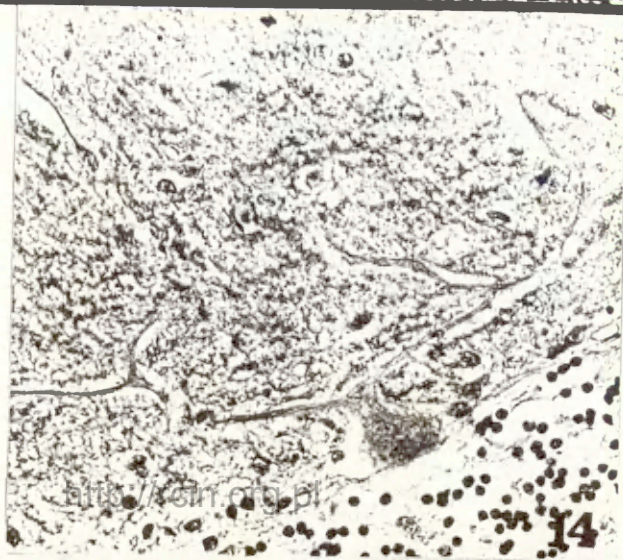
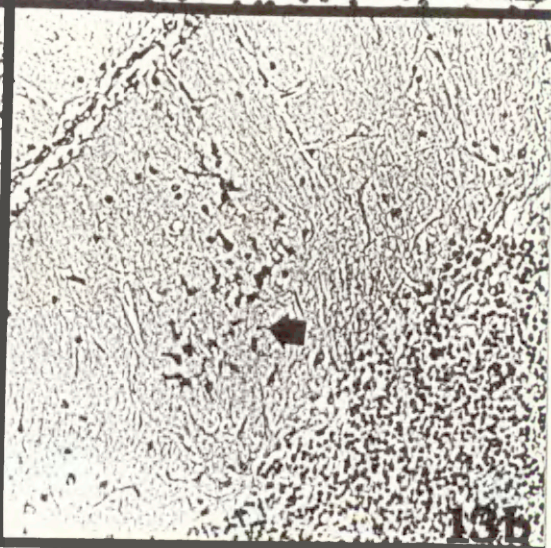
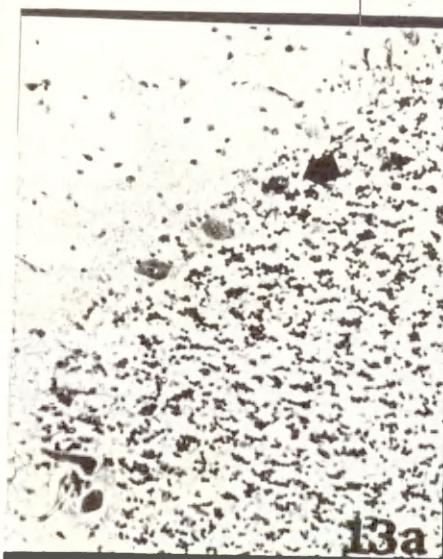
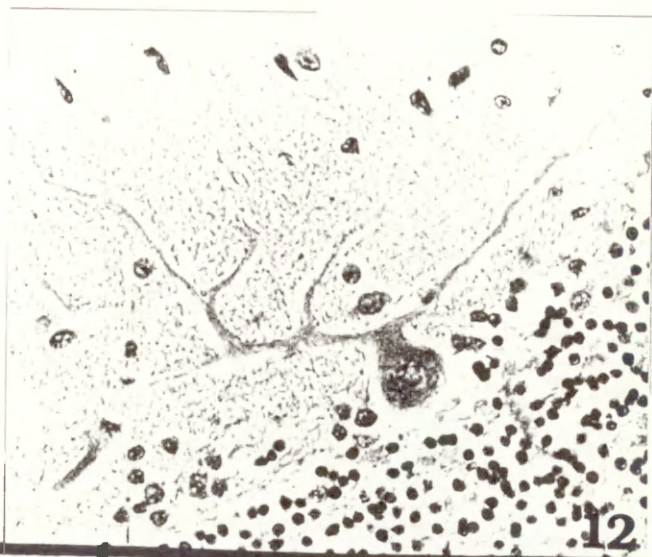
Przypadek chA, mózdzek - przeciwciała przeciw peptydowi 4 prekursora amyloidu. Widoczne wybarwione dodatkowo komórki mikrogleju (strzałki).

a. komórki mikrogleju w warstwie komórek zwojowych. Pow. 200x;

b. komórki mikrogleju wewnątrz złoży amyloidowego w warstwie drobniejszej kory mózdzku. Pow. 200x

Rycina 14.

Przypadek chA, fragment kory mózdzku. Wybarwione wypustki komórek nerwowych w warstwie drobniejszej. Surowica przeciw peptydowi 7 białka prekursorowego dla amyloidu. Pow. 400x



2.4. APP w narządach, poza ośrodkowym układem nerwowym

Nie udowodniono obecności badanych fragmentów APP w komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego w narządach wewnętrznych (makrofagi w płucach, komórki Browicz-Kupfera w wątrobie) ani u osób z chA ani w narządach pochodzących z przypadków bez cech otępienia ani także w badanych narządach szczura i małpy. Przy użyciu dostępnych przeciwciał udowodniono barwienie dodatnie jedynie w komórkach miększu śledziony i fibroblastów torebki, a także torebki wątroby.

3. Charakterystyka form morfologicznych złożeń amyloidu w oun

Użycie swoistych surowic przeciw β -amyloidowi pozwoliło na opisanie nowych, nie znanych przedtem form morfologicznych złożeń amyloidowych w oun. Opisano dwa rodzaje depozytów amyloidu: 1/ amyloid rozproszony (Ryc. 4); i 2/ amyloid występujący ogniskowo w postaci blaszek starczych w neuropilu (Ryc. 5) lub też w ścianach naczyń (Ryc. 15).

Do amyloidu rozlanego albo amorficznego zaliczono amyloid podoponowy (Ryc. 16) zajmujący drobinową warstwę kory. Obserwowano też amyloid "wstążkowy" występujący podwyściółkowo, stanowiący nagromadzenie substancji dającej dodatni odczyn przy użyciu przeciwciał przeciw β -amyloidowi. Bardziej rozproszony amyloid różniący się od amyloidu wstążkowego, występował w okolicy parahipokampalnej, przede wszystkim w korze śródwęchowej. W badaniach immunohistochemicznych przy użyciu przeciwciał przeciwko β -peptydowi, uzyskano w tym przypadku blade, delikatne i rozlane zabarwienie tkanki. Amyloid amorficzny stwierdzano także w jądrach podstawy.

Na podstawie swoistych badań immunohistochemicznych potwierdzono występowanie znanych dotychczas form amyloidu ogniskowego takich jak: blaszka prymitywna, klasyczna i blaszka wypalona (Ryc. 17ab).

Blaszka prymitywna - jest strukturą, która nie ma "amyloidowego" rdzenia, składając się jedynie z luźnych pasm włókienek amyloidowych, widocznych wyraźnie w odczynach immunohistochemicznych. Wydaje się przy tym, że włókienka amyloidowe otaczają nieuszkodzone neurony. Tego rodzaju ogniskowe złogi amyloidowe występują między innymi w korze nowej. Natomiast w jądrach podstawy obecne są niemal wyłącznie blaszki prymitywne. Są one obecne w skorupie, galce bladej, oraz w jądrze ogoniastym. W przypadku amyloidozy PrP dodatniej w chorobie CJD, w której stwierdzono obecność blaszek β -amyloidowych, były to w większości również blaszki prymitywne (Ryc. 18).

Blaszka klasyczna różni się od prymitywnej obecnością masy amyloidowej w postaci rdzenia, zajmującego część centralną blaszki, otoczonego wieńcem neurytycznym. Blaszki starcze klasyczne występowały głównie w korze nowej i hipokampie wraz z okolicą parahipokampalną (Ryc. 19ab).

Nieco rzadziej, niż opisane powyżej blaszki, częściej jednak niż w klasycznych impregnacjach srebrowych, uwidoczniły się w barwieniu immunohistochemicznym blaszki wypalone. Stanowiły one struktury złożone wyłącznie z amyloidowego rdzenia bez wieńca neurytycznego. Blaszki wypalone obserwowano przeważnie w V i w VI warstwie kory i to często w tych obszarach, w którym nie stwierdzano innych postaci złogów amyloidu (Ryc. 17b).

W istocie białej reakcje immunohistochemiczne przeciwko β -amyloidowi wykazywały ziarniste struktury, na ogół rozproszone (Ryc. 20), a niekiedy tylko przyjmujące postać drobnych skupisk położonych pomiędzy nieuszkodzonymi zmielinizowanymi włók-

Rycina 15.

Przypadek chA. Cechy kongofilnej angiopatii, widoczny także amyloid w neuropilu. Barwienie immunohistochemiczne przy użyciu przeciwciała przeciw β -amyloidowi (mab. 4G8). Pow. 400x

Rycina 16.

Przypadek chA. Złogi amyloidu w neuropilu warstwy I kory, widoczne naczynia z cechami kongofilnej angiopatii (strzałki) i amyloid w oponie miękkiej (mab. 4G8). Pow. 200x

Rycina 17a-b.

Przypadek chA. Barwienie przy użyciu przeciwciała mab. 4G8. **a.** klasyczna blaszka starcza (duża strzałka), mała strzałka wskazuje złóg prymitywny. Pow. 200x, **b.** blaszki starcze wypalone. Pow. 200x

Rycina 18.

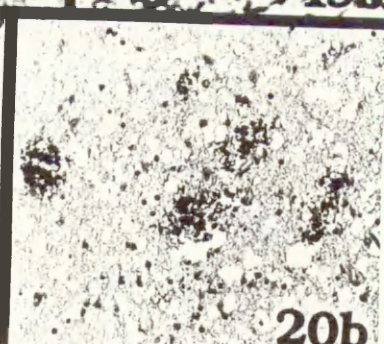
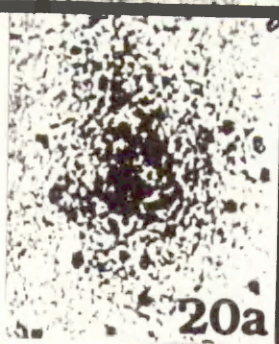
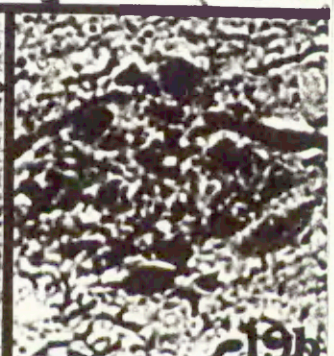
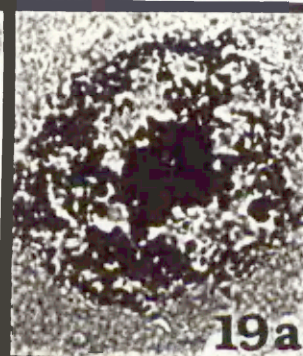
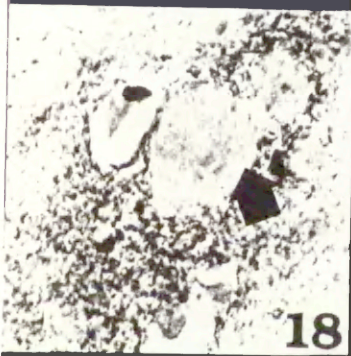
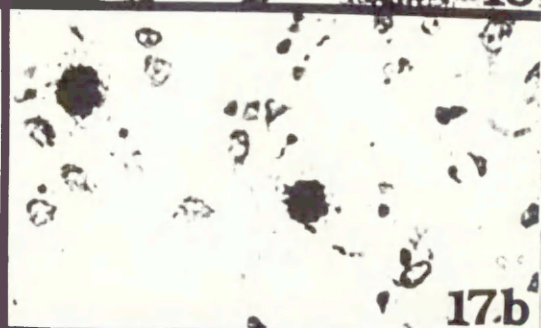
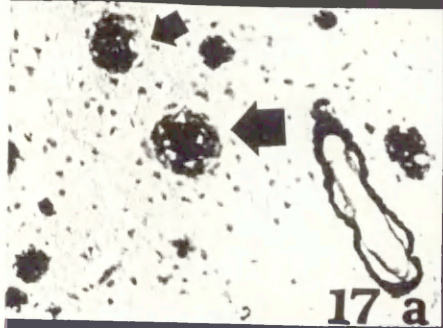
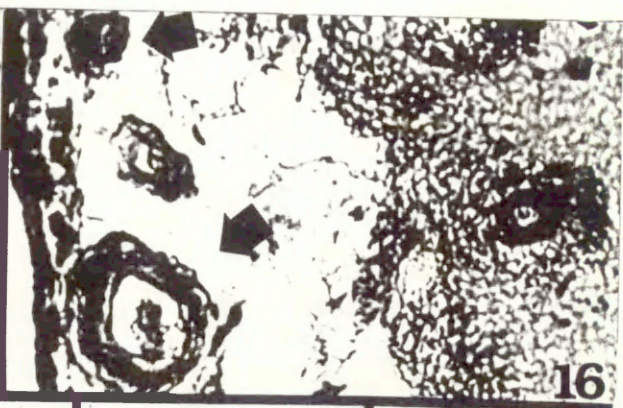
Przypadek amyloidozy PrP dodatniej. Barwienie przeciw β -peptydowi. Złóg β -amyloidu wokół blaszki PrP (strzałka). Pow. 400x

Rycina 19a-b.

Klasyczna blaszka starcza. Rdzeń amyloidowy otoczony wieńcem. **a.** barwienie 4G8, przeciw β -amyloidowi, widoczne obie części składowe blaszki. Pow. 400x; **b.** ta sama blaszka, barwienie przy użyciu surowicy przeciw białku tau 1. Widoczne bardzo wyraźne tau dodatnie neuryty w blaszce. Obok neurony z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego. Pow. 400x

Rycina 20a-b.

Przypadek chA. Barwienie immunohistochemiczne przeciw β -amyloidowi. Widoczne złogi β -amyloidu w istocie białej płata czołowego. **a.** Pow. 200x; **b.** Pow. 400x



nami nerwowymi. Obserwowano "układanie" się ziaren amyloidowych wyraźnie wzdłuż włókien nerwowych.

Ocena występowania złożeń amyloidu w mózdku, przeprowadzona na 100 chorych zmarłych z powodu udaru mózgu po 80 roku życia wykazała, że obrazy immunohistochemiczne ujawniają tu wszystkie znane formy amyloidu. Najczęściej był to jednak amyloid rozproszony, układający się kolumnowo w warstwie drobinowej kory (Ryc. 21). Obecne były również ogniskowe struktury amyloidowe: blaszki starcze prymitywne i klasyczne (Ryc. 22ab), a także amyloid okołonaczyniowy. BS prymitywne i klasyczne występowały na ogół w warstwie drobinowej, w warstwie komórek zwojowych (złogi typu "gwiazdowego") (Ryc. 23) oraz w warstwie ziarnistej wewnętrznej (Ryc. 24). Przy szczególnym nasileniu zmian, były one obecne również w istocie białej.

4. Topografia amyloidu w ośrodkowym układzie nerwowym w przypadkach starczych (w tym z pierwotnym opóźnieniem rozwoju) i w chorobie Alzheimera

4.1. W populacji 100 chorych po 80 roku życia zmarłych z powodu udaru stwierdzono obecność amyloidu w mózgu w 75 przypadkach, w 15 spośród których w oparciu o dane z wywiadu i analizę przebiegu klinicznego można było retrospektywnie rozpoznać zespół otępienny. Nie stwierdzono klinicznych cech otępienia pomimo obecności blaszek starczych w korze czołowej u 60 chorych (Tab. 6). U 12 chorych blaszki starcze współistniały z neuronami wykazującymi cechy zwyrodnienia neurofibrylarnego występującymi w korze czołowej i hipokampie; 4 chorych w tej grupie wykazywało objawy demencji.

Zwracało uwagę znacznie częstsze występowanie amyloidu w postaci BS niż kongofilnej angiopatii. Tylko w 22 mózgzach rozpoznano amyloidozę naczyń (w tym w 3 przypadkach chorych z otępieniem w obrazie klinicznym). Nie dostrzeżono istotnej różnicy między występowaniem zmian starczych w korze nowej i starej. Istniała jedynie niewielka tendencja do częstszego występowania amyloidu w hipokampie (Ryc. 25) u chorych z zespołem otępiennym. Różnica nie była jednak istotna statystycznie. Amyloid w mózdzku występował zdecydowanie częściej u chorych z otępieniem (w 23% przypadków). W 4 przypadkach ogniskowym złogom amyloidowym w korze mózdzku nie towarzyszyła kongofilna angiopatia. Nie stwierdzono znamienności we współistnieniu kongofilnej angiopatii w ośn u chorych z rozpozną klinicznie cukrzycą, nadciśnieniem ani też udarem spowodowanym wylewem krwi do mózgu.

Tabela 6. Występowanie zmian neuropatologicznych typu alzheimerowskiego

Struktura anatomiczna	Angiopatia kongofilna	Blaszki starcze	Zwyrodnienie neurofibrylarne
Kora czołowa	22*	75	12
Hipokamp	24	74	17
Mózdzek	27	31	0

*liczba przypadków

Jak wynika z tabeli 6, w wieku powyżej 80 roku życia amyloid występował zarówno w korze nowej (czołowej) jak i w hipokampie (poza jednym przypadkiem). Kongofilna angiopatia była zjawiskiem znacznie rzadszym niż ogniskowe złogi amyloidu w neuropilu.

Rycina 21.

Przypadek zaawansowanej chA. Złogi amyloidu rozproszonego w warstwie drobinowej kory mózdzku (strzałka). Barwienie immunohistochemiczne przeciw β -amyloidowi (mab. 4G8). Pow. 400x

Rycina 22a-b.

Przypadek chA. Surowica przeciw β -peptydowi. Warstwa drobinowa kory mózdzku. **a.** strzałki wskazują ogniskowe złogi β -amyloidu. Pow. 400x; **b.** złóg ogniskowy w warstwie drobinowej kory mózdzku. Pow. 400x

Rycina 23.

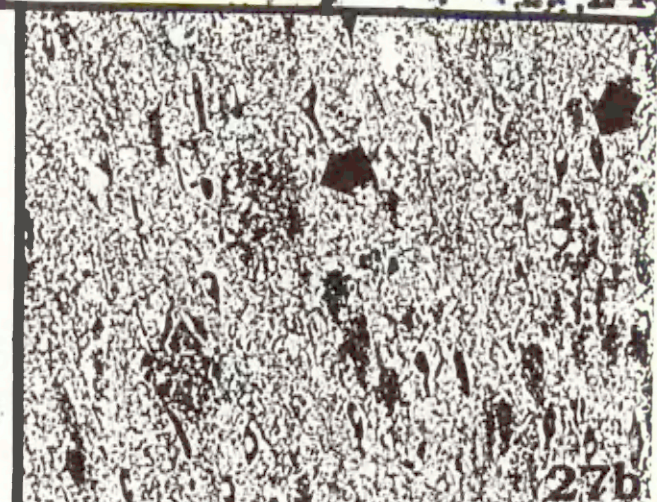
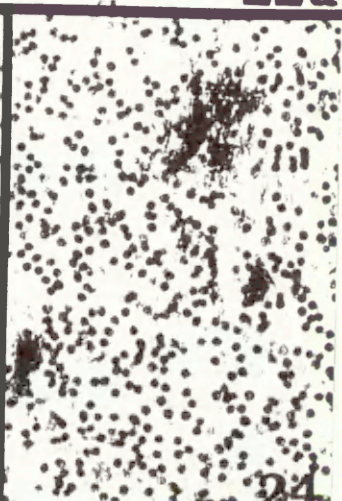
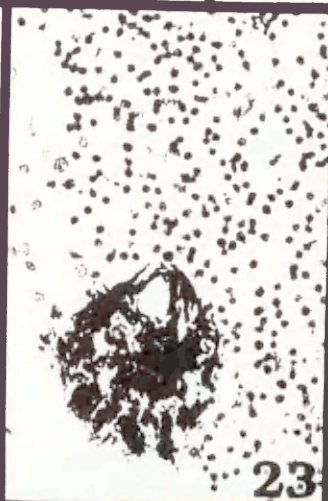
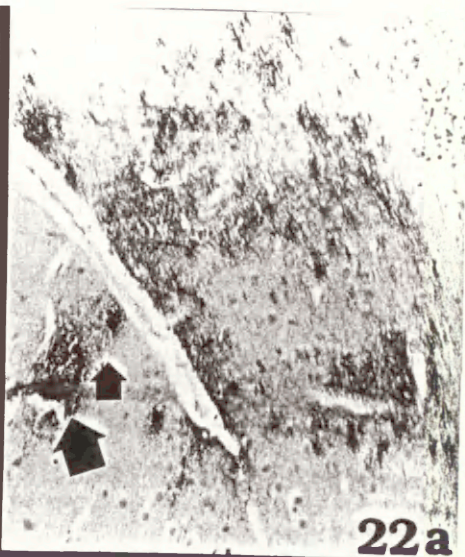
Barwienie przeciw β -amyloidowi. Złóg ogniskowy w warstwie komórek zwojowych mózdzku. Pow. 400x

Rycina 24.

Ogniskowe złogi β -amyloidu w warstwie ziarnistej wewnętrznej kory mózdzku. Pow. 400x

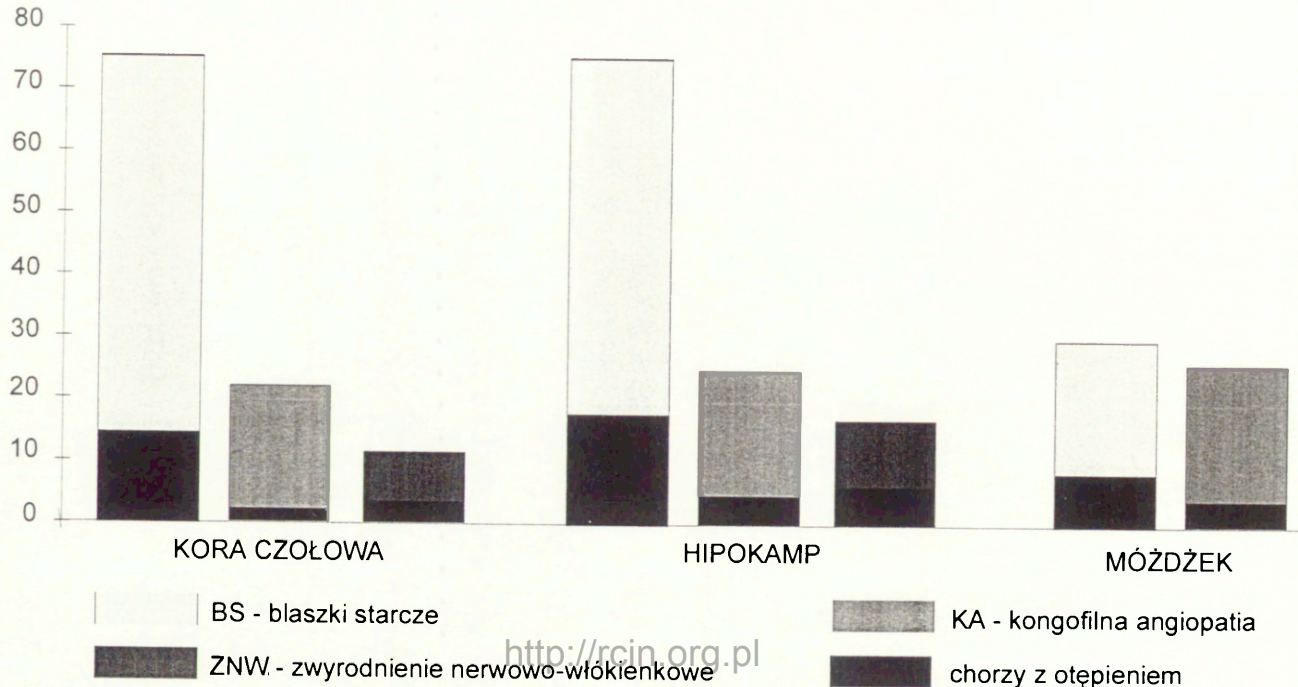
Rycina 27a-b.

Przypadek chA. Dwa sąsiednie skrawki pochodzące z hipokampa. **a.** barwienie przeciw β -amyloidowi uwidacznia dwa klasyczne złogi ogniskowe amyloidu. Pow. 400x; **b.** barwienie skierowane przeciw białku tau I, z tego samego przypadku. Widoczne liczne nitki neuropilowe, neurony z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego i neurytyczny komponent (strzałki) obu klasycznych złogów uwidoczniionych na rycinie 27a. Pow. 200x



Rycina 25. Obecność blaszek starczych, kongofilnej angiopatii w mózgach chorych zmarłych w wieku powyżej 80. roku życia w grupie przypadków z otępieniem i bez otępienia

Liczba przypadków



4.2. W 385 przypadkach (23-90 lat) z pierwotnym opóźnieniem rozwoju obserwowano znamienne przewagę występowania zmian amyloidowych w korze nowej i śródwęchowej w porównaniu z hipokampem, przy $p < 0.05$ (Ryc. 26).

4.3. Różnice w liczbie blaszek starczych w obrębie poszczególnych warstw kory dotyczyły płata skroniowego i potylicznego zarówno w przypadkach ze stwierdzonym klinicznie otępieniem (choroba Alzheimera i zespół Downa) jak i bez cech otępienia. W płacie skroniowym w przypadkach z otępieniem największą liczbę blaszek starczych obserwowano w warstwie III kory (chA - 42 % i zD - 53 %), a następnie w warstwie II (chA - 27 % i zD - 28%). W grupie przypadków bez otępienia największą liczbę BS stwierdzono w warstwie II - (50%) i w V - (50%). W płacie potylicznym najwyższą liczbę blaszek stwierdzono w warstwie IV (chA - 29%, zD - 38%) i dalej w warstwie III - (chA - 32%, zD - 28%) i w II (chA - 22%, zD - 18%). W płacie potylicznym w grupie chorych bez otępienia najwyższą liczbę BS stwierdzono w warstwie IV, a w dalszej kolejności w warstwach III (19 %) i V (19%).

5. Patologia białek cytoskeletonu

5.1. Przeprowadzono porównanie liczby zmian neurofibrylarnych w grupie chorych z klinicznymi cechami otępienia z danymi uzyskanymi w przypadkach bez cech demencji. Badania morfometryczne wykazały, że w grupie chorych bez otępienia liczba ZN była znacznie niższa (Tab. 7).

Badania immunohistochemiczne wykazały także większą liczbę zmian neurofibrylarnych przy użyciu przeciwciał anty tau 1 niż przy użyciu surowic przeciwko ubikwitynie (Tab. 8).

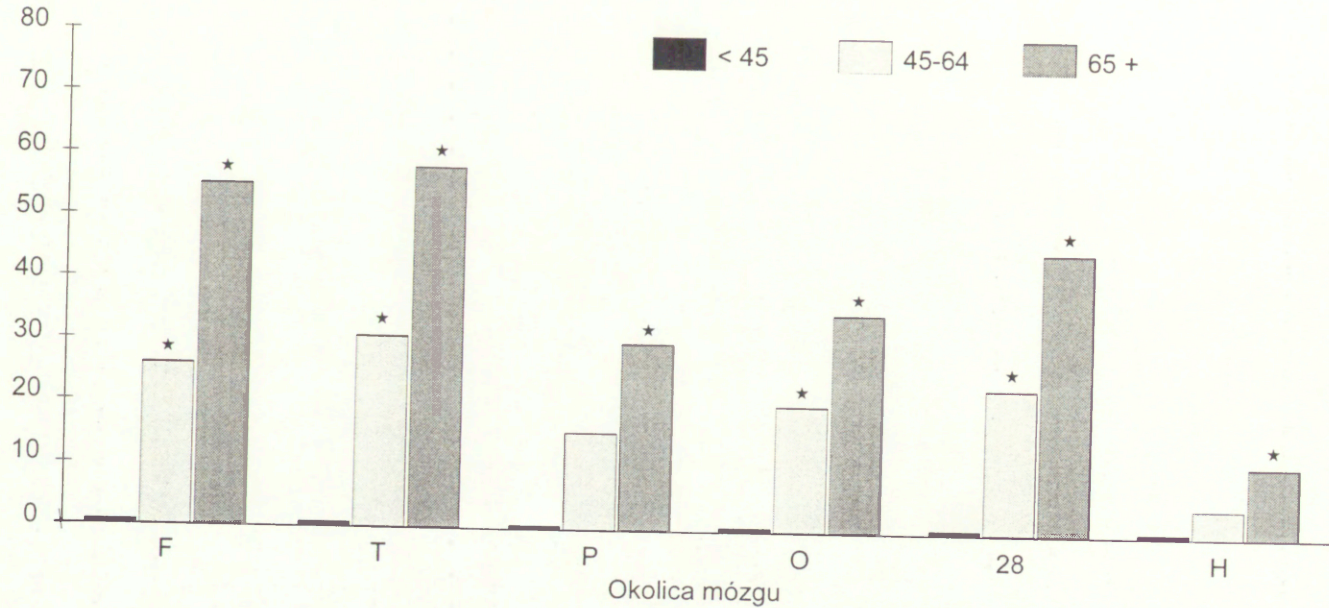
Tabela 8. Porównanie liczby ZN uwidoczniionych w odczynach immunohistochemicznych z zastosowaniem przeciwciał anty tau 1 i anty ubikwitynie (5 przypadków choroby Alzheimera)

Surowice							
Anty tau 1				Anty ubikwityna (3.39)			
Kora nowa		Hipokamp		Kora nowa		Hipokamp	
ZN	BS	ZN	BS	ZN	BS	ZN	BS
43,0	17,6	26,8	5,9	1,5	2,2	3,7	1,2
22,5	17,5	20,2	11,0	2,2	0	3,0	2,2
23,2	10,8	34,5	7,3	10,3	4,5	28,7	3,5
29,0	16,1	38,9	12,7	9,0	10,2	10,7	7,9
0	0	21,4	2,7	0	0	4,0	0,3

Wyniki przedstawione w tabelach wskazują, że parzyste spiralne filamenty w neurytycznych częściach BS (Ryc. 27) pojawiają się tylko przy występowaniu zwyrodnienia neurofibrylarnego neuronów, nie występują one natomiast jako zjawisko samodzielne bez zmian neuronalnych. To samo dotyczy dotyczy nitek neuropilowych.

Rycina 26. Liczba blaszek starczych w różnych okolicach mózgu w poszczególnych grupach wiekowych (w latach)

Średnia liczba blaszek starczych na mm²



F - płat czołowy
T - płat skroniowy

P - płat ciemieniowy
O - płat potyliczny

28 - 28 pole Brodmana
H - hipokamp

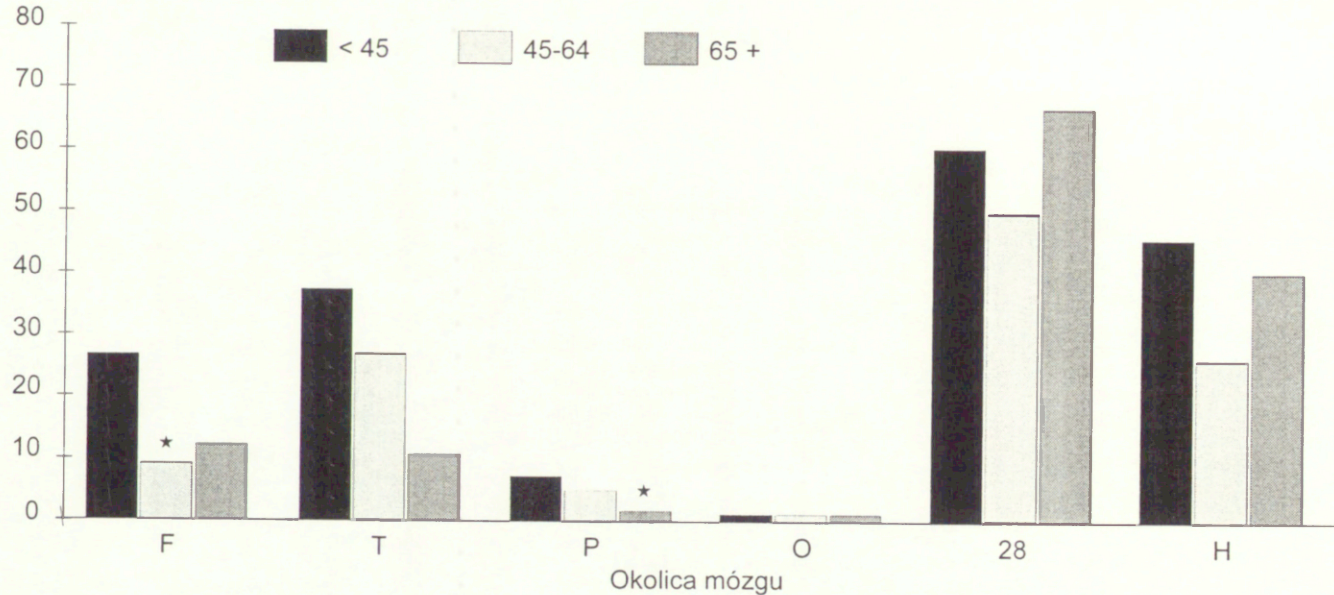
Tabela 7. Porównanie występowania blaszek starczych (BS) i neuronów z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego (ZN) w chorobie Alzheimera (ChA) i w przypadkach bez cech otępienia (NO)

Rozpoznanie kliniczne	Wiek lata	Przeciwciała anty amyloidowe		Przeciwciała anty tau 1			
		Kora	Hipokamp	Kora		Hipokamp	
		BS	BS	ZN	BS	ZN	BS
		ChA	62	57,6*	15,6	43,1	17,6
ChA	64	42,6	11,0	22,5	17,5	40,2	11,0
ChA	64	54,7	13,0	23,2	10,8	34,5	7,3
ChA	75	58,8	18,0	29,0	16,1	38,9	12,7
ChA	88	24,9	20,5	0	0	21,4	2,7
NO	72	32,6	9,6	0,1	0,1	0,5	0,3
NO	82	47,7	13,0	0	0	0	0
NO	83	31,1	24,4	0,5	0,1	5,6	6,2
NO	84	57,8	4,9	7,3	2,5	4,0	3,0
NO	88	40,4	8,2	1,8	0	8,8	5,2

* liczba zmian na jeden mm², w dwu porównywanych barwieniach. Różnice wartości liczbowych wynikają z obecności lub braku wypustek z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego w obrębie blaszek starczych.

Rycina 28. Liczba neuronów z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego (ZN) w różnych okolicach mózgu w poszczególnych grupach wiekowych (w latach)

Średnia liczba ZN na mm²



F - płat czołowy
T - płat skroniowy

P - płat ciemieniowy
O - płat potyliczny

28 - 28 pole Brodmana
H - hipokamp

5.2. W grupie przypadków starczych powyżej 80 roku życia tylko w 12 mózgach stwierdzono występowanie neuronów z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego i tylko w tych, w których jednocześnie obecne były blaszki starcze. Tylko w 4 spośród tych przypadków klinicznie rozpoznano zespół otępienny.

5.3. Badania przeprowadzone w grupie 385 przypadków z niedorozwojem wykazują także, że neuronalne zmiany włókienkowe rzadko występują jako objaw izolowany, a znacznie częściej towarzyszą nagromadzeniu amyloidu. W 385 mózgach jednoczesne występowanie ZN i BS stwierdzono w 63,4 % przypadków. Zwyrodnienie neurofibrylarne jako objaw izolowany, obecne było w 27,8 %, a blaszki starcze bez ZN w 8,6 %. Blaszkę starczą zarówno jako zjawisko izolowane jak i z towarzyszącym ZN pojawiały się znamienne częściej wraz z wiekiem ($p < 0.001$). Tej prawidłowości nie stwierdzono dla izolowanego występowania neuronów z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego. W jądrze Meynerta ZN były obecne w 35,2% badanych przypadków w wieku 23 - 44 lat. W wieku 45-64 lat w 42,4% a w wieku powyżej 65 lat w 17,9% przypadków. Zwyrodnienie neurofibrylarne komórek nerwowych w hipokampie i okolicy okolohipokampalnej najczęściej obecne było w polu 28 Brodmanna. W okresie uogólnienia procesu zwyrodnienia neurofibrylarne neuronów pojawiało się także w korze nowej (Ryc. 28).

5.4. Dla wyjaśnienia kwestii zależności występowania ZN i amyloidu posłużono się grupą przypadków z chorobą Parkinsona, stanowiącą proces zwyrodnieniowy, w którym obecność amyloidu nie należy do osiowych elementów procesu patologicznego. Przy użyciu swoistych barwień immunohistochemicznych oceniono zwyrodnienie neurofibrylarne obecne w komórkach barwnikowych (Ryc. 29) i w neuronach innych struktur mózgowia w przypadkach chP, porównując częstość ich występowania z przypadkami

chA i materiałem kontrolnym ludzi starych bez cech otępienia. Stwierdzono współlistnienie zwyrodnienia neurofibrylarnego ze zmianami amyloidowymi w korze nowej - we wszystkich przypadkach chA, w 2 na 7 przypadków chP i w 3 na 6 przypadków z grupy bez cech otępienia. W istocie czarnej zwyrodnienie neurofibrylarnie neuronów barwnikowych obecne było w 10 przypadkach chA, w 2 przypadkach chP i w żadnym z przypadków bez cech otępienia. Białki starcze w istocie czarnej (ryc. 30) stwierdzono w 6 przypadkach chA, w 2 w chP i w żadnym w grupie kontrolnej. Z kolei zastosowanie przeciwciał przeciw ubikwitynie wykazało obecność ciał Lewy'ego w istocie czarnej we wszystkich przypadkach chP (ryc. 31) i w jednym - chA (Tab. 9).

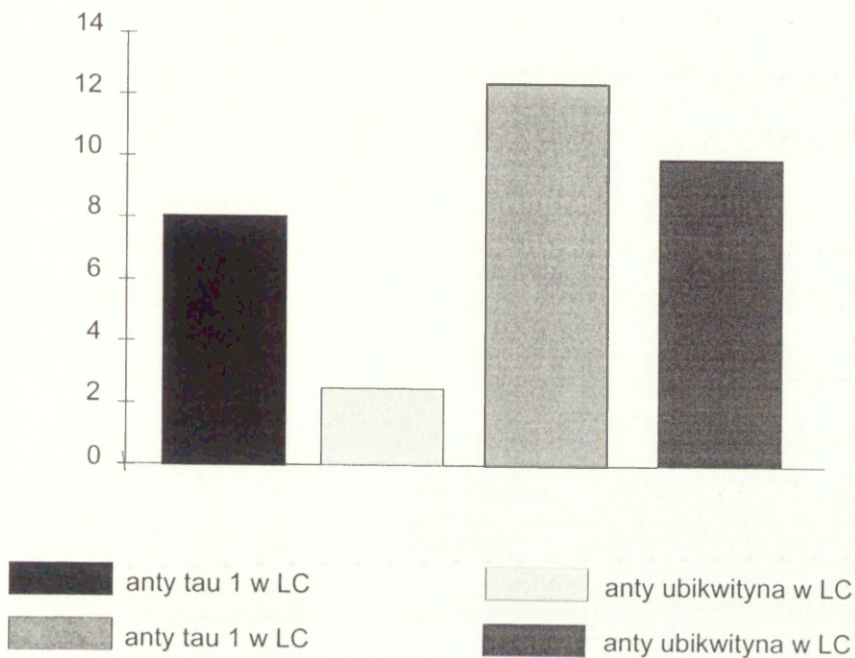
Tabela 9. Porównawcza ocena występowania blaszek starczych i zwyrodnienia neurofibrylarnego w chorobie Alzheimera i chorobie Parkinsona

Rozpoznanie kliniczne	Liczba przypadków	Białki starcze		Zwyrodnienie neurofibrylarnie	
		Kora	Istota czarna	Kora	Istota czarna
ChA	10	10	6	10	10
ChP	10	7	2	2	2
Material kontrolny	6	6	0	3	0

5.5. W przebiegu choroby Alzheimera, a rzadziej w chorobie Parkinsona i u osób bez cech obu zespołów chorobowych zwyrodnienie neurofibrylarnie bardzo wczesnie pojawia się w jądrach miejsca sinawego (Ryc. 32). W badaniach immunohistochemicznych jąder pnia stwierdzono, że komórki jądra sinawego z ZN barwią się odmiennie od komórek

Rycina 34. Porównanie liczby neuronów z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego (ZN) uwidocznionych przez surowicę anty tau 1 i anty ubikwitynie w jądrze miejsca sinawego

Średnia liczba neuronów z ZN



LC - locus coeruleus - jądro miejsca sinawego

jąderek szwu z tym samym typem patologii cytoskeletonu. Stwierdzono wyraźne opóźnienie ubikwitynizacji (Ryc. 33) zmian w neuronach locus coeruleus (LC) w stosunku do komórek nerwowych jąderek szwu (ryc. 34). Skłoniło to do porównania w tym samym aspekcie jądra miejsca sinawego z istotą czarną w badanych przypadkach (chA, chP i kontrolnych). Przy zastosowaniu surowic anty tau 1 w jądrze miejsca sinawego stwierdzono od 1 do 48 neuronów ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym na skrawek, przy 1 do 80 neuronów na skrawek w istocie czarnej; w odczynie anty ubikwitynie wykonanym na przylegających skrawkach obu struktur wykazano odpowiednio od 0 do 21 neuronów w jądrze miejsca sinawego i od 1 do 78 w istocie czarnej. W objętych badaniem przypadkach chA i chP średnia liczba neuronów ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym uwidocznionym w odczynie anty tau 1 w jądrze miejsca sinawego wynosiła 206 na skrawek a w istocie czarnej 316 w porównaniu z 60 neuronami z ZN w jądrze miejsca sinawego i 244 w istocie czarnej przy użyciu surowic przeciw ubikwitynie.

5.6. Ocena obecności patologicznych białek cytoskeletonu w mózdku przeprowadzono na skrawkach pochodzących od chorych zmarłych z powodu udaru po 80 roku życia. W odczynie anty tau 1 nie stwierdzono zmian o charakterze ZN, niezależnie od obecności złożeń amyloidu. Wykazano natomiast, że złożeń amyloidowe w swojej części neurotycznej wybarwiały się surowicami skierowanymi przeciw ubikwitynie (Ryc. 35).

5.7. Zależność współwystępowania złożeń amyloidowych i patologii białek cytoskeletonu w różnych procesach zwyrodnieniowych oceniano w 10 mózgach chorób, u których klinicznie stwierdzono współistnienie otępienia i zespołu parkinsonowskiego. Obserwowany w tych przypadkach obraz kliniczny nie pozwolił na postawienie nozologicznego rozpoznania. W badaniu neuropatologicznym we wszystkich mózgach stwierdzono

obecność BS w liczbie odpowiadającej kryteriom choroby Alzheimera, w 9 przypadkach towarzyszyło im ZN. W każdym przypadku stwierdzono ponadto obecność ciał Lewy'ego w neuronach istoty czarnej a w 3 spośród nich również w korze skroniowej (Ryc. 36ab).

6. Udział astrogleju i mikrogleju w procesie starzenia oun

6.1. Reakcja gleju włóknistego na złogi amyloidu w mózgach osób z rozpoznąną klinicznie chorobą Alzheimera

Nie obserwowano na ogół pomnożenia komórek GFAP-dodatnich w złogach amyloidu rozproszonego (Ryc. 37abc). Stwierdzono jedynie zbieżność obecności astrogleju i amyloidu rozproszonego w podoponowej części warstwy drobinowej kory mózgu. W mózdzku, w którym nierzadko obecne są rozlane zmiany amyloidowe spostrzega się także pomnożenie komórek gleju włóknistego. Bardzo często nie pokrywają się one jednak z obrazem złogów amyloidu. To samo zresztą dotyczy także kory nowej.

We wszystkich badanych przypadkach, w których występowały ogniskowe złogi amyloidu w neuropilu, komórki astrogleju układały się na ich obwodzie (Ryc. 38ab). Pojawiały się one przy tym znacznie częściej wokół blaszek klasycznych choć otaczały również blaszki prymitywne. Należy przy tym dodać, że odczyn GFAP w tkankach zawierających BS uwidacznia jedynie część, a nie wszystkie złogi amyloidowe.

Ocenę penetracji złogów amyloidu przez wypustki astrocytarne przeprowadzono na fragmentach tkankowych z płatów czołowych 6 przypadków zmarłych po 80 roku życia, przy czym nie stwierdzono istotnej różnicy pomiędzy przypadkami z rozpoznany klinicznie zespołem psychoorganicznym i przypadkami bez cech otępienia, znamionującymi się znaczną obfitością blaszek amyloidowych. Odczyny immunohistochemiczne przeciw

Rycina 29.

Przypadek chP. Istota czarna. W barwieniu przeciw białku tau 1 widoczne zwyrodnienie neurofibrylarne w obrębie komórki barwnikowej istoty czarnej (strzałka). Pow. 400x

Rycina 30.

Przypadek chA. Barwienie immunohistochemiczne przy użyciu surowicy przeciw β -amyloidowi (mab. 4G8). Widoczne złoże amyloidu w obrębie istoty czarnej. Pow. 400x

Rycina 31.

Barwienie przy użyciu surowic przeciwko ubikwitynie uwidocznia ciała Lewy'ego w neuronach barwnikowych istoty czarnej przypadku z chP. Pow. 400x

Rycina 32.

Barwienie immunohistochemiczne przeciw białku tau 1. Neuron jądra miejsca sinawego z cechami zwyrodnienia neurofibrylarne. Pow. 600x

Rycina 33.

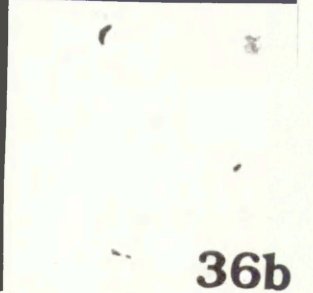
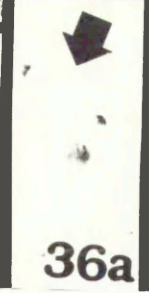
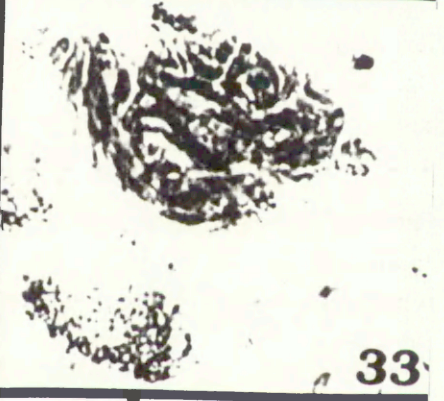
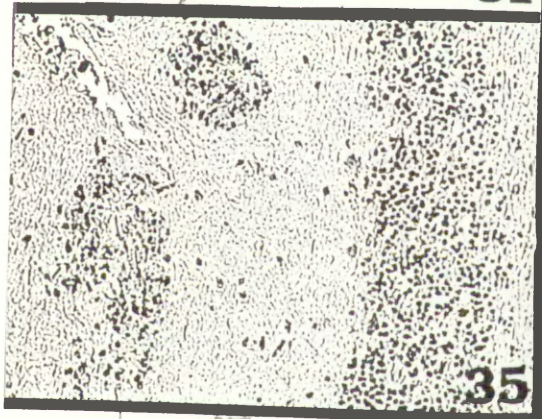
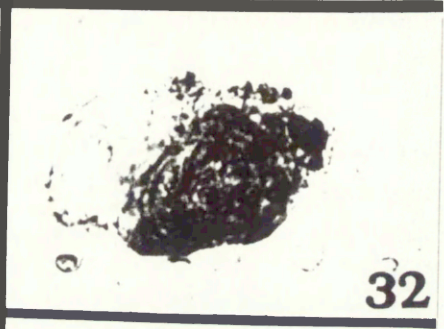
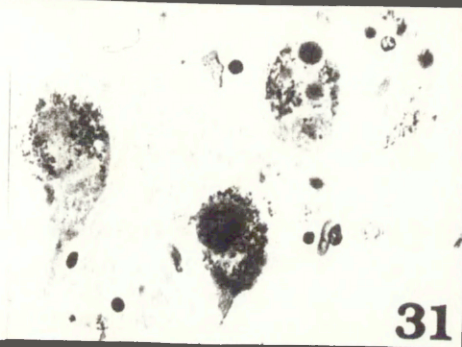
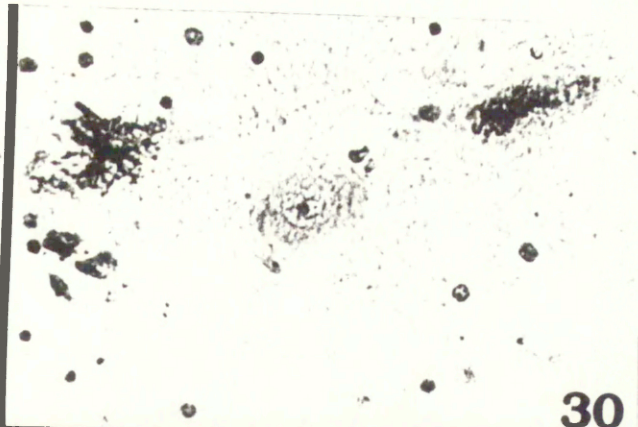
Jądro miejsca sinawego. Barwienie przy użyciu surowicy przeciw ubikwitynie (mab. 3.39). Neuron z cechami zwyrodnienia neurofibrylarne. Pow. 600x

Rycina 35.

Obecność ubikwityno-dodatnich białek w obrębie złogów amyloidu w wstwie drobinowej mózdzku. Pow. 200x

Rycina 36a-b.

Barwienie przeciw ubikwitynie wykazuje obecność ciał Lewy'ego w neuronach III warstwy kory płata skroniowego (strzałki). Przypadek choroby rozsianych ciał Lewy'ego. Pow. 400x



Rycina 37a-c.

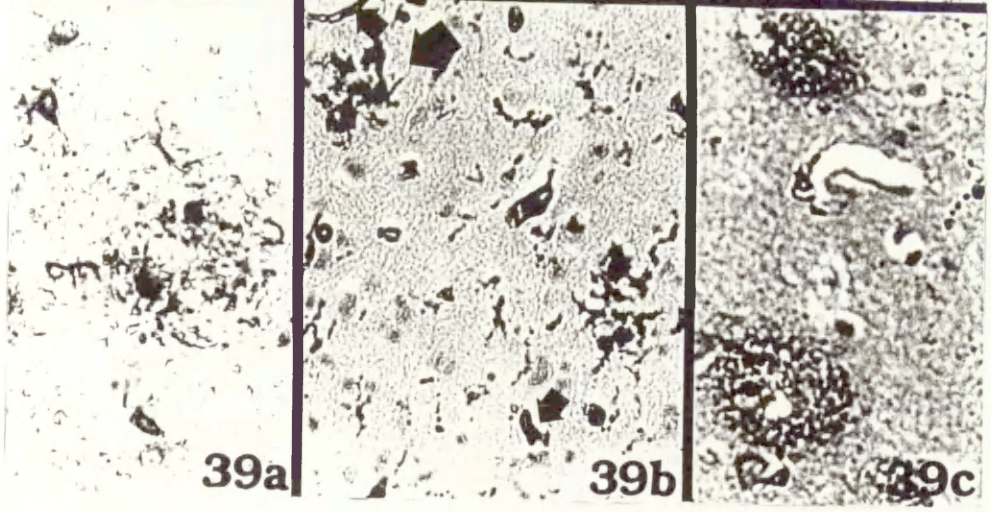
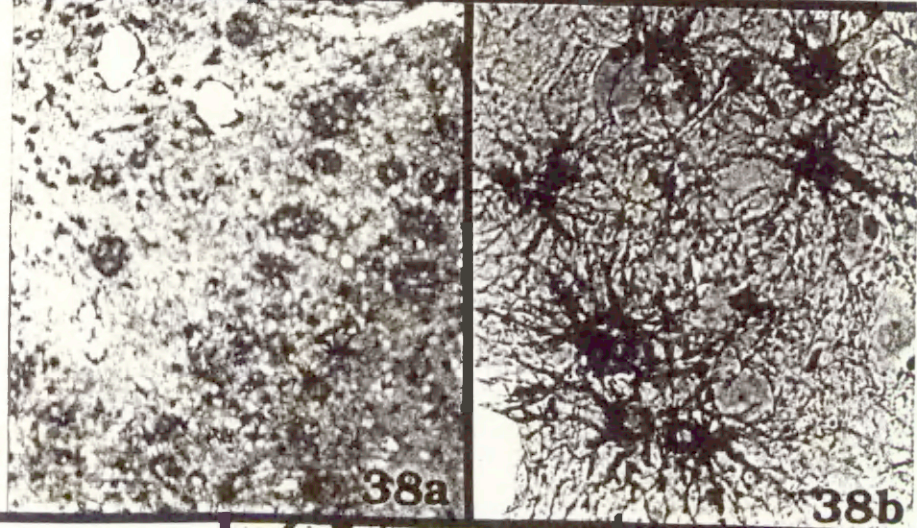
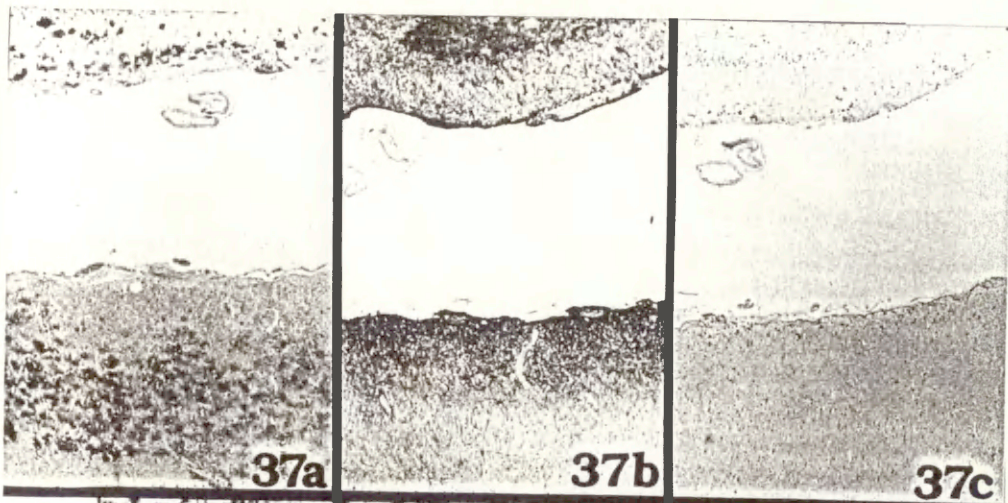
Udział gleju w złogach amyloidu rozproszonego. Przypadek chA. Kora śródwęczowa. **a.** amyloid amorficzny (mab. 4G8). Pow. 100x; **b.** sąsiedni skrawek. Barwienie przeciw GFAP, brak reakcji w obrębie amyloidu. Pow. 100x; **c.** podobnie negatywny wynik w barwieniu anty ferrytynowym, uwiadczniającym mikroglej. Pow. 100x

Rycina 38a-b.

Przypadek chA. Barwienie anty GFAP. **a.** liczne złogi amyloidu wyznaczone dodatnio przez barwienie. Pow. 200x; **b.** komórki gleju gwiaździstego widoczne na obwodzie złogu amyloidowego. Pow. 400x

Rycina 39a-c.

Przypadek chA. **a.** barwienie przeciwciałem przeciw ferrytynie uwiadcza obecność komórek mikroglejowych wewnątrz blaszki amyloidowej. Pow. 200x; **b.** barwienie przy użyciu lektyny RCA 1. Poza mikroglejem skupionym wewnątrz złogów amyloidowych (duża strzałka), wybarwione również śródbłonki naczyń (małe strzałki). Pow. 200x; **c.** komórki mikrogleju wyznaczone surowicą przeciw peptydowi 4 prekursora amyloidu, widoczne wewnątrz złogu amyloidowego. Pow. 200x



β -amyloidowi i GFAP wykazały, że od 18,7% do 58 %, ($\pm 38,5\%$) złogów amyloidu wykazuje obecność GFAP dodatnich astrocytów. Wśród blaszek z dodatnim odczynem dla GFAP amyloid stwierdza się od 34% do 56% ($\pm 45\%$). W obydwu badanych grupach liczba blaszek starczych wybarwiających się jednocześnie surowicami przeciw β -amyloidowi i GFAP wynosi średnio 36% (Tab. 10).

Tabela 10. Porównanie liczby blaszek starczych na 1 mm² wybarwionych przy użyciu przeciwciał przeciw GFAP i β -amyloidowi

Wiek w latach	Ostępnie	Liczba BS na 1 mm ²		
		GFAP	β -amyloid	GFAP/ β -amyloid
83	+	14,9 (55,7%)	14,2 (58,4%)	8,3
86	+	8,3 (43,4%)	19,1 (18,1%)	3,6
85	+	7,2 (33,6%)	7,25 (33,5%)	2,4
86	-	6,9 (38,6%)	8,1 (32,8%)	2,7
90	-	9,4 (42,3%)	12,9 (31,0%)	4,0
87	-	25,4 (37,8%)	20,4 (47,1%)	9,6

Liczby w nawiasach oznaczają procent BS dodatnich dla obu barwień jednocześnie.

6.2. Reakcja mikroglejowa

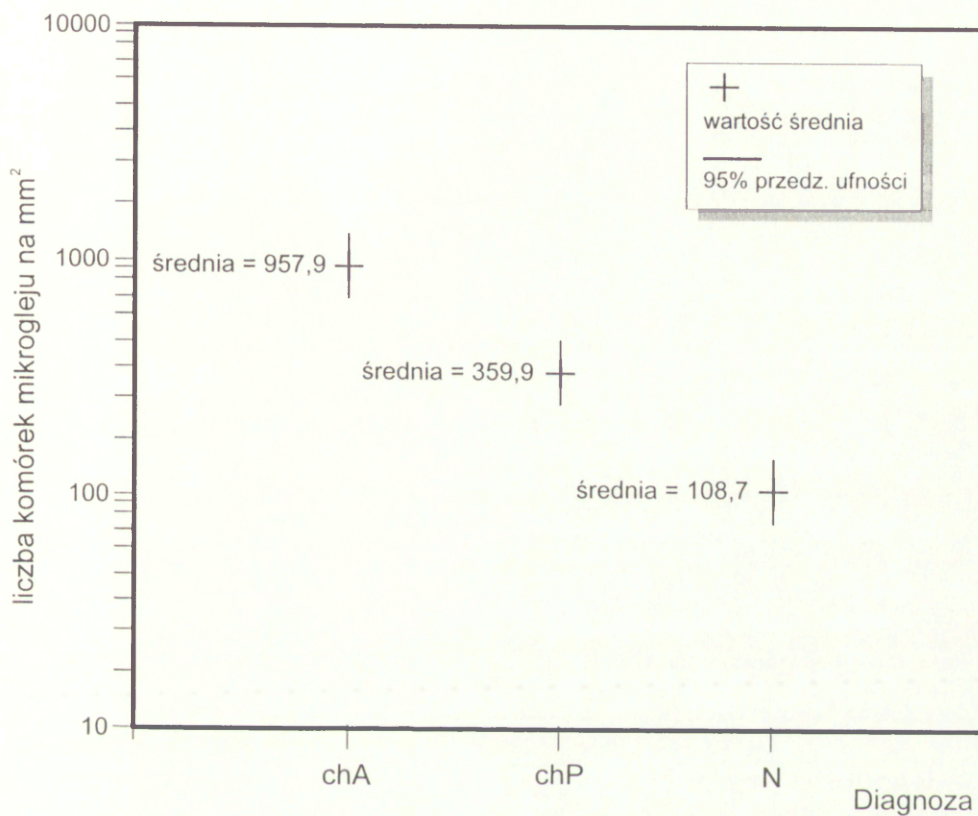
Komórki mikroglejowe wyznaczane przy użyciu różnych przeciwciał (lektyna RCA I, przeciwciała przeciwko: ferrytynie, LN 1, przeciwko fragmentowi 4 APP) grupują się zawsze po kilka w centrum blaszki. Większość komórek mikrogleju wykazuje związek

z blaszkami starczymi. Można jednakże zauważyć również skąpą proliferację komórek mikrogleju w obszarach, w których nie są one wyraźnie powiązane z amyloidem (Ryc. 39abc).

6.2.1. Komórka mikroglejowa związana jest głównie z klasyczną blaszką starczą to jest taką, która wykazuje obecność neurytycznego wieńca utworzonego przez wypustki neuronów zawierających patologicznie białka cytoskeletonu (ZN). Decyduje to o obfitości mikrogleju w strukturach bogatych w ten typ blaszek starczych. Proliferacja mikrogleju w istocie czarnej nie koreluje jednak z obecnością ZN w neuronach. Obfite komórki mikrogleju stwierdzano ponadto w istocie białej, w jądrach podstawy, w istocie czarnej i w jądrze Meynerta, bez związku z amyloidem. W korze nowej pomnożenie komórek mikrogleju występuje w związku ze złoгами amyloidowymi.

Wyraźną proliferację komórek mikroglejowych dodatnich w odczynie anty-ferrytyny i lektyny RCA-1 (rącznik pospolity) stwierdzono w istocie czarnej w przypadku chA (średnio 957,9 komórek na 1 mm²), niezależnie od obecności amyloidowych blaszek starczych (Ryc. 40ab). Mniejszą liczbę komórek mikroglejowych zaobserwowano w istocie czarnej w chorobie Parkinsona (Ryc. 41ab) a najniższą w grupie przypadków starczych (Ryc. 42ab). Pomnożenie mikrogleju miało cechy znamienności statystycznej (przy $p < 0,001$) w przypadkach chA (Ryc.43). Nie stwierdzono statystycznie znamiennego związku pomiędzy liczbą komórek mikrogleju a liczbą BS i ZN w istocie czarnej (Tab. 11). Podwójne barwienie z zastosowaniem przeciwciał przeciw GFAP i ubikwitynie wykazało współwystępowanie obu tych białek w pniu mózgu w przypadkach rozpadu zmian neurofibrylarnych (Ryc. 44ab).

Rycina 43. Liczba komórek mikrogleju w SN
(ANOVA S-test dla porówn. równoczesnych)



SN - substantia nigra - istota czarna

chA - choroba Alzheimerera

chP - choroba Parkinsona

N - przypadki kontrolne

Rycina 40a-b.

Przypadek chA. Istota czarna. Liczne komórki mikroglejowe (strzałki), uwidocznione w barwieniu immunohistochemicznym przy użyciu przeciwciał przeciw ferrytynie. **a.** Pow. 400x, **b.** Pow. 200x

Rycina 41a-b.

Przypadek chP. Miernie nasiloną reakcją komórek mikrogleju w obszarze istoty czarnej (strzałki). Barwienie surowicą skierowaną przeciw ferrytynie. **a.** Pow. 200x, **b.** Pow. 400x

Rycina 42a-b.

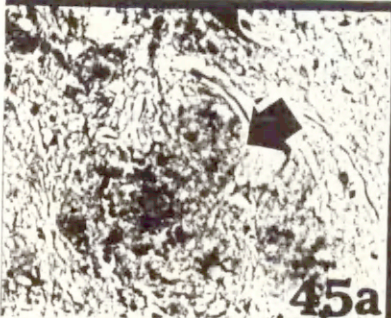
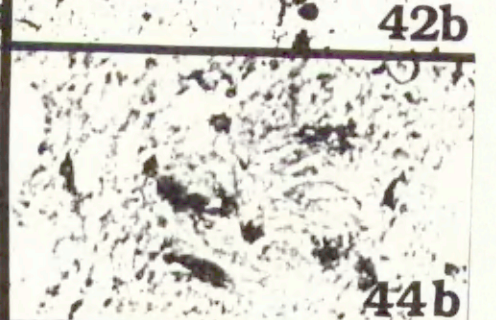
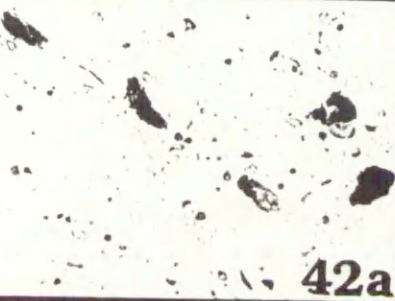
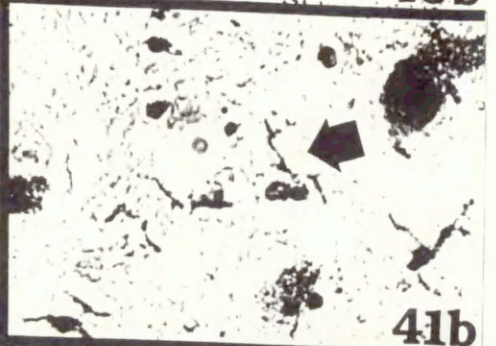
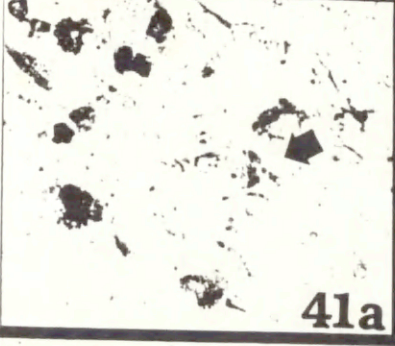
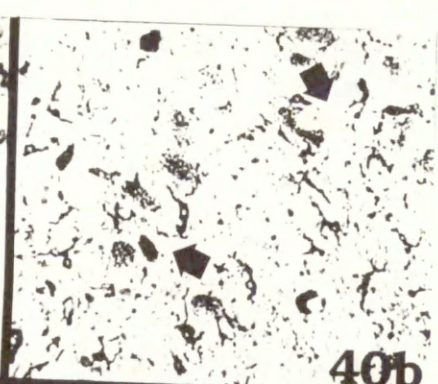
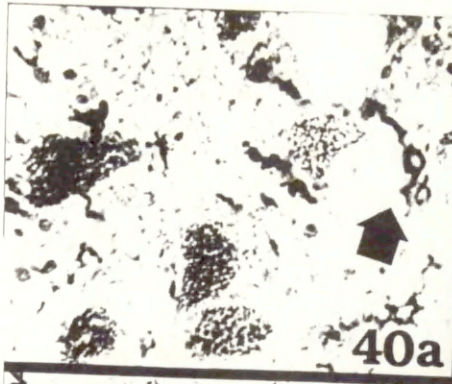
Przypadek starczy, kontrolny. Minimalna reakcja mikroglejowa w obrębie istoty czarnej. Barwienie immunohistochemiczne jak wyżej. **a.** Pow. 200x, **b.** Pow. 400x

Rycina 44.

Przypadek chP. **a.** podwójne barwienie, przeciw GFAP (zielone) i białku tau 1 (brązowe) wykazuje obecność tau dodatnich neurytów w obrębie zwyrodnienia neurofibrylarnego dodatniego dla GFAP. Pow. 600x; **b.** barwienie przy użyciu przeciwciała przeciw ferrytynie wykazuje obecność mikrogleju w obrębie zwyrodnienia neurofibrylarnego. Pow. 600x

Rycina 45a-b.

Przypadek amyloidozy PrP dodatniej. Obecność mikrogleju (strzałki) w obrębie złogów amyloidowych w barwieniu anty ferrytynowym w warstwie drobinowej kory mózdzku. **a.** przypadek CJD. Pow. 400x; **b.** przypadek GSS. Pow. 400x



Rycina 46. Procent przypadków wykazujących obecność leukocytów, makrofagów i gemistocytów w obszarze zawału w zależności od czasu przeżycia

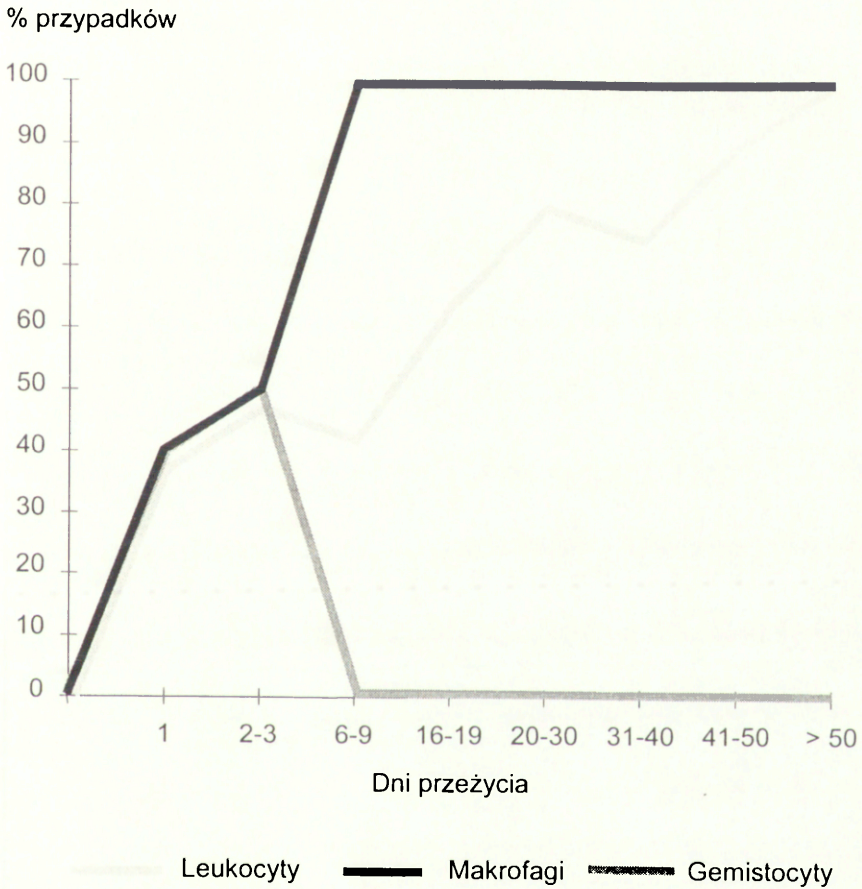


Tabela 11. Reakcja komórek mikroglejowych w istocie czarnej w chorobie Alzheimera i chorobie Parkinsona w porównaniu z grupą starczą (NS), w zależności od współwystępowania złogów amyloidu, zwyrodnienia neurofibrylarnego i ciał Lewy'ego. Badanie neuropatologiczne i morfometryczne

Rozpoznanie	Liczba		Obecność ciał Lewy'ego	Liczba komórek mikrogleju na 1 mm ²
	BS w istocie czarnej	ZN		
ChA	7	5	0	887,5
ChA	0	60	0	562,5
ChA	2	6	0	1162,5
ChA	2	2	0	1212,5
ChA	0	13	0	1200,0
ChA	0	9	0	1825,0
ChA	3	1	0	600,0
ChA	1	10	+	525,0
ChA	0	5	0	1850,0
ChA	12	90	0	987,5
ChP	0	2	+	487,5
ChP	0	0	+	312,5
ChP	0	0	+	225,5
ChP	0	0	+	737,5
ChP	5	4	+	300,0
ChP	0	0	+	612,5
ChP	0	0	+	312,5
ChP	1	0	+	437,5
ChP	5	0	+	200,0
ChP	0	0	+	325,0
NS	0	0	0	137,5
NS	0	0	0	137,5
NS	0	0	0	150,0
NS	0	0	0	100,0
NS	0	0	0	100,0
NS	0	0	0	62,5

6.2.3. Uzupełniająco przeprowadzono porównawczą analizę reakcji mikrogleju w chA i chP i w amyloidozach, w których udowodniono zakaźną etiologię. Analiza ta miała na celu charakterystykę odczynu mikroglejowego na amyloid o różnym pochodzeniu. Mikroglej występował w blaszkach amyloidowych w GSS i w CJD (Ryc. 45ab), a także bez związku ze złogami amyloidowymi. W obu tych zespołach, proliferaacja mikrogleju, poza złogami amyloidu, była znacznie bardziej nasiloną niż w chA i chP. Pojawiała się w okolicach nie wykazujących obecności amyloidu - w istocie białej i w jądrach podstawy.

Stwierdzono więc dwa rodzaje reakcji mikrogleju w amyloidozach. Pierwszy ma charakter ogniskowy i jest identyczny w złogach PrP- i β -amyloidowych. W obu przypadkach komórki mikrogleju położone są w centrum złogu. Drugi - stanowi uogólnione pomnożenie populacji komórkowej mikrogleju dotyczące głównie kory mózgu i w mniejszym stopniu - istoty białej. Drugi rodzaj reakcji stwierdzono w 5 z badanych przypadków CJD i w mózgach przypadków chA.

6.3. Udział gleju w fagocytozie zmian amyloidowych i neuronów ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym

Przeprowadzono analizę 32 mózgow ze złogami amyloidu, pochodzących od chorych, którzy zmarli w przebiegu zawału niedokrwiennego. Pięciu pacjentów zmarło w pierwszym dniu choroby, dwóch w ciągu 2-3 dni, siedmiu w czasie 6-9 dni, trzech pomiędzy 16 i 19 dniem, pięciu w okresie 20-30 dni, a trzech w okresie 31-40 dni. Siedmiu chorych zmarło po 40 dniach od dokonania się udaru. Przedmiotem oceny był obszar martwicy tkanki, obrzeże zawału i zakręt hipokampa niezależnie od jego stosunku do ogniska zawałowego. W ośmiu przypadkach poza BS stwierdzono obecność ZN.

Błaszki starcze uwidocznione immunohistochemicznie przy zastosowaniu przeciwciał przeciw β -amyloidowi barwiły się także przy użyciu innych przeciwciał. Świadczyło to o zawartości w nich obok amyloidu i innych białek. Procentowy stosunek BS znajdujących się w obszarach nie objętych zawałem, dodatnich w odczynie dla β -amyloidu do blaszek uwidoczniionych przy użyciu surowic przeciw innym białkom wynosił odpowiednio: surowica przeciw GFAP barwiła 37% blaszek starczych, RCA 1 - 56% , przeciwciała przeciw ferrytynie - 50%, przeciw α -chemotrypsynie - 90%, anty α -trypsynie - 50%, przeciw ubikwitynie w 9%, a anty tau 1 - 25%.

Analiza obszaru martwicy w różnych fazach ewolucji ogniska wykazała obecność elementów komórkowych uczestniczących w kolejnych etapach rozbiórki (Ryc. 46). Leukocyty stwierdzono w ciągu pierwszych 5 dni, makrofagi były obecne od pierwszego dnia do okresu przekraczającego 50 dni, osiągając największe zagęszczenie po 6 dniach.

Gemistocyty pojawiały się od pierwszego dnia dokonania się udaru. Liczba przypadków, z obecnością gemistocytów w obszarze martwicy wzrastała z postępem ewolucji procesu rozbiórkowego (Ryc. 47).

Fagocytoza złożeń amyloidu i neuronów ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym przebiegała w różny sposób w zależności od fazy organizacji ogniska martwiczego. W pierwszym dniu organizacji ogniska zawału w tkankach z cechami zwyrodnienia alzheimerowskiego stwierdzono obecność makrofagów w 40% przypadków. W tym w 10% przypadków amyloid występował wewnątrz makrofagów (Ryc. 48abcd). W okresie 2 - 3 dnia zawału w każdym badanym przypadku stwierdzono w makrofagach obecność substancji wykazujących dodatni odczyn immunohistochemiczny dla β -amyloidu, przy czym makrofagi występowały w 50% przypadków. Od 6 dnia makrofagi były obecne w 100% przypadków. Liczba makrofagów z dodatnią reakcją dla przeciwciał przeciw β -amyloidowi była niższa i nie przekraczała 10% - w 6-9 dniu, a 30% w 16-19 dniu. Pomiędzy 20

a 30 dniem ewolucji ogniska martwicy w każdym przypadku obserwowano obecność β -amyloidu w makrofagach. Następnie liczba przypadków z makrofagami zawierającymi włókna amyloidowe w stosunku do wszystkich przypadków zawierających makrofagi maleje do 50%, po 50 dniu organizacji ogniska martwiczego (Ryc. 49).

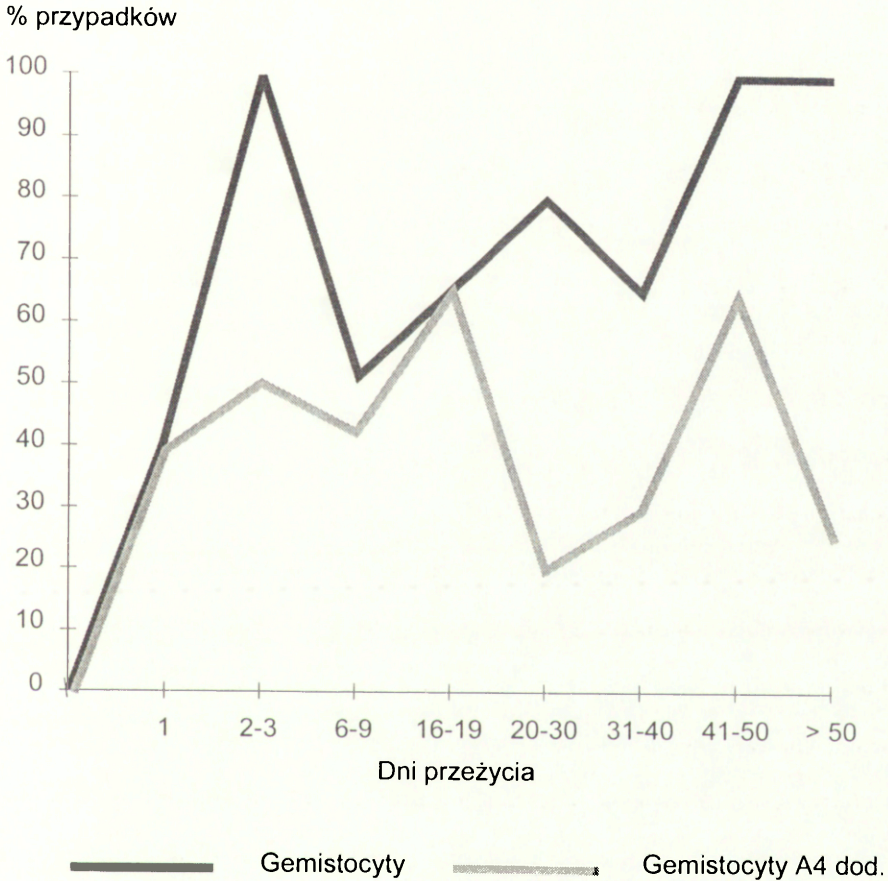
Badanie immunocytochemiczne na poziomie mikroskopu elektronowego z użyciem złota koloidalnego pozwoliło na stwierdzenie, że włókienka amyloidu w makrofagach znajdowały się we wtórnych lizosomach.

Ocena reakcji komórek mikroglejowych wewnątrz amyloidowych blaszek starczych na pograniczu ogniska zawału wykazała, że w pierwszych dniach wszystkie BS zawierały komórki mikroglejowe położone w centrum złożeń. Najmniej blaszek starczych z mikroglejem, znajdującym się wewnątrz amyloidu spotykano w okresie pomiędzy 6 a 9 dniem ewolucji ogniska zawałowego. Występowały one jedynie w 14% przypadków. W późniejszym okresie liczba przypadków z blaszkami starczymi zawierającymi mikroglej wzrastała do 75% po 50 dniach od udaru (Ryc. 50).

Dodatni odczyn immunohistochemiczny z przeciwciałami przeciw b-peptydowi występował również w części gemistocytów (Ryc. 51ab). Wydawało się, przy tym, że początkowo wzrastająca liczba przypadków z obecnością gemistocytów wykazujących dodatni odczyn dla amyloidu w dalszych etapach malała. Po 50 dniu od powstania martwicy nie występowały one w ogóle (Ryc. 47).

Na odrębną uwagę zasługuje fakt, że w przypadkach, w których stwierdzono współwystępowanie złożeń amyloidu i neuronów wykazujących cechy zwyrodnienia neurofibrilarnego ani makrofagi ani gemistocyty nie wykazywały dodatniego odczynu z surowicami przeciw tau 1, nie stwierdzono również dodatniej włóknikowej reakcji na ubikwitynę (Ryc. 52ab).

Rycina 47. Procent przypadków z widoczną reakcją gemistocytarną w obszarze zawału białego, w porównaniu z procentem przypadków z gemistocytami zawierającymi β -amyloid, w zależności od czasu przeżycia

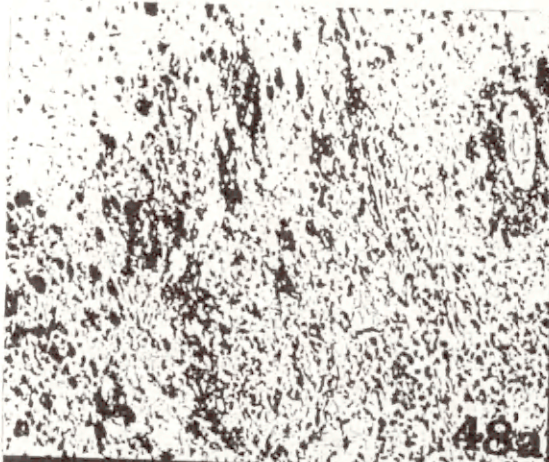


Rycina 48a-d.

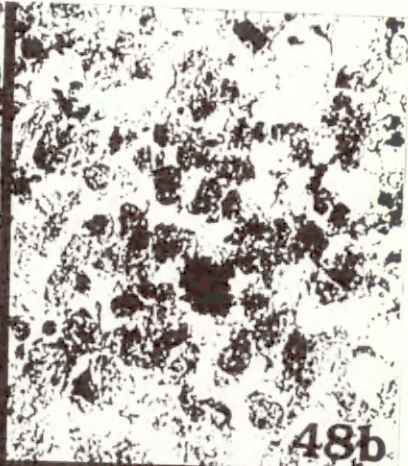
a. fragment ogniska martwicy niedokrwiennej z pograniczem w obrębie tkanki z obecnością złogów amyloidu. Pow. 200x; **b.** w większym powiększeniu widoczny pojedynczy złóg w trakcie rozbiórki makrofagowej. Widoczne makrofagi wypełnione materiałem dodatnim dla barwienia przeciw β -amyloidowi. Pow. 400x; **c.** makrofagi dodatnie dla β -amyloidu skupiające się wzdłuż naczynia w obszarze ogniska martwicy. Pow. 400x; **d.** naczynie tętnicze z cechami kongofilnej angiopatii. Wewnątrz naczynia widoczne komórki z β -amyloidem. Pow. 400x

Rycina 51a-b.

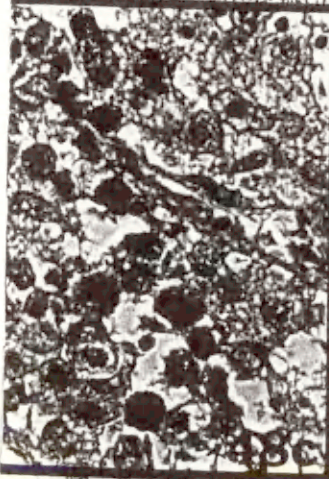
Obszar ogniska zawału. Barwienie immunohistochemiczne przeciw β -amyloidowi. Na obydwu rycinach widoczne gemistocyty zawierające dodatnie dla barwienia ziarna (wewnątrzkomórkowo) (strzałki). **a.** Pow. 200x, **b.** Pow. 400x



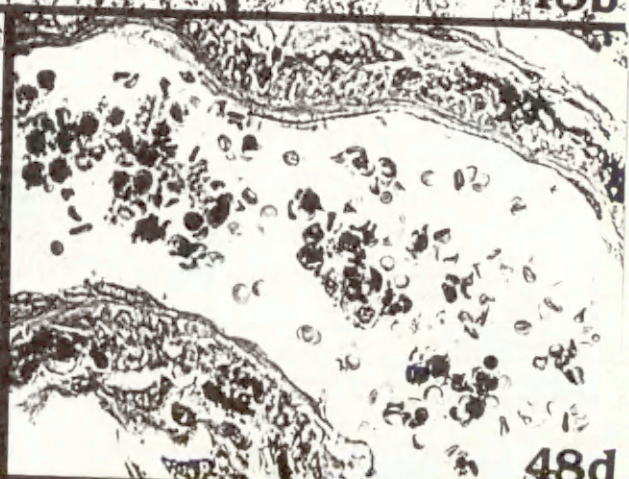
48a



48b



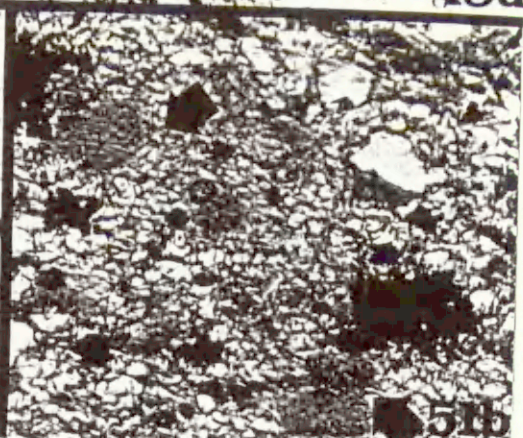
48c



48d

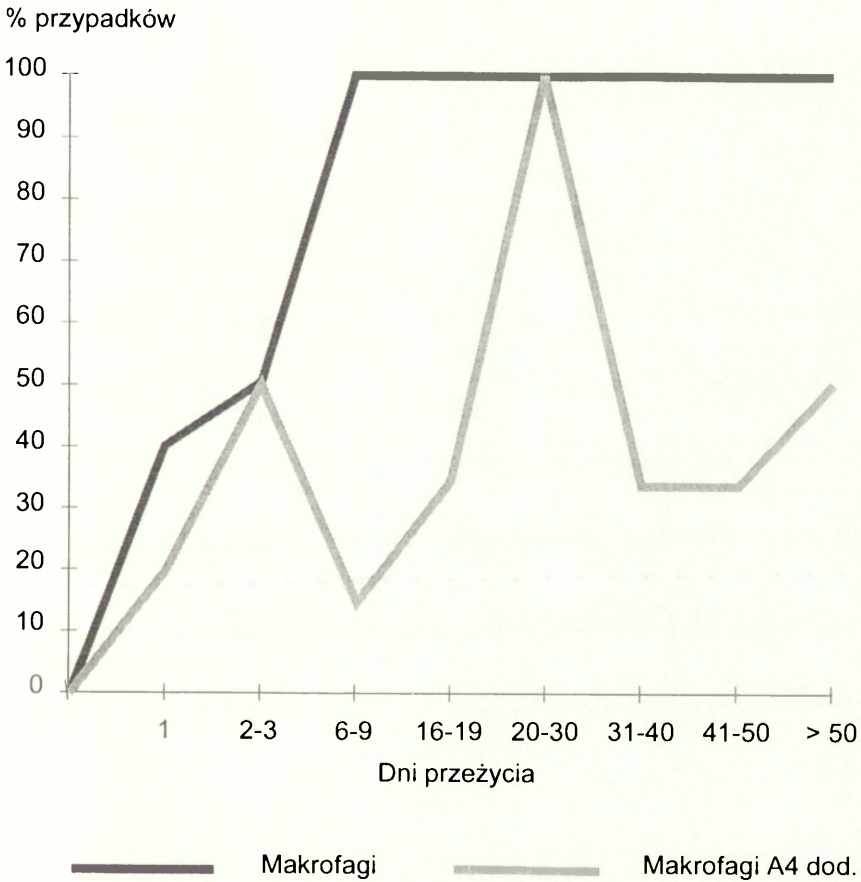


51a

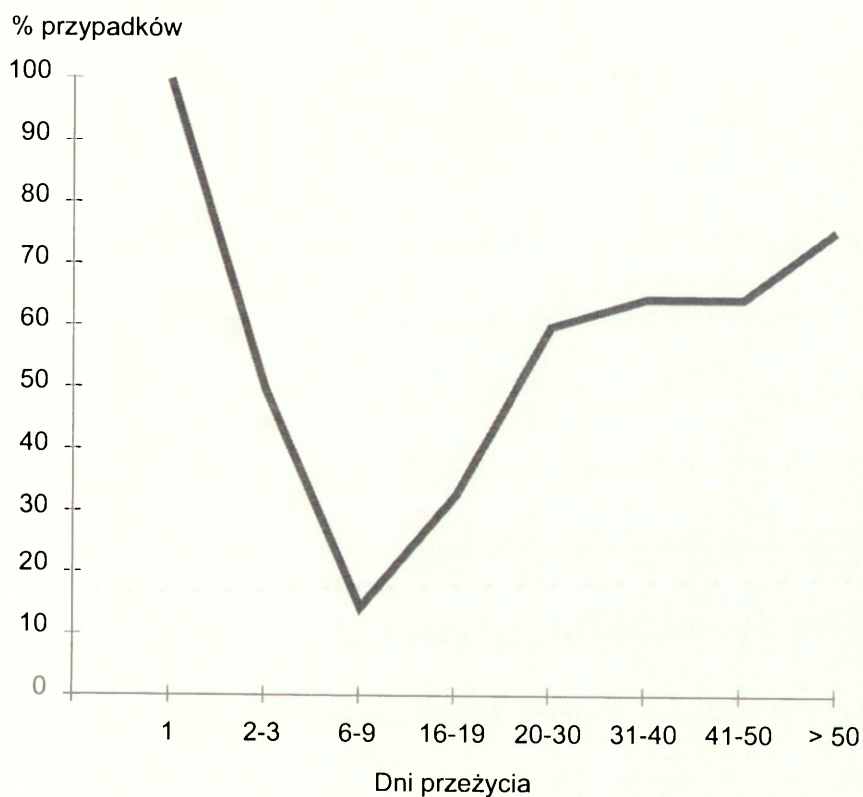


51b

Rycina 49. Procent przypadków zawierających makrofagi w porównaniu z procentem przypadków zawierających makrofagi barwiące się dodatnio z przeciwciałami przeciw β -amyloidowi, w zależności od czasu przeżycia



Rycina 50. Procent przypadków zawierających komórki mikroglejowe w centrum blaszki starczej w zależności od czasu przeżycia

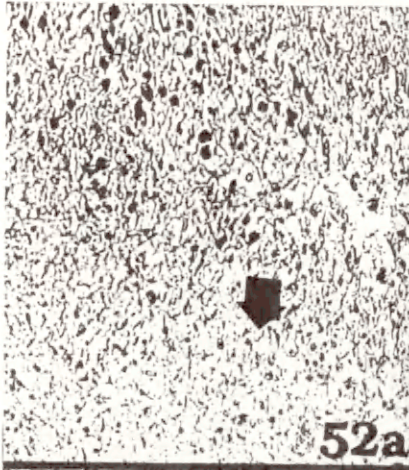


Rycina 52a-b.

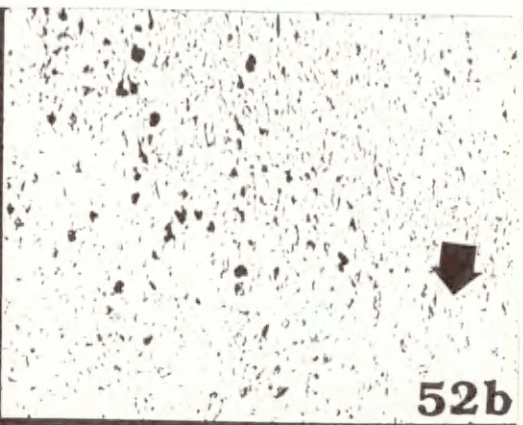
Obszar zawału białego w mózgu ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym neuronów. **a.** barwienie przy użyciu surowicy przeciw białku tau 1. W obszarze martwicy nie stwierdza się tau dodatnich neuronów, ani obecności tau w obszarze ogniska martwiczego (strzałka). Pow. 200x; **b.** barwienie przeciw ubikwitynie, negatywne w obszarze ogniska martwiczego (strzałka). Pow. 200x

Rycina 53a-d.

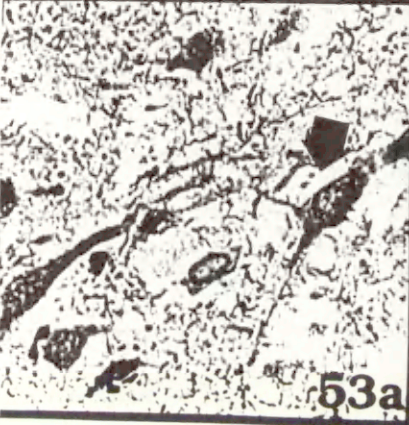
Zwyrodnienie neurofibrylarne w przypadku chA. Warstwa komórek piramidowych hipokampa. Barwienie przy użyciu surowicy przeciw białku tau 1. **a.** strzałka wskazuje neuron wybarwiony homogenicznie w fazie "0". Pow. 400x; **b.** neurony z cechami zwyrodnienia pływokowego (duże strzałki), cienie zwyrodnienia neurofibrylarnego (małe strzałki). Pow. 400x; **c.** obecność tau 1 dodatnio barwiących się elementów morfotycznych w obrębie okłonaczyniowego złoгу amyloidowego. Pow. 400x; **d.** barwienie przeciw ubikwitynie, widoczne liczne pływokowe kłębki wewnątrzneuronalne. Pow. 400x



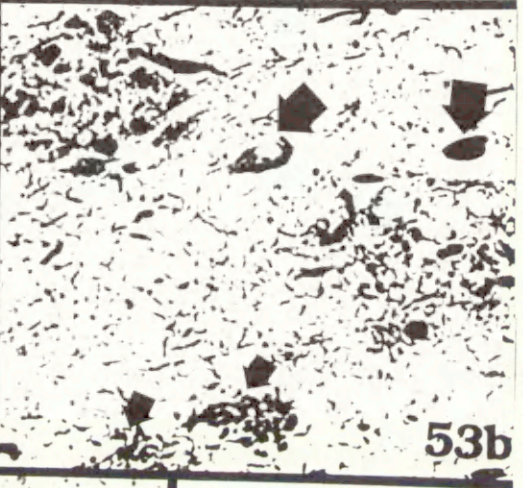
52a



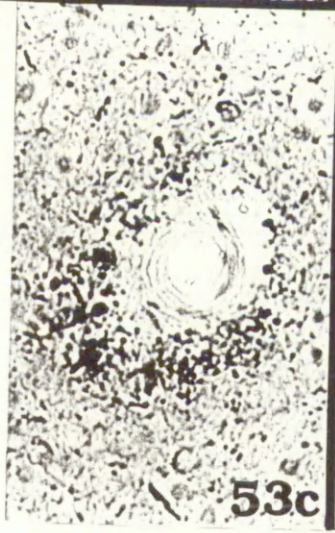
52b



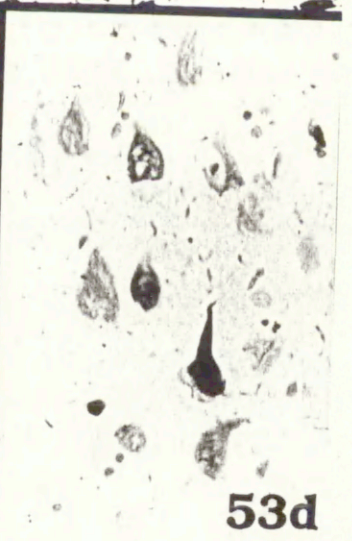
53a



53b



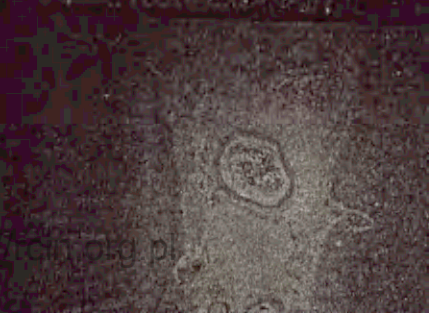
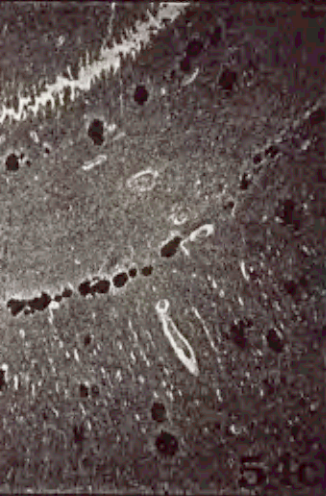
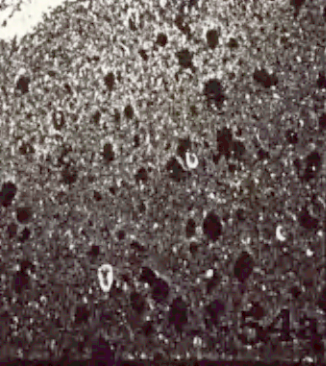
53c



53d

Rycina 54a-f.

Przypadek chA. Kora płata czołowego, sąsiednie skrawki. **a.** barwienie przeciw β -petydowi, widoczne liczne blaszki starcze. Pow. 200x; **b.** barwienie przeciw białku tau 1 dodatnie we wszystkich poprzednio uwidocznionych złogach, sprawdzonych morfometrycznie. Pow. 200x; **c.** i **d.** to samo zjawisko obserwowano w tym przypadku w obrębie hipokampa. Pow. 200x; **e.** przypadek starczy bez cech otępienia. Widoczne dość liczne blaszki starcze uwidocznione przez surowice przeciw β -petydowi. Pow. 200x; **f.** w tym samym skrawku barwienie anty tau 1 - negatywne. Pow. 200x



DYSKUSJA

1. Ocena przydatności dokumentacji lekarskiej dla retrospektywnego rozpoznania otępienia

Wyniki badań przeprowadzonych w celu retrospektywnego rozpoznania otępienia, na podstawie historii chorób pochodzących z kolekcji Jervisa wskazują, że jedyną pewną cechą o walorach znamienności statystycznej, pozwalającą na wyciągnięcie wniosków statystycznych jest spadek o 10 liczby punktów ilorazu inteligencji w skali Wechslera. Wartości punktowe skal opisujących tzw. możliwości wykonywania codziennych czynności nie wykazywały znamienności statystycznej. Przeniesienie powyższych wniosków na warunki oceny dokumentacji polskiej jest utrudnione z tego chociażby względu, że określanie liczby punktów w teście inteligencji nie jest rutynowo prowadzone u każdego chorego. Przydatność wniosku wynikającego z analizy dokumentacji obowiązującej w Stanach Zjednoczonych jest ograniczona w warunkach polskiej, praktyki zarówno klinicznej jak i ambulatoryjnej. Wydaje się jednak, że podobna ocena (Tab. 3) powinna być wprowadzona przynajmniej w przychodniach specjalistycznych.

Obecność amyloidu w ośm stwierdzono w 31% przypadków zmarłych po 65 roku życia osób z opóźnieniem rozwoju. Odsetek ten nie różni się od stwierdzonego w populacji ludzi zmarłych w tym samym wieku, a nie wykazujących cech opóźnienia rozwoju umysłowego (de Wolfe i wsp. 1984) (Tab. 4).

2. Próba określenia komórki-"producenta" białka prekursorowego dla β -amyloidu

Użycie do badań metod immunohistochemicznych, chociaż umożliwiło dokładniejsze poznanie rodzaju i topografii zmian patologicznych w chorobie Alzheimerera i w procesie starzenia ośrodkowego układu nerwowego, nie pozwoliło jednak na jednoznaczne określenie jednego rodzaju komórki, która byłaby odpowiedzialna pośrednio lub bezpośrednio za pojawianie się amyloidu w neuropilu. Zarówno przedstawione poprzednio spostrzeżenia własne jak i wyniki badań prowadzonych przez innych autorów (Anderson i wsp. 1989) przy użyciu surowic skierowanych przeciw poszczególnym syntetycznym peptydom białka prekursorowego amyloidu nie doprowadziły do rozwiązania tego zagadnienia. Najistotniejszą informacją, jaką przyniosły te badania, było stwierdzenie, że białko prekursorowe występuje powszechnie w mózgu człowieka i zwierząt zarówno w neuronach, komórkach glejowych jak i w elementach ściany naczyniowej, opon, a także w tanacytach i komórkach spłotu naczyniówkowego.

Przeciwciała przeciwko poszczególnym fragmentom prekursora (Ryc. 1) zastosowane do badań narządów wewnętrznych ludzi, szczura i małpy dawały dodatni odczyn immunohistochemiczny z komórkami siatkówki, śledziony i wątroby. Stwierdzone dodatnie barwienie przy użyciu przeciwciał przeciw APP w torebce śledziony i wątroby, a także w komórkach śledziony znalazło potwierdzenie w obserwacjach innych autorów (Tanzi i wsp. 1987ab, Robakis i wsp. 1987ab, Selkoe i wsp. 1988, Weidemann i wsp. 1989).

2.1. Dodatnie odczyny neuronów, stwierdzone przy użyciu przeciwciał przeciw wszystkim badanym peptydom prekursora (Tab. 5), może być interpretowane w różny sposób. Po pierwsze, można uznać, że neuron jest źródłem białka prekursorowego. Kon-

cepcję taką przyjmuje szereg autorów, między innymi Masters i wsp. (1985a), Koo i wsp. (1990), Procter i wsp. (1994) i inni. Z całą pewnością wiadomo, że to wtórne lizosomy neuronów są miejscem gdzie znajduje się białko prekursorowe (Benowitz i wsp. 1989, Tabaton i wsp. 1992, Cataldo i wsp. 1994). Innym dowodem na obecność APP w komórce nerwowej jest także fakt, że w przypadku niedokrwienia mózgu dochodzi do jego wzmożonej ekspresji w neuronach (Stephenson i wsp. 1992, Kalaria i wsp. 1993). Nie można jednakże wykluczyć przypadkowości tego zjawiska. Stwierdzono bowiem, że w niesprzyjających warunkach, a takie stwarza trwający proces starzenia, komórki nerwowe mogą wybarwiać się w sposób nieswoisty (Mori i wsp. 1991, Loberg, Torvik 1991). Jednakże przeciw barwieniu przypadkowemu i nieswoistemu charakterowi zjawiska świadczą wyniki badań techniką hybrydyzacji in situ wskazujące na obecność mRNA prekursora w neuronie (Gloor i wsp. 1986, Goedert i wsp. 1987). Uzyskana w roku 1995 myszka transgeniczna z genem dla białka amyloidowego na chromosomie 16, stwarza także bezpośredni dowód neuronalnego pochodzenia białka prekursorowego (Kawabata i wsp. 1991, Mann i wsp. 1992b). Haass i wsp. (1991) przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciw końcowym fragmentom: C- i -NH₂, prekursora amyloidu wykazali obecność APP nie tylko w neuronach lecz również w gleju gwiazdzistym i w mikrogleju.

2.2. Przedmiotem wieloletniej dyskusji jest rola komórki mikroglejowej jako elementu odpowiedzialnego za pojawianie się włókienek amyloidu w neuropilu (Dickson i wsp. 1989, Wiśniewski i wsp. 1989c, Wiśniewski Węgiel 1992). Koncepcja ta stanowi bezpośrednio odniesienie do amyloidozy obwodowej, w której, za patologiczne gromadzenie się amyloidu w narządach wewnętrznych odpowiedzialne są komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego (usś) (Shirama, Cohen 1973, Sellinger i wsp. 1980). Cechy praw-

dopodobieństwa tej koncepcji nadaje fakt, że w ośrodkowym układzie nerwowym rolę usś odgrywa mikroglej. W tym kontekście szczególnie interesujące wydaje się stwierdzenie obecności jednego z peptydów prekursora w komórce mikroglejowej (peptyd 4) (Tab. 5).

W badaniach stanowiących przedmiot niniejszej pracy udowodniono również obecność innego fragmentu APP, a mianowicie - peptydu 6 prekursora w komórkach astrogleju. Opublikowane przez grupę Selkoe (Haass i wsp. 1992) wyniki wskazują, że komórka astrogleju zawiera również inne fragmenty prekursora. Jednakże znaczenie astrogleju jako źródła APP jest ciągle niejasne (Doebler i wsp. 1988, Siman i wsp. 1989). Töpper i wsp. (1995) przypuszczają, że ta funkcja astrogleju może być stymulowana przez uszkodzenie mózgu na skutek działania aminokwasów pobudzających. Wiadomo również, że proliferujący w korze mózgu astroglej jest źródłem białek szoku termicznego u chorych z chA, a APP jest przez niektórych autorów traktowane jako jedno z tej grupy białek (Renkawek i wsp. 1994). Przy omawianiu roli astrogleju w gromadzeniu amyloidu należy również uwzględnić interakcję pomiędzy APP i komórką glejową, wyrażającą się wpływem białka prekursorowego amyloidu na produkcję czynników wzrostu, spełniających funkcje ochronne w stosunku do komórek nerwowych (Mufson i wsp. 1995).

2.3. Wyniki uzyskane w odczynach z surowicą przeciw peptydowi 8 wskazują na możliwe uczestnictwo fibroblastów w amyloidogenezie. Jak wykazano na seryjnych skrawkach obszar reakcji przeciwko peptydowi 6 pokrywał się z barwieniem przeciw fibronektynie. Kosik i wsp. (1988) twierdzili, że fibronektyna nie wchodzi nigdy w skład złogów amyloidowych zarówno znajdujących się w ścianie naczyń jak i w blaszce starczej. Jednak już w rok później Kawahara i wsp. (1989) opublikowali wyniki badań,

wskazujące na jej udział w amyloidogenezie. Obecność fibroblastów w blaszce starczej potwierdzili także Narindrasorasak i wsp. (1994).

2.4. Uzyskane przez nas wyniki sugerują również udział naczyń i związanych z nimi perycytów, w produkcji amyloidu włóknkowego. Peptyd 6 poza astroglejem wyznaczał także perycyty i/lub ich wypustki. Przeciwciała przeciw praktycznie wszystkim analizowanym peptydom prekursora wybarwiała ściany naczyń. Znaczna część koncepcji patogenetycznych amyloidozy mózgu, za jaką szereg autorów uważa chorobę Alzheimera przypisuje szczególną rolę zmianom naczyniowym. Wiśniewski i Kozłowski (1982) oraz Alafuzoff i wsp. (1985) uważali, że uszkodzenie ściany naczynia a tym samym bariery krew-mózg prowadzi do uaktywnienia się prekursora pochodzącego z surowicy krwi (Mandybur 1986, 1989, Glenner 1985, Vinters, Partridge 1986, Alafuzoff i wsp. 1987a, Bueé i wsp. 1994, Mattila i wsp. 1994). Uważano przy tym, że β -amyloid stwierdzany w ścianie naczyń jest niemal identyczny biochemicznie (Glenner Wong 1984ab, Partridge i wsp. 1987) i immunohistochemicznie (Coria i wsp. 1988, Joachim i wsp. 1988a, Vinters i wsp. 1988ab) z amyloidem tworzącym blaszkę starczą. Jednakże wykazano również, pewne subtelne różnice pomiędzy tymi cząsteczkami amyloidu, dotyczące przede wszystkim pozycji metioniny (Prelli i wsp. 1988), i końca-NH₂ (Masters i wsp. 1985ab, Bueé i wsp. 1993). Wiadomo, że długość łańcucha aminokwasów, tworzącego w większości amyloid rdzenia blaszki starczej, wynosi 1- 42, 43 aminokwasów, podczas gdy najczęstsza liczba aminokwasów w cząsteczce amyloidu zlogów ściany naczyniowej odpowiada wartości 1-39 aminokwasów (Soto, Frangione 1995).

Rozbieżne są ponadto opinie co do współistnienia kongofilnej angiopatii i amyloidowych blaszek starczych. Obecność kongofilnej angiopatii uważana jest przez niektórych badaczy za warunek niezbędny dla rozpoznania choroby Alzheimera (Joachim i wsp.

1988a). Inni natomiast autorzy negują tę zależność (Cosgrove i wsp. 1985, Tomonaga 1986). Wiadomo również, że kongofilna angiopatia występować może niezależnie od blaszek starczych (Vinters 1992)

Według opinii badaczy japońskich (Miyakawa i wsp. 1974) i amerykańskich (Rosenblum, Haider 1988, Perlmutter i wsp. 1991), opartej na badaniach mikroskopowo-elektrowych źródłem włóknikowego amyloidu w ścianie naczynia jest błona podstawna. Yamaguchi i wsp. (1989ab) opisali wyraźny związek naczyń włosowatych z włóknkami amyloidu.

Wydaje się, że kwestię amyloidogenezy w ścianie naczyń mózgu rozstrzygnęły jednoznacznie badania Wiśniewskiego i Węgla (1994), którzy udowodnili, że za produkcję amyloidu odpowiadają komórki mięśniówki gładkiej ściany naczyniowej. W błonie podstawnej dochodzi natomiast do przetwarzania amyloidu amorficznego w fibrylamy.

2.5. W ostatnim okresie zaniechano poszukiwania epitopów dla tak szerokiego wachlarza peptydów wykorzystanych w przedstawionych przez nas badaniach. Zazwyczaj ogranicza się analizę do kluczowych peptydów, przeciw fragmentowi C-końcowemu, NH-końcowemu, i przeciw β -amyloidowi (Benowitz i wsp. 1989). Przyczyną tego zawężenia były ograniczenia metody związane ze zjawiskiem możliwych wiązań krzyżowych. Część badaczy uważa, że kluczowe znaczenie dla firylogenezy ma fragment C-końcowy β -amyloidu (33-35 aminokwas) (Pike i wsp. 1995), inni natomiast są zdania, że rola NH₂-końcowego jest równoważna lub nawet istotniejsza w procesie odkładania włóknikowego β -amyloidu w neuropilu (Smith, Anderton 1994, Yang i wsp. 1994). Jak wspomniano uprzednio zjawisko fibrylizacji amyloidu ma zasadnicze znaczenie w patogenezie choroby Alzheimera (Wiśniewski, Węgiel 1994). Przy analizie uzyskanych przez nas spostrzeżeń, dotyczących lokalizacji komórkowej poszczególnych peptydów białka

prekursorowego, nie można pominąć faktu, że zastosowane metody immunohistochemiczne, stanowiąc narzędzie badawcze ułatwiające swoiste rozpoznanie wielu komórek, trudnych do uwidocznienia w rutynowych barwieniach histologicznych, mogą stanowić źródło wyników fałszywych (Pro i wsp. 1980, Yamaguchi i wsp. 1989a). Niebezpieczeństwo to wynika z pojawiania się dodatnich odczynów immunohistochemicznych w następstwie tzw. "cross reactivity" czyli przypadkowych wiązań krzyżowych (Ihara 1986, Currie i wsp. 1989). Zagrożają one szczególnie w przypadkach odczynów ze stosunkowo "krótkimi" peptydami, zbudowanymi z małej liczby aminokwasów. Nie można wyłączyć, że w naszych badaniach w tej grupie przypadków zjawisko wiązań krzyżowych mogło być powodem fałszywego przekonania o powszechności występowania prekursora we wszystkich elementach tkanek mózgu.

Inną trudność interpretacyjną stanowi fakt, że stwierdzenie w mózgu chorego prekursora lub nawet β -amyloidu, nie przesądza o rozpoznaniu, to jest o tym czy mamy do czynienia z amyloidem typowym dla wieku starczego, czy też charakterystycznym dla chA (Spillantini i wsp. 1989). Pomimo to nadal podejmowane są próby opracowania metody lub metod, które mogłyby umożliwić przyżyciowe rozpoznawanie obecności amyloidu w ośrodkowym układzie nerwowym. Uważa się, że badania immunohistochemiczne wycinków skóry (Joachim i wsp. 1989b, Soininen i wsp. 1992), płytek krwi (Zubenko i wsp. 1987, Kukull i wsp. 1992), fibroblastów (Sims i wsp. 1987, Adler i wsp. 1991), limfocytów (Leonardi i wsp. 1989), wycinków mięśni (Zimmermann i wsp. 1988), poza wartościami poznawczymi w badaniach nad patogenezą choroby Alzheimerera, mogą stanowić ważne źródło informacji na temat przypuszczalnej obecności amyloidu w mózgu. Tkanki te jako łatwo dostępne mogą być badane przyżyciowo w sposób nie budzący zastrzeżeń deontologicznych, a uzyskane wyniki stanowiłyby istotne narzędzie diagnostyczne. Jednak niebezpieczeństwo wiązań krzyżowych i wynikających z nich wyników

falszywie dodatnich dotyczy również testów przyżyciowych, ograniczając ich użyteczność. Za szczególnie kontrowersyjne uznano testy skórne (Heinonen i wsp. 1994, Maury 1995), oraz badanie fibroblastów (Mak i wsp. 1994), płytek krwi (Gardella i wsp. 1992ab, Ghiso i wsp. 1994). Z tym właśnie ograniczeniem należy zapewne wiązać fakt, że do tej pory żaden ze wspomnianych testów nie znalazł rutynowego zastosowania praktycznego.

3. Amyloid w procesie starzenia fizjologicznego i przebiegającego z otępieniem

3.1. Dyskusyjna rola amyloidu, jako czynnika różnicującego pomiędzy starzeniem "fizjologicznym" a patologicznym, za jakie uznać należy clA , nie ograniczyła zainteresowania procesami jego powstawania i przetwarzania (Sisodia i wsp. 1990). Wręcz przeciwnie, badania biologów molekularnych nad patogenezą choroby Alzheimera koncentrują się przede wszystkim na poszukiwaniu genu dla amyloidu.

Istnieją sugestie, że amyloid jest białkiem płodowym (Zain i wsp. 1988). Przypuszcza się przy tym, że jego sprawny i prawidłowy metabolizm zabezpiecza przed odkładaniem się w neuropilu w postaci nierozpuszczalnej o konformacji β . Wcześniejsze wyczerpanie się mechanizmów regulacyjnych metabolizmu amyloidu, np. już około 65 roku życia prowadzi do szybkiego odkładania się amyloidu włóknkowego w mózgu i pojawiania się klinicznych objawów choroby Alzheimera (Weidemann i wsp. 1989). W przemianach metabolicznych cząsteczki amyloidu wiodącą rolę odgrywają niewątpliwie inhibitory proteaz (Weidenmann i wsp. 1989), których niewydolność związana z wiekiem jest być może główną przyczyną mózgowej amyloidozy tzn. odkładania się jego włóknkowej, nierozpuszczalnej postaci w neuropilu. Ciągłe jednakże nie ma pewności, czy inna forma

amyloidu, tzw. amyloid rozproszony nie ma również w istocie konformacji β (Masliah i wsp. 1993). Na podstawie badań mózgow osób z zespołem Downa wydaje się, że amyloid amorficzny wyprzedza pojawianie się zwyrodnienia neurofibrilarnego i blaszek starczych (Giaccone i wsp. 1989, Mann 1989ab). Ważną przesłanką wskazującą, że amyloid amorficzny może być zjawiskiem pierwotnym jest jego wczesne pojawianie się w mózgu po urazach. Znane są przypadki jego obecności już po 4 godz. od urazu (Roberts 1988, Roberts i wsp. 1991). W mózgach osób z rozwiniętą chA obserwuje się najczęściej współistnienie obu rodzajów złożeń amyloidu: amorficznego, w postaci rozproszonej i włóknkowego - w formie blaszek starczych (Tagliavini i wsp. 1988, 1991, Yamaguchi i wsp. 1989a).

Stosunkowo popolicie reprezentowana jest opinia, że liczne przypadki, w których stwierdza się bardzo obfite złoże amyloidowe, bez klinicznego wywiadu otępienia (Dayan 1970a, Ulrich 1982, 1985, Crystal i wsp. 1988), są w istocie przedklinicznymi przypadkami chA i możnaby założyć, że gdyby osoby te żyły dłużej, to w obrazie klinicznym zjawilyby się cechy otępienia (Davics i wsp. 1988, Mackenzie 1994).

3.2. Istotnym elementem patogenetycznym choroby Alzheimerera jest wtórne oddziaływanie amyloidu na komórki nerwowe ośrodkowego układu nerwowego. Uważa się, że obfite złoże amyloidu w mózgu doprowadzają do pojawiania się patologii białek cytoskeletonu komórki nerwowej - zwyrodnienia neurofibrilarnego neuronów (Glennner Wong 1984ab, Selkoe 1987, Joachim 1991). Wydaje się przy tym, że dopiero współistnienie obu procesów patologicznych: złożeń amyloidu i zwyrodnienia neurofibrilarnego powoduje pojawienie się klinicznych objawów otępienia - jak sugerują to Ball (1977), Jensen i wsp. (1995) i inni. Opisywana przez Terrego i wsp. (1987) populacja ludzi bardzo starych z licznymi blaszkami starczymi nie wykazywała obecności ZN. Pacjenci ci

w znakomitej większości nie wykazywali cech otępienia (Terry i wsp. 1987, Joachim i wsp. 1988b). Własne obserwacje, przedstawione w niniejszym opracowaniu wskazują jednoznacznie, że dla pojawienia się otępienia niezbędne jest współistnienie w ośrodkowym układzie amyloidu i patologicznych białek cytoskeletonu.

3.3. Rozwój badań immunohistochemicznych pozwolił na dokładne poznanie topografii zmian amyloidowych w oun i próby charakterystyki jej znaczenia dla procesu chorobowego. Przedmiotem szczególnego zainteresowania jest zajęcie przez proces patologiczny hipokampa i okolicy parahipokampalnej. W warunkach doświadczalnych wykazano, że obecność amyloidu w płynie mózgowo-rdzeniowym w komorach bocznych, wpływa na zwyrodnienie komórek hipokampa i związane z nim zaburzenia pamięci (Nitta i wsp. 1994). W poszukiwaniu przyczyn wczesnego i częstego zajęcia hipokampa, poza jego bezpośrednią stycznością z płynem mózgowo-rdzeniowym zawartym w komorze bocznej, uwzględnić należy jego wybiórczą wrażliwość na niedokrwienie. Wiadomo, że właśnie niedokrwienie prowadzi do wzrostu zawartości APP. To z kolei może powodować odkładanie się β -amyloidu w neuropilu (Robinson i wsp. 1993).

Udowodniono przy tym, że sama już obecność amyloidu w mózgu szczura wpływa na procesy pamięciowe (Nitta i wsp. 1994, Cleary i wsp. 1995). Dowodów na kluczową rolę hipokampa w zaburzeniach neurotransmitterowych, dotyczących głównie metabolizmu acetylocholin, w patogenezie choroby Alzheimera dostarczają między innymi obserwacje kliniczne. Stwierdzono, że przy umiarkowanie nasilonym zaniku hipokampa, istnieją szanse poprawy klinicznej po leczeniu preparatami z grupy inhibitorów acetylocholinesterazy. Przy znacznym zaniku szanse terapeutyczne już nie istnieją (Riekkinen i wsp. 1995). W naszym materiale w mózgach osób zmarłych po 80 roku życia złogi amyloidu o tym samym nasileniu stwierdzano zawsze w korze nowej i w hipokampie. W całym

materiale tylko jeden przypadek różnił się w tym względzie od pozostałych. Natomiast w grupie 385 mózgach chorych znacznie młodszych, amyloid stwierdzono częściej w korze nowej i śródwęchowej niż w hipokampie. Może to wskazywać, że obecność złożeń amyloidowych w hipokampie świadczy o większym zaawansowaniu procesu, przeciwnie niż obecność neuronów z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego (Braak, Braak 1991). Jest faktem znanym, że w początkowym okresie chA zwyrodnienie neurofibrylarne neuronów występuje głównie w dendrytach a rzadziej w aksonach. Wydaje się jednak, że w przypadku choroby Alzheimera, w przeciwieństwie do przypadków starszych bez otępienia, występuje przewaga uszkodzeń w aksonach hipokampa (Su i wsp. 1993).

Wynik odczynów immunohistochemicznych fragmentów β -amyloidu o różnej długości łańcucha aminokwasów wskazują, że topografia ich występowania zależy także od ich długości. Przeciwciała przeciw peptydowi zawartemu pomiędzy 37 a 42 aminokwasem β -amyloidu powodują wybarwienie złożeń w płacie czołowym, a dają reakcję ujemną ze złożami w obrębie prążkowania, w którym występują głównie prymitywne blaszki starcze (Mak i wsp. 1994). Przewagę blaszek prymitywnych w formacjach prążkowania potwierdzają również nasze własne obserwacje. Być może, że są to złoże "młodsze" (a więc prymitywne) albo zbudowane z odmiennego typu amyloidu.

3.4. Od kilku lat przedmiotem dyskusji jest kwestia, czy amyloid poza czysto mechanicznym działaniem uszkodzającym, prowadzącym do upośledzenia przepływu aksonalnego, może być równocześnie substancją neurotoksyyczną (Yanker i wsp. 1989, Masliah i wsp. 1993, Pike i wsp. 1995). Doświadczalnym dowodem na hipotetyczną toksyczność amyloidu jest pojawianie się patologicznych zmian cytoskeletonu w komórkach nerwowych badanych zwierząt, którym amyloid podawano bezpośrednio do oun (Yanker

i wsp. 1989). W doświadczeniach tych podkreśla się przy tym antagonistyczną do amyloidu rolę substancji P wykazującej w tych warunkach działanie cytoprotekcyjne (Crystal, Davies 1982, Beal, Mazurek 1987). Nie jest jasne jaki jest mechanizm toksycznego oddziaływania amyloidu na neuron - czy jego nieodwracalne uszkodzenie odbywa się poprzez mechanizm apoptozy, czy też zwykłej reakcji martwiczej (Forloni i wsp. 1993, Behl i wsp. 1994).

3.5. Jest wysoce prawdopodobne, że toksyczny wpływ amyloidu, lub też tylko jego stymulujące oddziaływanie na powstawanie ZN i wtórny w stosunku do niego zanik neuronu, prowadzi pośrednio do zmniejszenia liczby połączeń synaptycznych. Znana jest teoria, że powodem otępienia w chA jest nie zanik neuronów, a tylko znaczne ilościowe zmniejszenie połączeń synaptycznych (Anderson i wsp. 1983), opisane zresztą już przedtem przez Neary'ego i wsp. (1986).

Zastosowanie mikroskopu konfokalnego (Masliach i wsp. 1993, Kimura i wsp. 1994) zmodyfikowało klasyczny podział złożeń amyloidu i poglądy na temat ich związku z uszkodzeniami zakończeń synaptycznych, stanowiących następstwo jego odkładania w tkance. Badania wyżej wymienionych autorów zmieniły obowiązujące do tej pory wyobrażenie o budowie blaszki starczej. Udowodniono bowiem, że tylko 35 % BS ma amyloidowy rdzeń otoczony wieńcem nieprawidłowych neurytów. Pozostałe 65% BS nie zawiera rdzenia, zbudowane są one z patologicznych, dystroficznych neurytów pomiędzy, którymi znajdują się włókienka amyloidu. Wbrew temu co sądzono poprzednio część blaszek starczych zawiera dystroficzne neuryty w części centralnej, a włókna amyloidowe na jej obwodzie. Badania te udowodniły w sposób jednoznaczny, że patologiczne neuryty wchodzące w skład blaszki związane są z wyraźnymi i wczesnymi zmianami patologicznymi połączeń synaptycznych. Podobne sugestie prezentowane są przez in-

nych autorów (Wiśniewski i wsp. 1981, Masliah i wsp. 1991, Braak, Braak 1994ab, Morys i wsp. 1994b). Podkreślają oni zgodnie, że najbardziej uszkodzonym elementem tkankowym są połączenia synaptyczne i te właśnie uszkodzenia leżą u podłoża otępienia, poprzez dezintegrację czynnościową kory nowej i jej połączeń z hipokampem.

3.6. Na odrębną uwagę zasługuje topograficzne zróżnicowanie wewnątrzkorowego układu blaszek starczych w przypadkach zespołów otępiennych i starczych przebiegających bez otępienia. Analiza rozkładu blaszek starczych w różnych warstwach kory mózgu wykazała, że największa liczba złogów amyloidowych w korze skroniowej występowała w warstwie III i II, w mózgach przypadków z otępieniem (choroba Alzheimera i zespół Downa), w przeciwieństwie do mózgow przypadków bez otępienia, w których najwięcej BS stwierdzono w warstwie III i V. W płacie potylicznym najwięcej złogów amyloidu w przypadkach chA i zD było obecnych w III, IV warstwie podczas gdy w przypadkach kontrolnych najobfitsze zmiany obserwowano w warstwie III, IV i V. Nasze spostrzeżenia dotyczące kory skroniowej były zgodne z obserwacjami innych autorów (Duyckaerts i wsp. 1986, Lewis i wsp. 1988). Stwierdzenie najobfitszych zmian w warstwie IV w korze potylicznej podobne było do wyników Mandybura (1975) i Lewisa i wsp.(1988). Zgodnie z sugestią Gibsona (1983) powodem takiego rozkładu liczby BS w jej poszczególnych warstwach mogła być fagocytoza zmian zachodząca w warstwach głębszych niż II i III, przez pobudzony układ makrofagów w tej okolicy. Innym czynnikiem wchodzącym w rachubę mogłaby być zależność nasilenia zmian od stopnia unaczynienia poszczególnych warstw kory. Wydaje się jednak, że nie różnicowałyby to przypadków z otępieniem i bez otępienia, chyba że przyjęłoby się założenie, że hipotetyczny czynnik patogenetyczny występuje w znacznie większej ilości w surowicy u chorych z chA i zD a poprzez uszkodzoną barierę naczyniowo-mózgową wydostaje się do

neuropilu obficie w warstwach kory o bogatszym unaczynieniu (Bell, Ball 1985). Z dużym prawdopodobieństwem można przyjąć, że powodem znacznego nagromadzenia BS w opisanych warstwach kory jest fakt, że stanowią one obszary obfitego zgrupowania neuronów, mikrogleju i astrocytów, zawierających nadmiar APP.

3.7. Należy wreszcie zwrócić uwagę na badania Tanaki i wsp. (1993), którzy przeprowadzili analizę porównawczą zawartości mRNA dla APP w korze i w istocie białej. Stwierdzono, że zarówno w chA i mózgach ludzi starych bez cech otępienia zawartość mRNA dla APP jest dwukrotnie wyższa w istocie białej niż w korze (kora czołowa). W naszych własnych badaniach wielokrotnie obserwowano silne wybarwienie istoty białej w całości, a także obecność w niej złożeń amyloidu przy znacznym nasileniu procesu patologicznego (Tab. 3).

4. Zwyródnienie białek cytoskeletonu w chorobie Alzheimera

Poza przytoczonymi uprzednio hipotezami, sugerującymi wtórność pojawiania się zwyródnienia neurofibrylarnego w stosunku do odkładania się amyloidu w neuropilu, istnieją także teorie, poszukujące innych czynników przyczynowych dezintegracji białek cytoskeletonu, niezależnych od obecności BS.

Za główny spośród nich uważa się zaburzenia fosforylacji białek szkieletowych komórki nerwowej (Tabaton i wsp. 1989, Cook i wsp. 1994, Otvos i wsp. 1994). Należy przy czym dodać, że ich patogenetyczne znaczenie nie wyklucza pierwotnego wpływu amyloidu na upośledzenie przepływu aksonalnego i wtórnych w stosunku do niego uszkodzeń cytoskeltonu. Według Sternbergera i wsp. (1983) w warunkach prawidłowych, w perikarionie komórki i jej wypustkach dendrytycznych obecne są nieufosforylowane neurofilamenty, podczas gdy w aksonie występują neurofilamenty ufosforylowane. Proces fosforylacji, odbywający się głównie przy udziale kinazy białkowej C (Takahashi i wsp. 1995) wydaje się pełnić rolę czynnika stabilizującego cytoskeleton komórki (Grundke-Iqbal 1986b, Wood i wsp. 1986, Biernat i wsp. 1992). Być może na powstawanie patologicznych białek szkieletowych może wpływać zaburzenie gospodarki wapniowej komórki nerwowej. Badania immunohistochemiczne wykazały, że wynikiem zaburzeń homeostazy wapnia jest pojawianie się białka tau 1 wewnątrz neuronu (Mattson i wsp. 1991, Mann i wsp. 1992b). Cykl badań nad białkami sprzężonymi z PHF - tau 1 i ubikwitiną pozwoliły przedstawić hipotetyczny scenariusz powstawania ZN w zależności od pojawiania się ich w czasie (Bancher i wsp. 1987). Według Banchera i wsp. (1987) proces odkładania się patologicznych białek cytoskeletonu rozpoczyna się od fazy "0", podczas której w odczynach immunohistochemicznych przeciw białku tau 1 uzyskuje się homogenne wybarwienie perykarionu. Następnym etapem jest pojawianie się pływokowatych włókienek, dodatnich w barwieniach surowicami przeciw białku tau 1, ostatecznie dochodzi do wybarwiania się dużego odsetka neuronów ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym surowicami przeciw ubikwitynie (Ryc. 53abcd).

4.1. Wyniki prezentowanej pracy wskazują na związek zmian neurofibrylarnych z otępieniem. Ilustrują one także różnorodność morfologicznych struktur stanowiących

następstwo patologicznej przemiany białek cytoskeletonu. Wydaje się, że sieć "nitek neurofilowych", nakładających się na rozproszony amyloid w neuropilu może w znacznym stopniu upośledzać "komunikację" pomiędzy neuronami. Może też być przyczyną zaburzenia połączeń synaptycznych, a wtórnie niedoboru neuroprzekazników, w tym acetylocholino (Kowall, Kosik 1987).

4.2. Wydaje się, że na podstawie prezentowanych wyników badań własnych można przy użyciu odczynów z przeciwciałami anty tau 1 podjąć próbę rozróżnienia blaszek starczych związanych z chorobą Alzheimera od towarzyszących "fizjologicznemu" starzeniu się. Tylko bowiem te blaszki, których wieńce zbudowane są z neurytów, zawierających PHF, a więc występujące wyłącznie w mózgach chorych z otępieniem, barwią się za pomocą surowic anty tau 1. Mechanizm tego zjawiska jest zbliżony jak w przypadku głośnego w swoim czasie przeciwciała Daviesa - Alz 50, które również wybarwia wyłącznie blaszki alzheimerowskie, nie dając odczynu immunohistochemicznego z blaszkami w mózgach osób bez cech otępienia (Ryc. 54abcdef). Udowodniono, następnie, że Alz 50, skierowane przeciw "białku 68" jak je pierwotnie nazwano (Wolozin i wsp. 1986, Wolozin, Davies 1987), jest jednym z przeciwciał skierowanym przeciw tau 1 (Nukina i wsp. 1987). Proteoliza parzystych spiralnie skręconych włókienek wykazała jednak, że epitopy dla tau 1 i Alz 50 nie są identyczne (Książak-Reding i wsp. 1988ab). W latach osiemdziesiątych przypuszczano, że dzięki obecności białka tau 1 w płynie mózgowo-rdzeniowym będzie można uzyskać narzędzie badawcze do przyżyciowego rozpoznania chA. Od 1995 roku istnieje komercyjny zestaw diagnostyczny dla oznaczania poziomu białka tau w płynie mózgowo-rdzeniowym (Vigo-Pafrey i wsp. 1995). Jego wiarygodność i przydatność wymagać będzie sprawdzenia w ocenach katamnesticznych dużego materiału.

4.3. Odczyny immunohistochemiczne z surowicami przeciw ubikwitynie, uwidaczniają znacznie mniejszą liczbę ZN zarówno w korze nowej i w hipokampie. Rola ubikwityny nie jest nadal jednoznacznie określona. Być może, jest ona między innymi czynnikiem wzmagającym proces tworzenia włókienek amyloidowych - amyloid enhancing factor (Alizadch-Khiavi i wsp. 1991, Ali-Khan i wsp. 1992) lub też jedną z pozalizosomalnych proteaz. Nie wyklucza się, że bierze ona czynny udział w amyloidogenezie jako jedno z białek szoku termicznego (Wang i wsp. 1991).

Nasze własne obserwacje wskazują na opóźnienie ubikwitynizacji zwyrodnienia neurofibrylarnego w jądrach pnia mózgu w stosunku do kory nowej i hipokampa. Świadczyć to może o większej odporności struktur pnia mózgu na procesy zwyrodnieniowe. Ubikwitynizacja poprzedzająca śmierć komórki pojawia się później w ośrodkach regulujących podstawowe funkcje organizmu.

4.4. We własnych badaniach udowodniono również rzadsze występowanie nieprawidłowości białek cytoskeletonu komórki nerwowej u ludzi, w wieku starym (12 przypadków na ogólną liczbę 100, zmarłych po 80 roku życia). Spostrzeżenie to można interpretować dwojako, z jednej strony można przypuszczać, że wszystkie neurony ze zwyrodnieniem fibrylarnym uległy rozpadowi i zostały sfagocytowane przez astrogliję (Mandybur 1990) z drugiej zaś, że skąpa liczba złogów amyloidu w neuropilu występująca w zawartości subklinicznej "nie zdążyła" spowodować wtórnych zmian patologicznych cytoskeletonu.

4.5. Należy przy tym podkreślić, że istnieją zespoły patologiczne (choroba Parkinsona, postępujące porażenie nadjądrowe, podostre stwardniające zapalenie mózgu, parkinsonizm pozapalny, choroba z wyspy Guam i inn.), w których występuje zwyrodnienie

neurofibrylarne bez gromadzenia amyloidu w neuropilu (Wiśniewski i wsp. 1991a). Podważa to koncepcję obezpośredniej roli patogenetycznej amyloidu w powstawaniu ZN (Lewis i wsp. 1988, Tabaton i wsp. 1989).

4.6. Interesujący i zupełnie niezrozumiały jest fakt, że w mózdku nie spotyka się nigdy PHF sprzężonych z tau 1, a jedynie wykazujące dodatni odczyn przy użyciu przeciwciał przeciw ubikwitynie (Dickson i wsp. 1990, Suenga i wsp. 1990, Yamazaki i wsp. 1992). Zastanawia również szczególna odporność komórek Purkinjego na pojawianie się w ich cytoplazmie tau-dodatnich PHF. Zjawiska te opisane w oparciu obadania immunohistochemiczne nie znalazły dotychczas jednoznacznego wyjaśnienia ich mechanizmu. Jak dotąd wzbogacają jedynie fenomenologię patomorfologii procesów fizjologicznego i patologicznego starzenia układu nerwowego.

5. Co oznacza w świetle badań immunohistochemicznych

termin "fizjologiczne starzenie się"?

5.1. Wydaje się, że jedyną istotną różnicę pomiędzy białkiem prekursorowym amyloidu (APP), występującym w chorobie Alzheimera a APP - nagromadzonym w mózgach osób starych nie wykazujących cech otępienia stanowi obecność w jego cząsteczce białka Kunitza. Poziom APP zawierającego białko Kunitza wykazuje dodatnią korelację z liczbą blaszek starczych (niezależnie od tego czy są to mózgi osób z chA czy bez cech otępienia), nie ma natomiast takiej korelacji dodatniej z poziomem synaptofizyny. Izoforma APP - 695 nie zawierająca białka Kunitza występuje w mniejszej ilości w przypadkach chA i koreluje z poziomem synaptofizyny. Zahn i wsp. (1995) sądzą, że na ile APP zawierające białko Kunitza bierze udział w powstawaniu blaszek starczych na tyle izoform-

ma APP 695 jest związana z patologią synaps. Według innych autorów natomiast zasadnicza różnica pomiędzy APP w chA i w a starzeniu fizjologicznym wyraża się zależnymi od wieku zaburzeniami metabolizmu APP (Nordstedt i wsp. 1991).

5.2. Można by w istocie przyjąć koncepcję, że każdy mózg, w którym pojawi się β -amyloid w wyniku określonych przemian metabolicznych APP, jest mózgiem ze zmianami, które po jakimś czasie doprowadzą do klinicznego zespołu otępienia. Taką fazę ewolucyjną procesu można by nazwać stanem przedklinicznym. W przeanalizowanym przez nas materiale istniały jednak mózgi, w których w ogóle nie występowały zmiany typu zwyrodnienia alzheimerowskiego. To znaczy nie stwierdzono w nich ani złogów amyloidu i/lub zwyrodnienia neurofibrylarnego, ani też kongofilnej angiopatii. Mizutani i Shimada (1992) opisali grupę stuletnich starców, których mózgi były wolne od jakichkolwiek "zmian starczych". Przedstawione wyniki badań własnych uzyskane przy użyciu swoistych przeciwciał przeciw β -amyloidowi pozwalają pokusić się o próbę syntetycznej, immunomorfologicznej charakterystyki starzejącego się mózgu w porównaniu z mózgiami osób z chA. Mózg starczy to mózg zawierający nawet często złogi amyloidu przy nieznacznej, jednak obecności neuronów z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego.

Wydaje się przeto, że choć znakomita większość poszukiwań badaczy posługujących się coraz doskonalszym warształem metodycznym koncentruje się na biologii molekularnej amyloidu i białek związanych z parzystymi spiralnymi włóknkami patologicznie zmienionego neuronu, to być może rozwiązanie kwestii starzenia się mózgu związane byłoby raczej z odkryciem układu enzymatycznego, uwalniającego procesy kończące się pojawianiem opisanych powyżej patologicznych białek (Anderton 1987). Jeżeli przyjmie się założenie, że w materiale genetycznym człowieka zawarte są informacje dotyczące β -amyloidu wraz z informacjami dla enzymów, których działanie powstrzymuje kumu-

lowanie się włókien amyloidowych w neuropilu, to podstawowe znaczenie miałyby odkrycie tych właśnie układów enzymatycznych. W tym też kontekście niezmiernie interesujące i obiecujące są poszukiwania enzymów, najprawdopodobniej z grupy inhibitorów proteaz (Allsop i wsp. 1991). Ich niedomoga mogłaby prowadzić do odkładania się amyloidu włókninkowego w tkankach mózgu i do wyzwolenia kaskady nie poznanych do końca procesów, prowadzących do klinicznie ujawniającego się otępienia. ChA byłaby więc tylko przyspieszeniem tzw. "normalnych" procesów starczej dezintegracji tkanek ośrodkowego układu nerwowego regulowanych - jak przypuszczają (Warcham i wsp. 1987, Brayne, Galloway 1988) genetycznie przez związek z chromosomem X. Wyjaśnienie problemu udziału określonych układów enzymatycznych w patogenezie chA wymaga badań zarówno w zakresie biochemii jak i przede wszystkim biologii molekularnej.

6. Udział gleju w procesie starzenia się tkanek mózgu

Redlich (1898) i sam Alzheimer (1907) byli przekonani, że blaszki starcze są przejawem patologii komórek glejowych.

6.1. Przedstawione wyniki własnych obserwacji wskazują, że średnio tylko 36% BS barwi się jednocześnie przy użyciu przeciwciał przeciwko β -amyloidowi i GFAP. Wśród złogów amyloidu 38% wykazuje jednoczesne barwienie GFAP, a wśród BS dodatnich w odczynie z przeciwciałem przeciw GFAP 45% barwi się surowicami przeciw β -amyloidowi (Tab. 10). Istnieją więc złogi amyloidowe, które nie zawierają komórek gwiazdzistych i takie, które utworzone są przez GFAP dodatnie wypustki astrocytów, bez włókien amyloidu. Zakładając więc udział astrogleju w stymulacji fibrylogenezy amyloidu, niejasna pozostaje sekwencja czasowa poszczególnych zjawisk. Wydaje się przy tym mało

prawdopodobna koncepcja izby skupiska GFAP dodatnich włókien glejowych wyprzedzały pojawianie się złożeń amyloidu.

Obserwacje nasze wskazują, że reakcja astrogleju na obecność amyloidu jest taka sama w przypadku chA i w przypadkach bez cech otępienia. Nie ma żadnych danych wskazujących na związek przyczynowy między niedomogą komórki astrogleju wynikającą z wieku, a pojawieniem się cech otępiennych w przypadku amyloidozy mózgowej. Fakt, że nie każda BS wykazuje dodatni odczyn z przeciwciałami przeciwko GFAP, świadczy jedynie o różnym stopniu penetracji wypustek astrocytów w obręb złożeń amyloidowych. Wydaje się, że w ostatnim okresie ewolucji BS wybarwiają się wyłącznie przy użyciu surowic anty GFAP, a amyloid w końcowej fazie fagocytozy traci zdolność reagowania z przeciwciałami przeciw β -amyloidowi. Obserwacje dotyczące patologii mózdzku, w którym przeważa amyloid w postaci rozproszonej, wskazują na różnice reakcji astrocytarnej wyrażającej się w odczynie na GFAP wobec ogniskowej i rozproszonej postaci amyloidu. W ostatnim okresie odmienną tę wyjaśniono udziałem astrocytów we wzroście poziomu glikozoaminoglikanów. Udowodniono, przy tym, że udział ten jest różny w poszczególnych obszarach ośrodkowego układu nerwowego. Fakt ten może sugerować jednakże, że różnica odczynu astrocytarnego w uformowanej blaszce starczej zlokalizowanej w korze nowej i w hipokampie oraz w amyloidzie rozproszonym w mózdzku może zależeć nie tyle od typu amyloidu ile od właściwości podłoża, w którym się on gromadzi. Glikozoaminoglikany, których źródłem są astrocyty, biorą aktywny udział w regeneracji neurytów i pojawiają się w obszarach reaktywnej gliozy astrocytarnej (Höke i wsp. 1994, Kimura i wsp. 1995, Oohira i wsp. 1995). Pike i wsp. 1995 potwierdzili jednakże udział astrogleju w powstawaniu zwyrodnienia neurytów w obrębie blaszki starczej.

Niektórzy autorzy (Mandybur 1990) sugerują, że w przeciwieństwie do ogniskowych form amyloidu, w rozproszonym amyloidzie nie występuje proliferacja ani astrocytów (Yamaguchi 1990) ani mikrogleju (Ohgami i wsp. 1991). Pogląd ten jest często podważany. Według Probst (1987) amyloid rozproszony nie wywołujący reakcji astrocytarnej jest wstępną fazą gromadzenia jego włókienek w neuropilu. Dopiero komórka gleju gwiazdzistego ogranicza rozproszony amyloid. Zostaje on "pocięty" i odgraniczony od otoczenia właśnie przez astrocyty. Wówczas przybiera formę morfologiczną złożeń ogniskowych. Tworzenie się więc blaszek starczych związane jest z czynnościową wydolnością astrogleju, która, jak można się spodziewać maleje z wiekiem.

Przypuszcza się, że istotna rola astrogleju w patologii starczej ośrodkowego układu nerwowego polega na ograniczeniu złożeń amyloidowych przez tworzenie wokół niego blizny glejowej. Komórki astrogleju znajdują się na obwodzie BS otaczając ją pierścieniem wypustek (Dickson, Mattiace 1989). Przypuszcza się, że tworzenie ogniskowych złożeń amyloidu w postaci blaszki starczej przy udziale astrocytów a następnie "uprzątanie" ich przez astroglę jest swego rodzaju działaniem "cytoprotekcyjnym" w stosunku do neuronu i jego połączeń synaptycznych. Działanie to zanika lub jest ograniczone w niewydolności czynnościowej astrogleju. Wiśniewski i Węgiel (1991b) z kolei traktowali przez pewien czas amyloid rozproszony jako fazę końcową obecności amyloidu w mózgu. Przyjmowali oni, że najpierw pojawia się BS, a potem na skutek obronnych funkcji komórek astroglejowych - amyloid rozproszony, który jest niejako amyloidem resztkowym, stanowiącym pozostałość po próbach uprzątnięcia jego złożeń ogniskowych.

6.2. Szereg innych badaczy uważa, że rola astrogleju ogranicza się do postulowanego przez nich fagocytowania złożeń amyloidu (Duffy i wsp. 1980, Beach, Mc Geer 1988,

Mandybur 1990). Podobną reakcję astrogleju stwierdzono także wokół naczyń z kongo-filną angiopatią (Mandybur 1990).

6.3. Rozważa się również udział komórki astroglejowej bezpośrednio w produkcji amyloidu (Delacourte 1990, Haass i wsp. 1991). Wyniki poszukiwań mRNA dla prekursora amyloidu metodą hybrydyzacji *in situ* wskazują na jego obecność w niektórych komórkach gleju włóknistego. Wykazano także obecność mRNA dla α -1-chymotrypsyny w astrocytach w przypadkach chA. Według Pasternack'a i wsp. (1989) stanowi to dowód udziału gleju włóknistego w produkcji włókien amyloidowych.

6.4. Wykazano dodatkowo, że zwyrodnienie neurofibrylarne neuronów w fazie końcowej także podlega penetracji GFAP-dodatnich wypustek astrocytów (Probst i wsp. 1982, Yamaguchi i wsp 1987, Goodison i wsp. 1993). W badaniach naszych potwierdzono to immunohistochemicznie w tzw. "ghost tangles" w jądrach pnia mózgu. W barwie-niach podwójnych stwierdzono dodatni odczyn dla GFAP w "cieniach" zwyrodnienia neurofibrylarnego występujący razem z delikatnymi wiązkami włókien dodatnich przy użyciu przeciwciał anty tau 1 lub anty ubikwityny. Jak już wspomniano poprzednio, w przeciwieństwie do kory nowej, w której ubikwitynizacja PHF występuje w końcowej fazie procesu patologicznego, w neuronach jąder pnia może jej nawet nie być.

6.5. Spostrzeżeniem zasługującym na uwagę jest obecność zachowujących immuno-reaktywność z przeciwciałami przeciwko β -amyloidowi włókien amyloidowych w gemistocytach (ryc. 56) w przebiegu rozbiórki zawału bladego obejmującego tkanki zawierające złogi amyloidu i neurony ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym. Prześledzenie ewo-lucji reakcji astrocytarnej w przebiegu organizacji ogniska martwicy pozwoliło na stwier-

dzenie, że w kolejnych dniach po udarze wzrastała liczba przypadków, w których w pograniczu tkanki martwiczej gromadziły się gemistocyty fagocytyjające włóknkowy amyloid. Dopiero po 50 dniach udaru nie spostrzegano gemistocytów zawierających w cytoplazmie włókna β -amyloidu. W przeciwieństwie do włókien amyloidu, nie obserwowano nagromadzenia w gemistocytach PHF wykazujących dodatni odczyn z przeciwciałami anty tau 1, jak i skierowanymi przeciw epitopom ubikwityny. Sugeruje to większą odporność włókna amyloidowego na enzymy lizosomalne gemistocytów niż patologicznych białek powstających w wyniku dezintegracji cytoskeletonu komórki nerwowej.

7. Znaczenie mikrogleju w patogenezie amyloidoz

7.1. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań dowodzą ścisłego związku komórki mikroglejowej ze złogami amyloidu, potwierdzając zresztą spostrzeżenia innych autorów (Mc Geer i wsp. 1988ab, 1992a). Związek ten występował zarówno w transmisyjnych (GSS, CJD) jak i nietrasmisyjnych (chA, chP z otępieniem) amyloidozach mózgowych. W niektórych zespołach (CJD, chA) stwierdzono ponadto pomnożenie mikrogleju bez związku z obecnością amyloidu. Komórka mikroglejowa, dodatnia dla przeciwciał przeciw ferrytynie, LN 1, MR-27, oraz w barwieniu lektyną RCA 1, znajdowała się zawsze w centrum ogniskowego złogu, niezależnie od typu amyloidozy.

Stwierdzenie w naszych badaniach komórek mikroglejowych w blaszkach amyloidowych PrP-dodatnich w amyloidozach transmisyjnych, stanowi pośredni dowód, że znaczenie mikrogleju sprowadza się przede wszystkim do fagocytozy złogów amyloidowych (Rogers, Lubner-Narod 1988ab). Za przyjęciem tej koncepcji przemawia zasadniczo różny mechanizm obu procesów patologicznych: zwyrodnieniowy i prawdopodobnie infekcyjny.

7.2. Rola mikrogleju w patomechanizmie amyloidozy mózgowej była przedmiotem bardzo licznych badań (Haass i wsp. 1991,1992, Mc Geer i wsp. 1992b). Obecność mikrogleju w BS po raz pierwszy opisał Ley w 1922 roku. Liczna grupa badaczy (Dickson i wsp. 1988, Crystal i wsp. 1988, McGeer i wsp 1988b), do których należeli również Goodman (1953) oraz Wiśniewski i wsp. (1989c), wyznawała pogląd, że to właśnie komórka mikroglejowa odpowiada za produkcję lub nieprawidłową przemianę włókien amyloidowych. Biorąc pod uwagę fakt udowodnionego związku amyloidozy obwodowej z układem siateczkowo-śródbłonkowym (Shivers i wsp. 1988), Wiśniewski i wsp. (1989c) od lat wyrażali przekonanie, że mikroglej spełniający w oon funkcje uśś, odgrywa taką samą rolę w amyloidozie mózgowej. Według innych autorów mikroglej nie jest związany bezpośrednio z tworzeniem włókienek amyloidowych, ale bierze udział w tworzeniu amyloidowego rdzenia blaszki (Banati, Gracber 1994, Banati i wsp. 1994). Wiadomo również, że reaktywny mikroglej może oddziaływać na procesy zwyrodnieniowe neurytów (Rozemuller 1989b). Wiśniewski i Węgiel (1991b) oraz Mc Geer i wsp. (1992a) udowodnili ścisły związek komórki mikroglejowej z włóknami amyloidowymi na podstawie wnikliwej analizy obrazów mikroskopowo-elektronowych. Wykazano również (Wiśniewski Węgiel 1989c), że włókienka amyloidowe znajdują się wewnątrz szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, częściowo pozbawionej już rybosomów co mogłoby potwierdzać mikroglejowe tworzenie włókienek amyloidowych. Teoria ta napotkała wielu oponentów, którzy wysuwali podstawowy kontrargument, że sama obecność włókienek amyloidowych w ergastoplazmie komórki mikroglejowej nie dowodzi, że nie jest ona przejawem udziału mikrogleju wyłącznie w fagocytozie jego złogów. Nasze własne spostrzeżenia, oparte na badaniach znajdujących się w fazie organizacji mezodermalnej martwiczych tkanek mózgu, zawierających obfite złogi amyloidowe, sugerują, że fagocytowane włókna amyloidowe w makrofagach znajdują się wewnątrz lizosomów,

a nie ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. Badania mikroskopowo-elektronowe wykazały obecność włóknikowego amyloidu wewnątrz wtórnych lizosomów fagocytującego makrofaga. Należy przy tym podkreślić, że wśród badanych peptydów prekursora, przeciwciała przeciw peptydowi 4 /MR 27/ (Ryc. 1) wyraźnie wybarwiała komórkę mikroglejową. Może to przemawiać na rzecz jej związku z tworzeniem się amyloidu.

Uważa się, że obecność komórek mikroglejowych jest bardziej charakterystyczna dla blaszek klasycznych (Joachim i wsp. 1989b, Maat-Schieman i wsp. 1994), niż dla prymitywnych (Itagaki i wsp. 1989). Wydaje się przy tym, że jeśli nawet znaczenie występowania komórek mikroglejowych w BS nie jest do końca wyjaśnione zarówno w aspekcie produkcji jak i przetwarzania włókienek amyloidowych, to kwestią pozadyskusyjną jest ich udział w budowaniu rdzenia blaszki. Znacznie mniej wyraźny jest związek mikrogleju z amyloidem rozproszonym (Yamaguchi 1990). Potwierdzają to również nasze obserwacje poczynione na mózdzku z przewagą amyloidu rozproszonego. Spostrzeżenia morfologiczne znalazły potwierdzenie w badaniach immunohistochemicznych, przy użyciu ELISA'y a także w obserwacjach mikroskopowo-elektronowych (Thorsteinsson i wsp. 1992).

7.3. Istnieją również dowody na zwrotne oddziaływanie amyloidu na komórkę mikrogleju. Udowodniono, między innymi, że β -amyloid może wpływać na proliferację komórek mikrogleju i wydzielanie przez nie czynnika wzrostu (Araujo, Cotman 1992). Beta amyloid pobudzając i wzmacniając wydzielanie przez mikroglej czynników wzrostu (IL 1 i bFGF), wtórnie stymuluje proliferację astrocytów (Ferrara i wsp. 1988).

7.4. W 1987 roku Probst przedstawił ciekawą hipotezę, łączącą patogenetyczną rolę komórki mikroglejowej z teorią pierwotnej patologii synaptycznej w chA. Sugeruje on,

że złogi β -amyloidu stanowią mogą uboczny produkt przetwarzania białek synaptycznych przez komórki mikrogleju.

Rola mikrogleju w ośrodkowym układzie nerwowym wiązana jest również z funkcjami immunologicznymi. Zaznaczają się one szczególnie przy uszkodzeniu bariery krew-mózg, kiedy dochodzi do przejścia limfocytów na teren oun. Zjawisko to zresztą występuje również bez uszkodzenia mechanizmów barierowych. Postępująca z wiekiem inwolucja grasicy prowadzi do immunologicznej aktywizacji mikrogleju (Hartwig 1995). W związku z powyższym sugeruje się także udział komórki mikroglejowej w amyloidogenezie poprzez jej wpływ na układ immunologiczny (Itagaki i wsp. 1988, Rogers i wsp. 1988b, Pirttila i wsp. 1992).

7.5. Rola zależności w układzie astrocyt-mikroglej w chA rozpatrywana jest przede wszystkim w aspekcie wytwarzania cytokin, uczestniczących w patomechanizmie odkładania się włóknkowej postaci amyloidu w neuropilu a także w fagocytozie uszkodzonych neuronów (Griffin i wsp. 1994, Maury i wsp. 1995). Obecność cytokin: interleukiny 1 i 6 wykazano w ogniskowych złogach amyloidu, nie występują one natomiast w złogach rozproszonego, amyloidu amorficznego. Przypuszcza się, że cytokiny mogą brać udział w procesie zwyrodnienia neuronów położonych w obrębie złogów amyloidowych (Griffin i wsp. 1995, Huberman i wsp. 1995). Komórka mikroglejowa ma również wzmacniać ekspresję receptorów dla interleukiny 2 (Probst i wsp. 1992).

7.6. Wiśniewski i Węgiel (1992) zwracili uwagę na rolę perycyta w tworzeniu mózgowych ognisk amyloidowych. W naszych badaniach nad rozbiórką mezodermalną obszaru zawału błędnego w tkance ze zmianami typu alzheimerowskiego obserwowano dodatni odczyn komórek okołonaczyniowych (perycytów, makrofagów) z przeciwcia-

łami przeciw β -amyloidowi. Niektóre z nich widoczne były również w świetle naczyń żylnych (Ryc. 48). Sugeruje to bardziej udział perycytów w procesach fagocytozy β -amyloidu.

7.7. Na odrębne omówienie zasługują nasze spostrzeżenia dotyczące zróżnicowania reakcji mikrogleju w przypadkach choroby Alzheimera i choroby Parkinsona. Prolifera-
cja mikrogleju w istocie czarnej (SN) była znacznie intensywniejsza w chA niż w chP. Była to różnica statystycznie istotna ($p < 0,01$). Pomnożenie komórek mikrogleju w SN charakterystyczne dla choroby Alzheimera i mniej nasilone w przypadkach chP, a prawie nie obecne w materiale kontrolnym, świadczy o innej jeszcze niż fagocyta ról mikrogleju w chA. W przypadkach chA nawet bez obecności blaszek starczych, komórek mikroglejowych w SN jest znacznie mniej w chP, w której występuje dodatkowo wyraźny rozpad zanikających komórek barwnikowych. To pomnożenie mikrogleju w przypadkach choroby Alzheimera i jego wyraźna przewaga nad przypadkami choroby Parkinsona i materiałem kontrolnym uwidoczniły się przy użyciu wszystkich zastosowanych immunohistochemicznych znaczników mikrogleju. Było ono wyraźne również we wszystkich obszarach istoty czarnej. Warto podkreślić, że nasilenie proliferacji komórek mikroglejowych w części zbitej istoty czarnej było bardziej charakterystyczne dla badanych procesów chorobowych, niż tego typu zmiany w korze nowej, czy w hipokamie lub też w jądrach pnia mózgu takich jak jądro miejsca sinawego i jądra szwu. Liczba komórek mikroglejowych przypadających na milimetr kwadratowy części zbitej istoty czarnej była wyższa w sposób wysoce statystycznie znamieny (przy $p < 0,01$) osiągając najwyższe wartości w grupie chA. Może to być związane, z dobrze udokumentowanym zjawiskiem związku komórki mikroglejowej (ferrytyno- i RCA-1 dodatniej) z blaszkami starczymi (Grundke-Iqbal i wsp. 1990), które w sposób oczywisty są najliczniejsze w chA.

Wydaje się, jednak, że proliferacja komórek mikroglejowych w istocie czarnej w chA nie może być bezpośrednio wiązana ze współistnieniem BS. W istocie czarnej występowały przede wszystkim prymitywne, a nie klasyczne blaszki starcze. Jak wspomniano poprzednio mikroglej towarzyszący blaszkom prymitywnym nie jest na ogół zbyt obfity.

W chorobie Parkinsona odczyn mikrogleju wydaje się być bardziej związany z fagocytozą rozpadających się i zanikających neuronów istoty czarnej. W grupie chP i reprezentującej fizjologiczne starzenie się liczba komórek mikroglejowych była zbliżona, choć w sposób oczywisty wyższa dla chP. Dane te różnią się od opublikowanych przez Mc Geera (1988a), który podkreślał występowanie niezwykle nasilonej proliferacji mikrogleju w SN w chorobie Parkinsona. Rozbieżność ta może wynikać z różnic metodycznych. Mc Geer (1988a) stosował przeciwciała HLA-DR jako markera mikroglejowego. Był on dla mnie niedostępny przy badaniu materiału parafinowego. Z drugiej jednak strony Dexter i wsp. (1990) wykazali, że poziom ferrytyny w SN oznaczony metodą radioimmunoassay'u jest niższy w chP niż w normie.

Wydaje się, że na podstawie analizy naszego materiału można uznać, że w chorobie Alzheimera w przeciwieństwie do choroby Parkinsona i normy starczej mamy do czynienia, ze szczególnym uwrażliwieniem komórki mikroglejowej. Brak danych do oceny mechanizmu tego zjawiska. Nie jest ono jednak związane, a przynajmniej nie wyłącznie, z fagocytarnymi właściwościami mikrogleju. Przemawia przeciwko temu fakt, że reakcja mikroglejowa w istocie czarnej była w chorobie Alzheimera intensywniejsza niż w chorobie Parkinsona, w której rozpad barwnikowych neuronów jest czynnikiem bardziej pobudzającym funkcje fagocytarne mikrogleju niż niestała zresztą obecność blaszek starczych w chorobie Alzheimera. W tym kontekście na uwagę zasługuje znaczna proliferacja mikrogleju w przypadku postępującego porażenia nadjądrowego (PSP) (Kida i wsp. 1992), w którego typowych przypadkach występuje wyłącznie zwyrodnienie włókien-

kowe neuronów, bez obecności złożeń amyloidu. W przypadkach CJD bez blaszek PrP-amyloidu, proliferacja komórek mikroglejowych prawie wybiórczo dotyczy kory mózgu. W blaszkach PrP, obecnych w przypadkach CJD jak również w chorobie GSS mikroglej występuje w takiej samej konfiguracji jak w typowych amyloidowych blaszkach starczych, zajmując część centralną złożeń, w przeciwieństwie do otaczających ją komórek astroglejowych. Podsumowując należy stwierdzić, że związek mikrogleju z amyloidem i ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym jest niewątpliwie różnorodny. Bierze on dodatkowo udział w nieznanym do końca procesach patogenetycznych w amyloidozach transmisyjnych.

WNIOSKI

1. Białko prekursorowe dla amyloidu występuje powszechnie w komórkach ośrodkowego układu nerwowego (neuronach i gleju), ścianie naczynia, a także w narządach wewnętrznych u ludzi i ssaków. Nie pozwala to na obecnym etapie badań na jednoznaczne określenie, która komórka stanowiąca źródło prekursora amyloidu rozpoczyna proces odkładania się amyloidu włóknkowego w neuropilu.

2. Amyloid włóknkowy występuje w mózgach chorych ze zmianami otępiennymi i osób bez cech otępienia, jakościowo jest to związek w obu przypadkach bardzo podobny. Amyloid występuje w postaci złogów i depozytów ogniskowych i rozproszonych w neuropilu. Różnica pomiędzy mózgiem chorego z klinicznym rozpoznaniem otępieniem i bez cech otępienia dotyczy liczby złogów amyloidowych, ich lokalizacji, a także współistnienia złogów amyloidowych ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym neuronów. Zmiany te są przyczyną ubytków neuronalnych i uszkodzeń synaptycznych prowadzących w efekcie do otępienia.

3. Zmiany neurofibrylarne w jądrach barwnikowych: istocie czarnej i jądrach miejsca sinawego w chorobie Parkinsona i chorobie Alzheimera występują także bez złogów amyloidu. W jądrze miejsca sinawego w obu tych procesach zwyrodnieniowych stwierdza się wyraźne opóźnienie ubikwitynizacji zmian neurofibrylarnych w porównaniu z korą półkul, a także z jądrem środkowym górnym pnia. Być może jest to wyrazem

ochronnej roli białka tau sprzężonego z PHF w strukturach regulujących podstawowe czynności ustroju.

4. Rola gleju astrocytarnego w amyloidogenezie jest wieloraka. Komórka astrogleju wydaje się być jednym ze źródeł białka prekursorowego dla amyloidu, a także bierze udział w wytwarzaniu włókien - β -amyloidu. Astroglej odgrywa rolę komórki fagocytującej amyloid i neuronów ze zwyrodnieniem neurofibrylarnym, a także izoluje złogi amyloidu w neuropilu.

5. Komórka mikroglejowa w oon jest jednym ze źródeł APP. Bierze udział w tworzeniu ogniskowych złogów amyloidu (BS), w tym głównie ich rdzenia. Obserwuje się także uogólnioną proliferację komórek mikrogleju, w niektórych obszarach oon bez wyraźnego związku z amyloidem. Zjawisko to występuje w amyloidozach transmisyjnych ale i w chorobie Alzheimera. Rola mikrogleju w fagocytozie zmian amyloidowych wydaje się być także bardzo istotna dla patogenezy chA, modyfikuje bowiem ich lokalizację i wpływa na ich liczbę.

6. Badania morfologiczne procesów zwyrodnieniowych typu alzheimerowskiego wymaga często oceny historii chorób archiwizowanych przed wprowadzeniem współczesnych badań klinicznych nad otępieniem. Wymaga to opracowania metod wstecznej diagnozy demencji na podstawie istniejącej dokumentacji lekarskiej. Okazało się, że jedyną statystycznie znamioną cechą pozwalającą na retrospektywne rozpoznanie otępienia, w grupie przypadków opóźnionych w rozwoju, jest spadek ilorazu inteligencji o 10 punktów w skali Wechslera.

PIŚMIENNICTWO

Abe H., Mehraein P., Weis S.; Unusual ubiquitin-positive glial cells in the globus pallidus of normal elderly human brains, *Neuropath Appl Neurobiol*, 1994, 20, 609-613

Abraham C., Selkoe DJ., Potter H.; Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease, *Cell*, 1988, 52, 487-501

Adler MJ., Coronel C., Shelton E., Seegmiller JE., Dewji NN.; Increase gene expression of Alzheimer disease beta-amyloid precursor protein in senescent cultured fibroblasts, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88, 16-20.

Akiyama H., Tago H., Itagaki S., Mc Geer PL.; Occurrence of diffuse amyloid deposits in the presubicular parvocortical layer in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol*, 1990, 79, 537-54

Alafuzoff I., Adolfsson R., Grundke-Iqbal I., Winblad B.; Perivascular deposits of serum proteins in cerebral cortex in vascular dementia, *Acta Neuropathol*, 1985, 66, 292-298

Alafuzoff I., Adolfsson R., Grundke-Iqbal I., Winblad B.; Blood-brain barrier in Alzheimer dementia and non-demented elderly, *Acta Neuropathol*, 1987a, 73, 160-166

Alafuzoff I., Iqbal K., Friden H., Adolfsson R., Winblad B.; Histopathological criteria for progressive dementia disorders: clinicopathological correlation and classification by multivariate data analysis, *Acta Neuropathol*, 1987b, 74, 209-225

Ali-Khan Z., Normand J., Alizadeh-Khiavi K., Robitaille Y., Chronopoulos S.; Ubiquitin profile and amyloid enhancing factor activity in Alzheimer and "normal" human brain extracts; *Neurosci Lett*, 1992, 139, 24-28

Alizadeh-Khiavi K., Normand J., Chronopoulos S., Ali-Khan Z.; Alzheimer's disease brain-derived ubiquitin has amyloid-enhancing factor activity: behavior of ubiquitin during accelerated amyloidogenesis, *Acta Neuropathol*, 1991, 81, 280-286

Allsop D., Yamamoto T., Kametani T., Miyazaki N., Ishii T.; Alzheimer amyloid beta/A4 peptide binding sites and possible "APP-secretase" activity associated with rat brain cortical membranes, *Brain Res*, 1991, 551, 1-9

Alzheimer A.; Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Z Psychiatr-Gerichtl Med*, 1907, 64, 146-148

Amaducci L., Sorbi S., Piacentini S., Bick K.; The first Alzheimer disease case: A metachromatic leukodystrophy?, *Dev Neurosci* 1991, 13, 186-187

Anderson JM., Hubbard BM., Coghill GR., Slidders W.; The effect of advanced old age the neurone content of the cerebral cortex, *J Neurol Sci*, 1983, 58, 233-244

Anderson JP., Refolo LM., Wallence W., Mehta P., Krishnamurthi M., Gotlib J., Bierer L., Haroutunian V., Perl D., Robakis NK.; Differential brain expression of the Alzheimer's amyloid precursor protein, *EMBO J*, 1989, 8, 3627-3632

Anderton BH.; Tangled genes and proteins, *Nature*, 1987, 329, 106-107

Appelt DM., Balin BJ.; Analysis of Paired Helical Filaments (PHFs) found in Alzheimer's disease using freeze-drying/rotary shadowing, *J Struct Biol*., 1993, 111, 85-95

Araujo DM., Cotman CW.; Beta amyloid stimulates glial cells in vitro to produce growth factors that accumulate in senile plaques in Alzheimer's disease, *Brain Res*, 1992, 569, 141-145

Armstrong RA., Myers D., Smith CUM.; The distribution of senile plaques neurofibrillary tangles and beta/A4 deposits in the hippocampus in Alzheimer's disease, *Neurosci Res Comm*. 1992a, 10, 87-94

Armstrong RA., Meyers D., Smith CUM., Cairns N., Luthert PJ.; The spatial pattern of senile plaques, neurofibrillary tangles and A4 deposits in Alzheimer's disease, *Neurosci Res Comm*, 1992b, 10, 27-33

Armstrong RA.; The spatial patterns of β /A4 deposits subtypes in Down's syndrome, *Acta Neuropathol*, 1994, 88, 353-358

Armstrong RA., Myers D., Smith CUM.; What determines the size frequency distribution of β -amyloid ($A\beta$) deposits in Alzheimer's disease patients?, *Neurosci Lett*, 1995, 187, 13-16

Arriagada PV., Growdon JH., Hedley-Whyte E., Hyman T.; Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease, *Neurol*, 1992, 42, 631-639

Bachman DL., Wolf PA., Linn RT., Knofefel LE, Cnobb JL., Belanger AJ., White LR., d'Agostino RB.; Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in general population: a Framingham study, *Neurol*, 1993, 43, 515-519

Ball MJ.; Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia, *Acta Neuropathol*, 1977, 111, 111-119

Ball MJ., Lo P; Granulovacuolar degeneration in the ageing brain and in dementia, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1977, 36, 474-487

Ball M., Mac Gregor J., Fyfe IM., Rapoport SI., London ED.; Paucity of morphological changes in the brains of ageing Beagle dogs: Further evidence that Alzheimer lesions are unique for primate Central Nervous System, *Neurobiol of Aging*, 1983, 4, 127-131

Ball M., Hachinski V., Fox A., Kirshen AJ., Fisman M., Blume W., Kral VA., Fox H., Merskey H.; A new definition of Alzheimer's disease: A hippocampal dementia, *Lancet*, 1985, 14-16

Banati RB., Gherman J., Czech C., Monning LL., Jones G., Konig G., Beyreuther K., Kreutzberg GW.; Early and rapid de novo synthesis of Alzheimer β A4-amyloid precursor protein (APP) in activated microglia, *Glia*, 1993, 9, 199-210

Banati RB., Gerhman J., Kreutzberg GW.; Glial β - amyloid precursor protein: expression in the dentate gyrus after entorhinal cortex lesion, *NeuroReport*, 1994, 5, 1359-1361

Banati RB., Graber MB., Surveillance, intervention and cytotoxicity: is there a protective role of microglia?, *Dev Neurosci*, 1994, 16, 114-127

Bancher C., Lassmann H., Budka H., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Wiche G., Seitelberger I., Wiśniewski HM.; Neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy: antigenic similarities and differences, *Acta Neuropathol*, 1987, 74, 39-46

Bancher C., Jellinger KA.; Neurofibrillary tangle predominant form of senile dementia of Alzheimer type: a rare subtype in very old subjects, *Acta Neuropathol*, 1994, 88, 565-570

Barcikowska M., Kwieciński H., Liberski PP., Kowalski J., Brown P., Gajdusek DC.; Creutzfeldt-Jakob disease with Alzheimer-type A β -reactive amyloid plaques, *Histopathology*, 1995, 26, 445-450

Barianga M.; Possible new test found for Alzheimer's disease, *Science*, 1994, 266, 973

Barski J., Lewin-Kowalik J., Sieroń AL.; Współczesne poglądy na strukturę i funkcję hipokampa, *Neuro Neurochir Pol*, 1991, 26, 224-231

Beach TG., Mc Geer EG.; Lamina specific arrangement of astrocytic gliosis and senile plaques in Alzheimer's disease visual cortex, *Brain Res*, 1988, 463, 357-361

Beal MF., Mazurek MF.; Substance P-like immunoreactivity is reduced in Alzheimer's disease cerebral cortex, *Neurol*, 1987, 37, 1205-1209

Beal F.; Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illness?, *Ann Neurol*, 1992, 31, 119-130

Behl C., Davis JB., Klier FG., Schubert D.; Amyloid β peptide induces necrosis rather than apoptosis, *Brain Res*, 1994, 645, 253-264

Bell MA., Ball MJ.; Laminal variation in the microvascular architecture of normal human visual cortex (area 17), *Brain Res*, 1985, 335, 139-143

Benowitz LI., Rodriguez W., Paskevich PP., Mufson EJ., Schenk D., Neve RL.; The amyloid precursor protein is concentrated in neuronal lysosomes in normal and Alzheimer disease subjects, *Exp Neurol*, 1989, 106, 237-250

Bielschowsky M.; Die Silberimpragnation der Neurofibrillen, *J Psychol Neurol*, 1904, 3, 169-188

Bierer LM., Hof PR., Purohit DP., Carlin L., Schemidler J., Davis KL., Perl DP.; Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease, *Arch Neurol*, 1995, 52, 81-88

Biernat J., Mandelkow EM., Schroter C., Lichtenberg-Kraag B., Steiner B., Berling B., Meyer M., Mercken M., Vandermeeren A., Goedert M., Mandelkow E.; The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region, *EMBO J*, 1992, 11, 1593-1597

Binder LI., Frankfurter A., Rebhun LI.; The distribution of tau in the mammalian central nervous system, *J Cell Biol*, 1985,101,1371-1378

Birecree E., Whetsell WO., Stoscheck C., King LE., Nanney LB.; Immunoreactive epidermal growth factor receptors in neuritic plaques from patients with Alzheimer's disease, *J Neuropath Exp Neurol*, 1988, 47, 549-560

Blessed G., Tomlinson BE., Roth M.; The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects, *Brit J Psychiatr*, 1968, 114, 797-811

Block R., Marinesco I.; Sur les lesions et la pathogenic de l'epilepsie dite essentielle. *Semm Med*, 1892, 445

Bodovitz S., Falduto MT., Frail DE., Klein WL.; Iron levels modulate α -secretase cleavage of amyloid precursor protein, *J Neurochem*, 1995, 64, 307-315

Bondareff W., Mountjoy CQ., Roth M., Rossor MN., Iversen LL., Reynolds GP., Hauser DL.; Neuronal degeneration in locus ceruleus and cortical correlates of Alzheimer's., *Alzh Dis Assoc Disord*, 1987, 14, 256-262

Bornstein M.; Przypadek tzw. choroby Alzheimer'a, *Medycyna i Kronika Lekarska*, 1913, 42, 827

Bowen DM., Smith CB., White P., Davidson AN.; Neurotransmitter related enzymes and indices of hypoxia in dementia and other abiotrophies, *Brain*, 1976, 99, 459-496

Braak H., Braak E., Grundke-Iqbal I., Iqbal K.; Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease; a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques, *Neurosci Lett*, 1986, 65, 351-355

Braak H., Braak E.; Alzheimer's disease; Striatal amyloid deposits and neurofibrillary changes, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1990, 49, 215-224

Braak H., Braak E.; Neuropathological staging of Alzheimer-related changes, *Acta Neuropathol*, 1991, 82, 239-259

Braak H., Braak E., Bohl J.; Staging of Alzheimer-related cortical destruction, *Eur Neurol*, 1993, 33, 403-408

Braak E., Braak H., Mendelkow EM.; A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads, *Acta Neuropathol*, 1994a, 87, 554-567

Braak H., Braak E., Strothjohann M., Abnormally phosphorylated tau protein related to the form of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat, *Neurosci Lett*, 1994b, 171, 1-4

Brayne C., Calloway P.; Normal ageing, impaired cognitive function, and senile dementia of the Alzheimer's type: a continuum?, *Lancet* 1988, 1265-1266

Breitner JCS., Folstein MF.; Familial Alzheimer dementia: a prevalent disorder with specific clinical features, *Psychol Med*, 1984, 14, 63-80

Bruce CV., Clinton J., Gentleman SM., Roberts GW., Royston MC.; Quantifying the pattern of beta-amyloid protein distribution in Alzheimer's disease by image analysis, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1992, 18, 125-136

Brun A., Englund E.; A white matter disorder in dementia of the Alzheimer type: A pathoanatomical study. *Ann Neurol*, 1986, 19, 253-262

Bucland P., Tidmarsh S., Spurlock G., Kaiser F., Yates M., O'Mahony G., McGuffin P.; Amyloid precursor protein mRNA levels in the mononuclear blood cells of Alzheimer's and Down's patients, *Mol Brain Res*, 1993, 18, 316-32

Bueé L., Ding W., Anderson JP., Narindrasorasak S., Kisilevsky R., Boyle NL., Robakis NK., Delacourte A., Greenberg B., Fillit HM.; Binding of vascular heparan sulfate proteoglycan to Alzheimer's amyloid precursor protein is mediated in part by the N-terminal region of A4 peptide, *Brain Res*, 1993, 627, 199-204

Bueé L., Hof PR., Bouras C., Delacourte A., Perl DP., Morrison JH., Fillit HM.; Pathological alterations of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease and related dementing disorders, *Acta Neuropathol*, 1994, 87, 469-48

Bush AI., Whyte S., Thomas LD., Williamson TG., Van Tiggelen CJ., Currie J., Small DH., Moir RD., Qiao-Xin LI, Rumble B., Monning U., Beyreuther K., Masters CL.; An abnormality of plasma amyloid protein precursor in Alzheimer's disease., *Ann Neurol*, 1992, 32, 57-65

Cajal RY.; Degeneration and regeneration of the nervous system, Hafner Publishing Company, London, 1928

Calligaro DO., O'Malley PJ., Monn JA.; β -amyloid (25-35) or substance P stimulates [3H] MK-801 binding to rat cortical membranes in the presence of glutamate and glycine, *J Neurochem*, 1993, 60, 2297-2303

Carette B., Poulain P., Delacourte A.; Electrophysiological effects of 25-35 amyloid- β -protein on guinea-pig lateral septal neurons, *Neurosci Lett*, 1993, 151, 111-114

Castano EM., Frangione B.; Human amyloidosis, Alzheimer disease and related disorders, *Lab Invest*, 1988, 58, 122-132

Cataldo AM., Hamilton DJ., Nixon RA.; Lysosomal abnormalities in degenerating neurons link neuronal compromise to senile plaque development in Alzheimer's disease, *Brain Res*, 1994, 640, 68-80

Chartier-Harlin MC., Crawford F., Houlihan H., Warren A., Hughes D., Fidani L., Goate A., Rossor M., Roques P., Hardy J., Mullan M.; Early onset Alzheimer's disease caused by mutations of codon 717 of the Beta-amyloid precursor protein gene, *Nature*, 1991, 353, 844-846

Ciallella JR., Rangnekar VV., McGillis JP.; Heat shock alters Alzheimer's β amyloid precursor protein expression in human endothelial cells, *J Neurosci Res*, 1994, 37, 769-776

Clarris HJ., Nurcombe V., Small DH., Beyreuther K., Masters CL.; Secretion of nerve growth factor from septum stimulates neurite outgrowth and release of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease from hippocampal explants, *J Neurosci Res*, 1994, 38, 248-258

Cleary J., Hittner JM., Semotuk M., Manyth P., O'Hare E.; Beta-amyloid (1-40) effects on behavior memory, *Brain Res*, 1995, 682, 69-74

Clevens RA., Beal MF.; Substance P-like immunoreactivity in brains with pathological features of Parkinson's and Alzheimer's diseases, *Brain Res*, 1989, 486, 387-390

Cohen ML., Golde TE., Usiak LH., Younkin LH., Younkin SG.; In situ hybridization of nucleus basalis neurons shows increased beta-amyloid mRNA in Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85, 1227-1231

Cole GM., Huynh TV., Saitoh T.; Evidence for lysosomal processing of amyloid- β protein precursor in cultured cells, *Neurochem Res*, 1989, 14, 933-939

Cook RH., Ward BE., Austin JH.; Studies in aging of the brain: IV. Familial Alzheimer disease: relation to transmissible dementia, aneuploidy, and microtubular defects, *Neurology*, 1994, 29, 1402-1412

Cooper JR.; Unsolved problems in the cholinergic nervous system, *J Neurochem*, 1994, 395-399

Coria F., Castano EM., Frangione B.; Brain amyloid in normal aging and cerebral amyloid angiopathy is antigenically related to Alzheimer's disease beta-protein, *Am J Pathol*, 1987, 129, 422-428

Coria F., Prelli F., Castano EM., Larrondo-Lillo M., Fernandez-Gonzales J., van Duinen FSG., Bots GTAM., Luyendijk W., Shelanski ML., Frangione B.; Beta-protein deposition: a pathogenetic link between Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathies, *Brain Res*, 1988, 463, 187-191

Cork LC., Powers RE., Selkoe DJ., Davies P., Geyer JJ., Price DL.; Neurofibrillary tangles and senile plaques in aged bears, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1988, 47, 629-641

Cosgrove RC., Leblanc R., Meagher-Villemure K., Ethier R.; Cerebral amyloid angiopathy, *Neurology*, 1985, 35, 625-631

Cras P., Smith MA., Richey PL., Siedlak SL., Mulvihill P., Perry G.; Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease, *Acta Neuropathol*, 1995, 89, 291-295

Crystal HA., Davies P.; Cortical substance P-like immunoreactivity in cases of Alzheimer's disease and senile dementia of the Alzheimer type, *J Neurochem*, 1982, 38, 1781-1784

Crystal H., Dickson D., Fuld P., Masur D., Scott R., Mehler M., Masdeu J., Kawas C., Aronson M., Wolfson L.; Clinico-pathologic studies in dementia: nondemented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease, *Neurology*, 1988, 38, 162-168

Cummings BJ., Su JH., Cotman CW.; Neuritic involvement within bFGF immunopositive plaques of Alzheimer's disease, *Exp Neurol*, 1993, 124, 315-325

Curie J., Barcikowska M., Węgiel J., Moryś J., Mehta P., Wiśniewski HM.; Antiserum raised against a subsequence of Alzheimer amyloid precursor protein selectively labels a subset of microglial cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1989, 48, 328

Davies DC., Horwood N., Isaacs SL., Mann DMA.; The effect of age and Alzheimer's disease on pyramidal neuron density in the individual fields of the hippocampal formation, *Acta Neuropathol*, 1992, 83, 510-517

Davics L., Wolska B., Hilbich C., Multhaup G., Martins R., Simms G., Beyreuther K., Masters CL.; A 4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: Prevalence in aged brains determined by immunohistochemistry compared with conventional neuropathologic techniques, *Neurology*, 1988, 38, 1688-1693

Davies KL., Powchik P.; Tacrine, *Lancet*, 1995, 345, 625-630

Dayan AD.; Quantitative histological studies on the aged human brain. I. Senile plaques and neurofibrillary tangles in "normal" patients, *Acta Neuropath*, 1970a, 16, 85-94

Dayan AD.; Quantitative histological studies on the aged human brain, II Senile plaques and neurofibrillary tangles in senile dementia *Acta Neuropath*, 1970b, 16, 95-102

Defossez A., Delacourte A.; Transformation of degenerating neurofibrils into amyloid substance in Alzheimer's disease histochemical and immunohistochemical studies, *J Neurolog Sci*, 1987, 81, 1-10

Delabar JM., Goldgaber D., Lamour Y., Nicole A., Huret JL., de Grouchy J., Brown P., Gajdusek DC., Sinet PM.; Beta amyloid gene duplication in Alzheimer's disease and karyotypically normal Down syndrome, *Science*, 1987, 235, 1390-1392

Delacourte A., Defossez A.; Alzheimer's disease: tau proteins, the promoting factors of microtubulae assembly, are major components of paired helical filaments, *J Neurolog Sci*, 1986, 76, 173-186

Delacourte A.; General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains, *Neurol*, 1990, 40, 33-37

Devine-Gage EA., Jenkins EC., Brown WT., Robakis NK., Wisniewski HM.; The genetics of familial Alzheimer's disease, *Age*, 1988, 11, 98-102

deWolfe Miller F., Hicks SP., D'Amato CJ., Landis JR.; A descriptive study of neuritic plaques and neurofibrillary tangles in an autopsy population, *Am J Epidemiol*, 1984, 120, 331-341

Dexter DT., Caryon A., Vidailhet M., Ruberg M., Agid F., Agid Y., Lees AJ., Weels FR., Jemer P., Marsden CD.; Decrease ferritin levels in brain in Parkinson's disease, *J Neurochem*, 1990, 55, 16-21

Dickson DW., Farlo J., Davies P., Crystal H., Fuld P., Yen SHC.; Alzheimer's disease. A double-labeling immunocytochemical study of senile plaques, *Am J Pathol*, 1988, 132, 86-101

Dickson DW., Mattiace L.; Astrocytes and microglia in human brain share an epitope recognized by a B Lymphocyte specific monoclonal antibody /LN 1/, *Am J Pathol*, 1989, 135, 135-147

Dickson DW., Wertkin A., Mattiace LA., Fier E., Kress Y., Davies P., Yen SH.; Ubiquitin immunoelectron microscopy of dystrophic neurites in cerebellar senile plaques of Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol*, 1990, 79, 486-493

Divry P.; Etude histochimique des plaques seniles, *J Belg Neurol*, 1927, 27, 643-657

Doebler JA., Markesbery WR., Anthony A., Scheff SW., Rhoads RE.; Astrocyte RNA in relation to neuronal RNA depletion in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol*, 1988, 75, 272-276

Drago J., Kilpatrick TJ., Koblar SA., Talman PN.; Growth factors: potential therapeutic applications in neurology, *J Neurol Neurosurg Psych*, 1994, 57, 1445-1450

Duffy PE., Rapport M., Graf L.; Ghal fibrillary acidic protein and Alzheimer-type senile dementia, *Neurology*, 1980, 30, 778-782

Duyckaerts C., Hauw JJ., Bastenaire F., Piette F., Poulain V., Rainsard C., Javoy-Agid F., Berthaux P.; Laminar distribution of neocortical senile plaques in senile dementia of the Alzheimer type, *Acta Neuropathol*, 1986, 70, 249-256

Duyckaerts C., Delaere P., Poulain V., Brion JP., Hauw JJ.; Does amyloid precede paired helical filaments in the senile plaque? A study of 15 cases with graded intellectual status in aging and Alzheimer disease, *Nerosci Lett*, 1988, 91, 354-359

Dyrks T., Weidemann A., Multhaup G., Salbaum JM., Lemaire HG., Kang J., Muller-Hill B., Masters CL., Beyreuther K.; Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease, *EMBO J*, 1988, 7, 949-957

Eikelenboom P., Stam FC.; Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study, *Acta Neuropathol*, 1982, 57, 239-242

Ellison G.; The N-methyl-D-aspartate antagonists phencycline, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical models of the dementias, *Brain Res*, 1995, 20, 250-267

Englund E., Brun A., Almg C.; White matter changes in dementia of Alzheimer's type, *Brain*, 1988, 111, 1125-1439

Esch FS., Keim P., Beattie EC., Blacher RW., Culwell AR., Oltersdorf T., MC Clure D., Ward P.; Cleavage of amyloid beta-peptide during constitutive processing of its precursor, *Science*, 1990, 248, 1122-1128

Ferrara N., Ousley F., Gospodarowicz D.; Bovine brain astrocytes express basic fibroblast growth factor, a neurotropic and angiogenic mitogen, *Brain Res*, 1988, 462, 223-232

Fischer O.; Die presbyoprene Demenz, deren anatomische Grundlage und klinische Abgrenzung, *Z Neurol Psychiatr*, 1910, 3, 371-471

Forloni G., Chiesa R., Smioldo S., Verga L., Salmona M., Taghavini F., Angeretti N.; Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of β amyloid fragment 25-35, *NeuroReport*, 1993, 4, 523-526

Foster NL., Chase TN., Fedio P., Patronas NJ., Brooks RA., Di Chirio G.; Alzheimer's disease: focal cortical changes shown by positron emission tomography, *Neurology*, 1983, 33, 961-695

Foster NL., Chase TN., Mansi L.; Cortical abnormalities in Alzheimer's disease, *Ann Neurol*, 1984, 16, 649-654

Frackowiak J., Zoltowska A., Wisniewski HM.; Non-fibrillar β -amyloid protein is associated with smooth muscle cells of vessel walls in Alzheimer disease, *J Neuropath Exp Neurol*, 1994, 53, 637-645

Fratiglioni L.; Epidemiology of Alzheimer's disease. Issues of etiology and validity. *Acta Neurol Scand*, 87, suppl 1993, 145, 1-70

Fried VA., Smith HT., Hilderbrandt E., Weiner K.; Ubiquitin has intrinsic proteolytic activity: implications for cellular regulation, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84, 3685-3689

Fuller SC.; A study of the miliary plaques found in brains of the aged, *Amer J Insanity*, 1911, 147, 147-219

Gajdusek DC., Gibbs CJ., Alpers MP.; Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzees, *Nature*, 1966, 209, 794-796

Gallyas F.; Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development, *Acta Morph Acad Sci Hung*, 1971, 19, 1-8

Games D., Adams D., Alessandrini R., Barbour R., Berthelette P., Blackwell C., Cari T., Clemens J., Donaldson T., Gillespie F., Guido T., Hagopian S., Johnson-Wood K., Khan K., Lee M., Lebowitz P., Lieberburg I., Little S., Mashah E., MC Coniogue L., Montoya-Zavala M., Mucke L., Paganini L., Penniman E., Power B., Schenk D., Seubert P., Snyder B., Soriano F., Tan H., Vitale J., Wadsworth S., Wolozin B., Zhao J.; Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing 717 β -amyloid precursor protein, *Nature*, 1995, 373, 523-527

Gardella JE., Gorgone GA., Munoz PC., Ghiso J., Frangione B., Gorcevic PD.; β protein precursor expression in human platelets and a megakaryocyte cell line. Possible implications for the origin of cerebral amyloidosis in Alzheimer's, *Lab Invest*, 1992a, 67, 303-313

Gardella JE., Gorgone GA., Newman P., Frangione B., Gorevic PD.; Characterization of Alzheimer amyloid precursor protein transcripts in platelets and megakaryocytes, *Neurosci Lett*, 1992b, 138, 229-232

Gearing M., Wilson RW., Unger ER., Shelton ER., Chan HW., Masters C., Beyreuther K., Mirra SS.; Amyloid precursor protein (APP) in the striatum in Alzheimer's disease: an immunohistochemical study, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1993, 52, 22-30

Gentleman SM., Allsop D., Bruton CJ., Jagoe R., Polak JM., Roberts GW.; Quantitative differences in the deposition of beta/A4 protein in the sulci and gyri of frontal and temporal isocortex in Alzheimer's disease, *Neurosci Lett*, 1992, 136, 27-30

George-Hyslop PH., Tanzi RE., Polinsky RJ., Haines J., Nee L., Watkins PC., Myers RH., Feldman RG., Pollen D., Drachman D., Growdon J., Bruni A., Foncin JF., Salmon D., Frommelt P., Amaducci L., Sorbi S., Piacentini S., Stewart GD., Hobbs W., Conneally M., Gusella JF.; The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21, *Science*, 1987, 235, 885-890

Ghiso G., Jenson O., Frangione B.; Amyloid fibrils in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of Icelandic type is a variant of gamma-trace basic protein (Cystatin C), *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83, 2974

Ghiso J., Tagliavini F., Timmers WF., Frangione B.; Alzheimer's disease amyloid precursor protein is present in senile plaques and cerebrospinal fluid, *Bioch Biophys Res Comm*, 1989, 163, 430-437

Ghiso J., Gardella JE., Liem L., Gorevic PD., Frangione B.; Characterization of novel processing pathway for Alzheimer's amyloid β precursor protein, *Neurosci Lett*, 1994, 171, 213-216

Giaccone G., Tagliavini F., Linoh G., Bouras C., Frigerio L., Frangione B.; Down patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques, *Neurosci Lett*, 1989, 96, 232-238

Giannakopoulos P., Hof PR., Mottier S., Michel JP., Bouras C.; Neuropathological changes in the cerebral cortex of 1258 cases from a geriatric hospital: retrospective clinicopathological evaluation of a 10-year autopsy population, *Acta Neuropath*, 1994, 87, 456-468

Gibson PH.; Form and distribution of senile plaques seen in silver-impregnated sections in the brains of intellectually normal elderly people with Alzheimer-type dementia, *Neuropath Appl Neurol*, 1983, 9, 379-389

Glenner GG., Wong CW.; Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochem Biophys Res Commun*, 1984a, 120, 885-890

Glenner GG., Wong CW.; Alzheimer's disease and Down syndrome sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein, *Biochem Biophys Res Commun* 1984b, 122, 1131-1135

Glenner GG.; On causative theories in Alzheimer's disease, *Hum Pathol*, 1985, 16, 433

Gloor S., Odink K., Guenther J., Nicck H., Monard D.; A glia-derived neurite promoting factor with protease inhibitory activity belongs to the protease nexins, *Cell* 1986, 47, 687-693

Goate A., Chartier-Harlin MC., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., Mant R., Newton P., Rooke K., Roques P., Talbot C., Pericak-Vance M., Roses A., Williamson R., Rossor M., Owen M., Hardy J.; Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 1991, 349, 704-706

Goedert M.; Neuronal localization of amyloid beta protein precursor mRNA in normal human brain and in Alzheimer's disease, *EMBO*, 1987, 6, 3627-3632

Goedert M., Wischik CM., Crowther RA., Walker JE., Klug A.; Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: Identification as the microtubule - associated protein tau, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85, 4051-4055

Goldgaber D., Lerman ML., Mc Bridge OW., Saffiotti U., Gajdusek DC.; Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease, *Science*, 1987, 235,877-880

Gomez-Ramos P., Mufson EJ., Moran MA.; Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in neurofibrillary tangles, neuropil threads and senile plaques in aged and Alzheimer's brain, *Brain Res*, 1992, 569, 229-237

Goodman L.; Alzheimer's disease, a clinico-pathologic analysis of twenty three cases with a theory on pathogenesis, *J Nerv Ment Dis*, 1953, 118, 97-130

Goodison KL., Parhad IM., White CL., Sima AAF., Clark AW.; Neuronal and glial gene expression in neocortex of Down's syndrome and Alzheimer's disease, *J Neurol Exp Neurol*, 1993, 52, 192-198

Gorcevic PO., Goni F., Pons-Estel B., Alvarez F., Peress NS., Frangione B.; Isolation and partial characterization of neurofibrillary tangles and amyloid plaque core in Alzheimer's disease: immunohistological studies, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1986, 45, 647-664

Graham DI., Gentleman SM., Lynch A., Roberts GW.; Distribution of β -amyloid protein in the brain following severe head injury, *Neuropath Appl Neurobiol*, 1995, 21, 27-34

Greenberg S., Koo EH., Selkoe DJ., Qiu WQ., Kosik KS.; Secreted β -amyloid precursor protein stimulates mitogen-activated protein kinase and enhances τ phosphorylation, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91, 7104-7108

Griffin WST., Sheng JG., Roberts GW., Mraz RE.; Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease significance in plaque evolution, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1995, 54, 276-281

Grundke-Iqbal I., Wang GP., Iqbal K., Tung YC., Wisniewski HM.; Alzheimer paired helical filaments: identification of polypeptides with monoclonal antibodies, *Acta Neuropathol*, 1985, 68, 279-283

Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Tung YC., Zaidi MS., Wisniewski HM.; Microtubule-associated protein tau, *J Biol Chem*, 1986a, 261, 6084-6089

Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung YC., Quinlan M., Wisniewski HM., Binder LI.; Abnormal phosphorylation of the microtubule - associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986b, 83, 4913-4917

Grundke-Iqbal I., Fleming I., Tung YC., Lassman H., Iqbal K., Joshi JG.; Ferritin is a component of the neuritic /senile/ plaque in Alzheimer dementia. *Acta Neuropathol*, 1990, 81, 105-110

Gudmundsson G., Hallgrímsson J., Jonasson TA., Bjarnason O.; Hereditary cerebral hemorrhage and amyloidosis, *Brain*, 1972, 95, 587

Guiroy DC., Miyazaki M., Multhaup G., Fischer P., Garruto RM., Beyreuther K., Masters CL., Simms G., Gibbs CJ., Gajdusek C.; Amyloid of neurofibrillary tangles of Guamanian parkinson-dementia and Alzheimer disease share identical amino acid sequence, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84, 2073-2077

Ilaan J., Van Broeckhoven C., van Duijn CM., Voorhoeve E., van Swieten JC., Maat-Schicman M., Roos R, Bakker E.; The apolipoprotein E ϵ 4 allele does not expression of the amyloid precursor protein gene codon 693 or 692 mutation, *Ann Neurol*, 1994, 36, 434-437

Haass C., Hung AY., Selkoe DJ.; Processing of beta amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion, *J Neurosci*, 1991, 11, 3783-3793

Haass C., Koo H., Mellon A., Hung AY., Selkoe D.; Targeting of cell- surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid - bearing fragments, *Nature*, 1992, 357, 500-503

Han SH., Einstein G., Weisgraber KH., Strittmatter WJ., Saunders AM., Pericak-Vance M., Roses AD., Schmechel DE.; Apolipoprotein E is localized to the cytoplasm of human cortical neurons: a light and electron microscopic study, *J Neuropath Exp Neurol*, 1994, 53, 535-544

Hansen LA., Galasko D., Samuel W., Xia Y., Chen X., Saitoh T.; Apolipoprotein - E ϵ -4 is associated with increased neurofibrillary pathology in the Lewy body variant of Alzheimer's disease, *Neurosci Lett*, 1994, 63-65

Hartwig M.; Immune ageing and Alzheimer's disease, *NeuroReport*, 1995, 6, 1274-1276

Heinonen O., Soininen H., Syrjanen S., Neittaanmaki H., Paliarvi L., Kosunen O., Syriänen K., Riekkinen P.; β -amyloid protein immunoreactivity in skin is not a reliable marker of Alzheimer's disease, *Arch Neurol*, 1994, 51, 799-804

Herschko A., Ciechanower A.; The ubiquitin pathway for the degradation of intracellular proteins, *W: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 1986, 33, 19-56

Hirano A., Zimmerman HM.; Alzheimer's neurofibrillary changes, *Arch Neurol*, 1962, 7, 227-242

Hof PR., Bouras C., Buee L., Delacourte A., Perl DP., Morrison JH.; Differential distribution of neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of dementia pugilistica and Alzheimer's disease cases, *Acta Neuropath*, 1992, 85, 23-30

Hoke A., Canning DR., Malemud CJ., Silver J.; Regional differences in reactive gliosis induced by substrate-bound β -amyloid, *Exp Neurol*, 1994, 130, 56-66

Hsu SM., Raine I.; Protein A, Avidin and biotin in immunohistochemistry, *J Histochem Cytochem*, 1981, 29, 1349-1355

Huang DY., Goedert M., Jakes R., Weisgraber KH., Garner CC., Saunders AM., Pericak-Vance MA., Schmechel DE., Roses AD., Strittmatter WJ.; Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with the microtubule-associated protein MAP 2c: implications for Alzheimer's disease, *Neurosci Lett*, 1994, 182, 55-58

Huberman M., Sredni B., Stern L., Kott E., Shalit F.; IL-2 and IL-6 secretion in dementia: correlation with type and severity of disease, *J Neurol Sci*, 1995, 130, 161-164

Hyman BT., Van Hoesen GW., Damasio AR., Barnes CL.; Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation, *Science*, 1984, 225, 1168-1170

Hyman BT., Van Hoesen GW., Kromer LJ., Damasio AR.; Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease, *Ann Neurol*, 1986, 20, 472-481

Hyman BT., Kromer BA., Van Hoesen GW.; Reinnervation of the hippocampal perforant pathway zone in Alzheimer's disease, *Ann Neurol*, 1987, 21, 259-267

Hyman BT., Van Hoesen GW., Wolozin BL., Davies P., Kromer IL., Damasio AR.; Alz 50 antibodies recognizes Alzheimer related neuronal changes, *Ann Neurol*, 1988, 23, 371-379

Hyman BT., Tanzi RE., Marzloff K., Barbour R., Schenk D.; Kunitz protease inhibitor-containing amyloid β protein precursor immunoreactivity in Alzheimer's disease, *J Neuropath Exp Neurol*, 1992, 51, 76-83

Ihara Y.; A critical comment on immunohistochemistry of amyloid core in Alzheimer's disease, *Int, Symp, on Dementia and Amyloid "Neuropathology" Suppl.3*, 1986, 59-66

Ikeda K., Haga C., Akiyama H., Kase K., Iritani S.; Coexistence of paired helical filaments and glial filaments in astrocytic processes within ghost tangles, *Neurosci Lett*, 1992a, 148, 126-128

Ikeda K., Haga C., Oyanagi S., Iritani S., Kosaka K.; Ultrastructural and immunohistochemical study of degenerate neurite-bearing ghost tangles, *J Neurol*, 1992b, 239, 191-194

Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Wśniewski HM.; Alzheimer neurofibrillary tangle and its relationship with plaque core amyloid, *W: Amyloidosis wyd: Glenner GG., Osserman EF., Benditt EP., Calkins E., Cohen AS., Zucker-Franklin D.*, 1986a, 717-721

Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Zaidi T., Merz P., Wen GY., Shaikh SS., Wśniewski HM., Alafuzoff I., Winblad B.; Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease, *Lancet*, 1986b, 421-426

Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Merz P., Wśniewski HM., Zaidi T.; In vitro assembly and isolation of neurofilaments and microtubules from mammalian CNS, *Molec Brain Res*, 1987, 3, 163-172

Ishihara T., Gondo T., Takahashi M., Uchino F., Ikeda SI., Allsop D., Imai K.; Immunohistochemical and immunoelectron microscopical characterization of cerebrovascular and senile plaque amyloid in aged dogs' brains, *Brain Res*, 1991, 548, 196-205

Ishino H., Otsuki S.; Frequency of Alzheimer's neurofibrillary tangles in the basal ganglia and brain-stem in Alzheimer's disease, senile dementia and the aged, *Folia Psych Neurobiol Jap*, 1975, 29, 279-287

Itagaki S., Mc Geer PL., Akiyama H.; Presence of T-cytotoxic suppressor and leukocyte common antigen positive cells in Alzheimer disease brain tissue, *Neurosci Lett*, 1988, 91, 159-264

Itagaki S., Geer P., Akiyama H., Zhu S., Selkoe D.; Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer's disease, *J Neuroimmunol*, 1989, 24, 173-182

Jellinger KA.; Hippocampal sclerosis: a common pathological feature of dementia in very old humans, *Acta Neuropath*, 1994, 88, 599

Jellinger KA.; Alzheimer's changes in non-demented and demented patients, *Acta Neuropath*, 1995, 89, 112-113

Jensen M., Basun H., Lannfelt L.; Increased cerebrospinal fluid tau in patients with Alzheimer's disease, *Neurosci Lett*, 1995, 186, 189-191

Jentsch S., Seufert W., Sommer T., Reims HA.; Ubiquitin conjugating enzymes: novel regulators of eucaryotic cells, *Trends Biochem Sci*, 1990, 15 195-198

Jervis GA.; Early senile dementia in mongoloid idiocy, *Am J Psych*, 1948, 105, 102-106

Joachim CL., Duffy LK., Morris JH., Selkoe DJ.; Protein chemical and immunohistochemical studies of meningeovascular beta-protein in Alzheimer's disease and normal aging, *Brain Res*, 1988a, 474, 100-111

Joachim CL., Morris JH., Selkoe DJ.: Clinically diagnosed Alzheimer's disease: autopsy results in 150 cases, *Ann Neurol* 1988b, 24, 50-56

Joachim CL., Mori H., Selkoe DJ.; Amyloid- β -protein deposition in tissues other than the brain in Alzheimer's disease, *Nature*, 1989, 341, 226-230

Joachim CL., Morris JH., Selkoe DJ.; Diffuse senile plaques occur commonly in the cerebellum in Alzheimer's disease, *Am J Path*, 1989c, 135, 309-319

Joachim CJ., Games D., Morris J., Ward P., Frenkel D., Selkoe D.; Antibodies to non-beta regions of the beta-amyloid precursor protein detect a subset of senile plaques, *Am J Path*, 1991, 138, 373-384

Kalaria RN., Bhatti SU., Palatinsky EA., Pennington DH., Shelton ER., Chan HW., Perry G., Lust WD.; Accumulation of the β amyloid precursor protein at sites of ischaemic injury in rat brain, *NeuroReport*, 1993, 4, 211-214

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, 198-203

Kang J., Lemaire HG., Unterbeck A., Salbaum JM., Masters CL., Grzeschik KII., Multhaup G., Beyreuther K., Muller-Hill B.; The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor, *Nature*, 1987, 325, 733-736

Kawabata S., Higgins GA., Gordon JW.; Amyloid plaques, neurofibrillary tangles and neuronal loss in brains of transgenic mice over expressing a C-terminal fragment of human amyloid precursor protein, *Nature*, 1991, 354, 476-478

Kawahara E., Shiro M., Nakanishi I., Migita S.; The role of fibronectin in the development of experimental amyloidosis, *Am J Pathol*, 1989, 134, 1305-1314

Katzman R., Terry R., De Teresa R., Brown T., P Davies P., Fuld P., Renbing X., Peck A.; Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: A subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques, *Ann Neurol*, 1988, 23, 138-144

Khachaturian ZS.; Diagnosis of Alzheimer's Disease, *Arch Neurol* 1985, 42, 1097-1105

Kida E., Barcikowska M., Niemczewska M.; Immunohistochemical study of the case with progressive supranuclear palsy without ophthalmoplegia, *Acta Neuropathol*, 1992, 83, 328-332

Kidd M.; Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease, *Nature*, 1963, 197, 192-193.

Kidd M., Allsop D., Landon M.; Senile plaque amyloid, *Interdiscipl Topics Geront*, 1985a, 19, 114-126

Kidd M., Allsop D., Landon M.; Senile plaque amyloid, paired helical filaments and cerebrovascular amyloid in Alzheimer's disease are deposits of the same protein, *Lancet*, 1985b, 278

Kim KS., Miller DL., Sapienza VJ., Chen J., Bai C., Grundke-Iqbal I., Currie JR., Wisniewski HM.; Production and characterization of monoclonal antibodies reactive to synthetic cerebrovascular amyloid peptide, *Neurosci Res Comm*, 1988, 2, 121-130

Kimura T., Hisano T., Yoshida H., Ueda K., Miyakawa T.; Re-evaluation of classic senile plaques by three-dimensional analysis, *J Neurol*, 1994, 241, 624-627

Kimura T., Takamatsu J., Araki N., Goto M., Kondo A., Miyakawa T., Horiuchi S.; Are advanced glycation end-products associated with amyloidosis in Alzheimer's disease?, *NeuroReport*, 1995, 6, 866-868

Kitaguchi N., Takahashi Y., Tokushima Y., Shiojiri S., Ito H.; Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity, *Nature*, 1988, 331, 530-532

Kitaguchi N., Takahashi Y., Oishi K., Shiojiri S., Tokushima Y., Utsunomiya T., Hiratake I.; Enzyme specificity of proteinase inhibitor region in amyloid precursor protein of Alzheimer's disease: different properties compared with protease nexin I, *Bioch, Biophys Acta*, 1990, 1038, 105-113

Kitamoto T., Ogomori K., Tateishi J., Prusiner S.; Methods in Laboratory investigation. Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloidosis, *Lab Invest*, 1987, 57, 230-236

Kokmen E., Beard RN., O'Brien PC., Offord KP., Kurland LT.; Is the incidence of dementing illness changing?, *Neurology*, 1993, 43, 1887-1892

Koo EH., Sisodia SS., Archer DR., Martin LE., Weidemann A., Beyreuther K., Fischer P., Msters CL., Price DL.; Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast antergrade axonal transport, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87, 1561-1565

Kosik KS., Duffy LK., Dowling MM., Abraham C., Mc Cluskey A., Selkoe DJ.; Microtubule-associated protein 2: monoclonal antibodies demonstrate the selective incorporation of certain epitopes into Alzheimer neurofibrillary tangles, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81, 7941-7945

Kosik KS., Joachim CL., Selkoe D.; Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83, 4044-4048

Kosik KS., Rogers J., Kowall NW.; Senile plaques are located between apical dendritic clusters, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1987, 46, 1-11

Kosik KS., Orecchio LD., Binder L., Trojanowski JQ., Lee VMY., Lee G.; Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments, *Neuron*, 1988, 1, 817-825

Kosik KS., Crandall JE., Mufson EJ., Neve RJ.; Tau in situ hybridization in normal and Alzheimer's brain: localization in the somatodendritic compartment, *Ann Neurol*, 1989, 26, 352-361

Kosik KS.; Tau protein and Alzheimer's disease, *Current opinion in cell biology*, 1990, 2, 101-104

Kowall NW., Kosik KS.; Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease, *Ann Neurol*, 1987, 22, 639-643

Książak-Reding H., Binder L., Yen SH.; Immunochemical and biochemical characterization of tau proteins in normal and Alzheimer's disease brains with Alz 50 and Tau-1, *J Biol Chem*, 1988a, 263, 7948-7953

Ksiezak-Reding H., Davies P., Yen SH.; Alz 50, a monoclonal antibody to Alzheimer's disease antigen, cross-reacts with tau proteins from bovine and normal human brain, *J Biol Chem*, 1988b, 263, 7943-7947

Kukull WA., Hinds TR., Schelllenberg GD., van Belle G., Larson EB.; Increased platelet membrane fluidity as a diagnostic marker for Alzheimer's disease: a test in population-based cases and controls, *Neurol*, 1992, 42, 607-614

Ladror US., Kohnken RE., Wang GT., Manelli AM., Frail DE., Klein WL., Holzman TF., Krafft GA.; Evidence against a role for the Kunitz domain in amyloidogenic and secretory processing of the amyloid precursor protein, *J Neurochem*, 1994, 63, 2225-2230

Lassmann H., Weiler R., Fischer P., Bancher C., Jellinger K., Floor E., Danielczyk W., Seitelberger F., Winkler H.; Synaptic pathology in Alzheimer's disease immunological data for markers of synaptic and large dense-core vesicles, *Neuroscience*, 1992, 46, 1-8

Leonardi A., Arata L., Bino G., Caria M., Farinelli M., Parodi C., Scudaletti M., Canonica GW.; Functional study of T lymphocyte responsiveness in patients with dementia of the Alzheimer type, *J Neuroimmunol*, 1989, 22, 19-22

Leuba G., Kraftsik R.; Visual cortex in Alzheimer's disease: occurrence of neuronal death and glial proliferation, and correlation with pathological hallmarks, *Neurobiol Aging*, 1994, 15, 29-43

Lewis DA., Higgins GA., Young WG., Goldgaber D., Gajdusek DC., Wilson MC., Morrison JH.; Distribution of precursor amyloid beta-protein messenger RNA in human cerebral cortex: Relationship to neurofibrillary tangles and neuritic plaques, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85, 1691-1695

Ley R.; Etude anatomique sur la senilite, w: Livre jubilaire de la societe Belge de Neurlogie, 1922

Liberski PP., Papierz W., Alwasiak J.; Creutzfeldt-Jakob disease with plaques and paired helical filaments, *Acta Neurol Scand*, 1987, 76, 428-432

Liberski PP.; Pasażowalne i niepasażowalne amyloidozy mózgowe: choroby o różnej etiologii i tej samej patogenezie, *Pat Pol*, 1993, 44, 19-30

Loberg EM., Torvik A.; Uptake of plasma proteins into damaged neurons, *Acta Neuropathol*, 1991, 81, 479-485

Love S., Saitoh T., Quijada S., Cole GM., Tery RD; Alz-50, ubiquitin and tau immunoreactivity of neurofibrillary tangles, Pick bodies and Lewy bodies, *J Neuropath Exp Neurol*, 1988, 47, 393-405

Maat-Schieman MLC., van Duinen SG., Haan J., Ross RAC.; Morphology of cerebral plaque-like lesions in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch), *Acta Neuropathol*, 1992, 84, 674-679

Maat-Schieman., Radder CM., van Duinen SG., Haan J., Roos RAC.; Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch) a model for congophilic plaque formation without neurofibrillary pathology, *Acta Neuropathol*, 1994, 88, 371-378

Mackenzie IAR.; Senile plaques do not progressively accumulate with normal aging, *Acta Neuropathol*, 1994, 87, 520-525

Mak K., Yang F., Vinters HV., Frautschy SA., Cole GM.; Polyclonals to β -amyloid (1-42) identify most plaque and vascular deposits in Alzheimer cortex, but not striatum, *Brain Res*, 1994, 667, 138-142

Mandybur TI; The incidence of cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease, *Neurology*, 1975, 25, 120-126

Mandybur TI.; Cerebral amyloid angiopathy: The vascular pathology and complications, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1986, 45, 79-90

Mandybur TI.; Cerebral amyloid angiopathy and astrocytic ghosis in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol*, 1989, 78, 329-331

Mandybur TI., Chuirazzi CC.; Astrocytes and the plaques of Alzheimer's disease, *Neurol*, 1990, 40, 635-639

Mann DMA., Yates PO., Marcyniuk B.; Some morphometric observations on the cerebral cortex and hippocampus in presenile Alzheimer's disease, senile dementia of Alzheimer type and Down's syndrome in middle age, *J Neurol Sci*, 1985, 69, 139-159

Mann DMA., Tucker CM., Yates PO.; The topographic distribution of senile plaques and neurofibrillary tangles in the brains of non-demented persons of different ages, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1987, 13, 123-139

Mann DMA.; Cerebral amyloidosis, aging and Alzheimer's disease: a contribution from studies on Down syndrome, *Neurobiol Aging*, 1989a, 10, 397-399

Mann DMA., Esiri MM.; The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome, *J Neurol Sci*, 1989b, 89, 169-179

Mann DMA.; The topographic distribution of brain atrophy in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol*, 1991, 83, 81-86

Mann DMA., Jones D., Snowden JS., Neary D., Hardy J.; Pathological changes in the brain of patient with familial Alzheimer's disease having a missense mutation at codon 717 in the amyloid precursor protein gene, *Neurosci Lett*, 1992a, 137, 225-228

Mann DMA., Jones D., South PW., Snowden JS., Neary D.; Deposition of amyloid beta-protein in non-Alzheimer dementias: Evidence for a neuronal origin of parenchymal deposits of beta-protein in neurodegenerative disease, *Acta Neuropathol*, 1992b, 83, 415-419

Markowitsch HJ., Tulving E.; Cognitive processes and cerebral cortical fundi, *NeuroReport*, 1995, 6, 413-418

Maslah E., Terry R., Buzsaki G.; Thalamic nuclei in Alzheimer disease: evidence against the cholinergic hypothesis of plaque formation, *Brain Res*, 1989, 493, 240-246

Maslah E., Iimoto DS., Saitoh T., Hansen LA., Terry RD.; Increased immunoreactivity of brain spectrin in Alzheimer disease: a marker for synapse loss?, *Brain Res*, 1990, 531, 36-44

Masliah E., Hansen L., Albright T., Mallory M., Terry RD.; Immunoelectron microscopic study of synaptic pathology in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol*, 1991, 81, 428-433

Masliah E., Ellisman M., Carragher B., Mallory M., Young S., Hansen L., DeTeresa R., Terry RD.; Three-dimensional analysis of the relationship between synaptic pathology and neuropil threads in Alzheimer disease, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1992, 51, 404-414

Masliah E., Mallory M., Deerinck T., DeTeresa R., Lanont S., Miller A., Terry R., Carragher B., Ellisman M.; Re-evaluation of the structural organization of the neuritic plaques in Alzheimer's disease, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1993, 52, 619-632

Masliah E., Honer WG., Mallory M., Voigt M., Kushner P., Hansen L., Terry R.; Topographical distribution of synaptic-associated proteins in the neuritic plaques of Alzheimer's disease hippocampus, *Acta Neuropathol*, 1994a, 87, 135-142

Masliah E., Mallory M., Hansen L., DeTeresa R., Alford M., Terry R.; Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease, *Neurosci Lett*, 1994b, 174, 67-72

Masters CL., Multhaup G., Simms G., Pottgiesser J., Martins RN., Beyreuther K.; Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels, *EMBO J*, 1985a, 11, 2757-2763

Masters CL., Simms G., Weinman NA., Multhaup G., Mc Donald BL., Beyreuther K.; Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985b, 82, 4245-4249

Mattila KM., Pirttila T., Blennow K., Wallin A., Viitanen M., Frey H.; Altered blood-brain-barrier function in Alzheimer's disease?, *Acta Neurol Scand*, 1994, 89, 192-198

Mattson MP., Engle MG., Rychlik B.; Effects of elevated intracellular calcium levels on the cytoskeleton and tau in cultured human cortical neurons, *Molec Chem Neuropath*, 1991, 15, 117-142

Mattson MP., Cheng B., Davis D., Bryant K., Lieberburg I., Rydel E.; β -amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity, *J Neurosci*, 1992, 12, 376-389

Mattson MP., Carney JW., Butterfield DA.; A tombstone in Alzheimer's, *Nature*, 1995, 373, 481

Maury CPJ.; Biology of disease. Molecular pathogenesis of β amyloidosis in Alzheimer's disease and other cerebral amyloidoses, *Lab Invest*, 1995, 72, 4-16

Mc Geer PL., Mc Geer EG., Suzuki J., Dolman CE., Nagai T.; Aging, Alzheimer's disease, and the cholinergic system of the basal forebrain, *Neurol*, 1984, 34, 741-745

Mc Geer PL., Itagaki S., Boyes BE., Mc Geer EG.; Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 1988a, 38, 1285-1291

Mc Geer PL., Itagaki S., Mc Geer EG.; Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease, *Acta Neuropathol*, 1988b, 76, 550-557

Mc Geer PL., Rogers J.; Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease, *Neurology*, 1992a, 42, 447-449

Mc Geer PL., Akiyama H., Kawamata T., Yamada T., Walker DG., Ishii T.; Immunohistochemical localization of beta-amyloid precursor protein sequences in Alzheimer and normal brain tissue by light and electron microscopy, *J Neurosci Res*, 1992b, 31, 428-442

McKenzie JE., Gentleman SM., Roberts GW., Graham DI., Royston MC.; Increased numbers of β APP-immunoreactive neurones in the entorhinal cortex after head injury, *NeuroReport*, 1994, 6, 161-164

Mena R., Edwards P., Perez-Olvera O., Wischik CM.; Monitoring pathological assembly of tau and β -amyloid proteins in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol*, 1995, 89, 50-56

Miyakawa T., Sumiyoshi S., Murayama E., Deshimaru M.; Ultrastructure of capillary plaque-like degeneration in senile dementia, *Acta Neuropathol*, 1974, 29, 229-236

Miyakawa T., Katsuragi S., Yamashita K., Ohuchi K.; Morphological study of amyloid fibrils and preamyloid deposits in the brain with Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol*, 1992a, 83, 340-346

Miyakawa T., Katsuragi S., Yamashita K., Araki K., Hashimura T., Kimura T., Ohuchi K.; The distribution of alpha-antichymotrypsin and amyloid production in the brain in Alzheimer's disease, *Virchows Archiv B Cell Pathol*, 1992b, 61, 331-335

Mizutani T., Shimada H.; Neuropathological background of twenty-seven centaurian brains, *J Neurol Sci*, 1992, 108, 168-177

Morel F.; Contribution a l'etude d'une forme particuliere d'affection vasculaire cerebrale, *Rev Med Siss romande*, 1946, 66, 820-829

Mori H., Kondo J., Ihara Y.; Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimers disease, 1987, 235, 1641-1644

Mori S., Sternberger NH., Herman MM., Sternberger LA.; Leakage and neuronal uptake of serum protein in aged and Alzheimer brains, *Lab Invest*, 1991, 64, 345-351

Morris JC., Heyman A., Mohs RC., Hughes JP., van Belle MSG., Fillenbaum G., Mellits ED., Clark C., CERAD investigators; The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD), *Neurol*, 1989, 39, 1159-1165

Mortimer JA., Hutton T.; Epidemiology of Alzheimer's disease, *Senile dementia of the Alzheimer type*, ed. Liss AR., 1985, 177-196

Moryś J., Narkiewicz O., Maciejewska B., Wegiel J., Wiśniewski HM.; Amyloid deposits and loss of neurons in the claustrum of the aged dog, *NeuroReport*, 1994a, 5, 1825-1828

Moryś J., Narkiewicz O., Sadowski M., Barcikowska M., Berdel B., Kida E., Maciejewska B., Wiśniewski Hm.; Topografia zmian patologicznych w strukturach hipokampowych mózgu w starzeniu, otępieniu naczyniopochodnym i chorobie Alzheimera, *Ann Acad Med Gedan*, 1994b, 24, 9-22

Mufson EJ., Conner JM., Kordower JH.; Nerve growth factor in Alzheimer's disease: defective retrograde transport to nucleus basalis, *NeuroReport*, 1995, 6, 1063-1066

Mullan M., Crawford F.; Genetic and molecular advances in Alzheimer's disease, *TINS*, 1993, 16, 398-403

Murrell J., Farlow M., Ghetti B., Benson M.; A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science*, 1991, 254, 97-99

Murti KG., Smith HT., Fried VA.; Ubiquitin is a component of the microtubule network, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85, 3019-3023

Nakagawa Y., Kitamoto T., Furukawa H., Ogomori K., Tateishi J.; Allelic variation of Apolipoprotein E in Japanese sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients, *Neurosci Lett*, 1995, 187, 209-211

Namba Y., Tsuchiya, Ikeda K.; Apolipoprotein E immunoreactivity in senile plaque and vascular amyloidosis and neurofibrillary tangles in the brains of patients with Alzheimer's disease, *Neurosci Lett*, 1992, 134, 264-266

Narindrasorasak S., Altman RA., Gonzalez-DE Whitt P., Greenberg B., Kisilevsky R.; Influence of entactin on the binding of other basement membrane proteins to the Alzheimer amyloid precursor proteins. Kisilevsky R., Benson MD., Frangione B., Gaudie J., Muckle TJ., Young ID, ed. *Amyloid and amyloidosis 1993*, New York, Parthenono Publ. 1994, 344-346

Neary D., Snowden JS., Mann DMA., Bowen DM., Sims NR., Nothorn B., Yates PO., Davison AN.; Alzheimer's disease: a correlative study, *J Neurol Psych*, 1986, 49, 229-237

Neve RL., Finch EA., Davies LR.; Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human Brain, *Neuron*, 1988, 1, 669-677

Nitta A., Itoh A., Hasegawa T., Nabeshima T.; β -amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model, *Neurosci Lett*, 1994, 170, 63-66

Nordstedt C., Candy SE., Alafuzoff I., Caporaso GL., Iverfeldt K., Grebb JA.; Alzheimer β /A4 amyloid precursor protein in human brain: aging-associated increase in holoprotein and in a proteolytic fragment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88, 8910- 8914

Nukina N., Kosik KS., Selkoe DJ.; Recognition of Alzheimer paired helical filaments by monoclonal neurofilament antibodies is due to crossreaction with tau protein, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84, 3415-3419

Nukina N., Kosik KS., Selkoe DJ.; The monoclonal antibody Alz 50 recognizes tau proteins in Alzheimer's disease brain, *Neurosci Lett*, 1989, 87, 240-246

Ohgami T., Kitamoto T., Shin RW., Kaneko Y., Ogomori K., Tateishi J.; Increased senile plaques without microglia in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol*, 1991, 81, 242-247

Olson L., Backman, Ebendal T., Eriksdotter-Jonhagen M., Hoffer B., Humpel C., Fredman R., Giacobini M., Meyerson B., Nordberg A., Seiger A., Stromberg I., Sydow O., Tomac A., Trok K., Winblad B.; Role of growth factors in degeneration and regeneration in the central nervous system; clinical experiences with NGF in Parkinson's and Alzheimer's diseases, *J Neurol*, 1994, 24, S12-S15

Oltersdorf T., Fritz LC., Schebk DB., Lieberburg I., Johnson-Wood L., Bcattie EC., Ward PJ., Russel JW., Blacher W., Dovey HR., Sinha S.; The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin II, *Nature*, 1989, 341, 144-147

Oohira A., Kushiina Y., Matsui F., Wanatanabe E.; Detection of Alzheimer's β -amyloid precursor related proteins bearing chondroitin sulfate both in the juvenile rat brain and in the conditioned medium of primary cultured astrocytes, *Neurosci Lett*, 1995, 189, 25-28

Osetowska E.; Etude anatomopathologique sur le cerveau de chiens senile, *Proceedings of the Fifth International Congress of Neuropathology*, ed. Luthy F, Bischoff A, Amsterdam, Excerpta medica Foundation, 1966, 497-502

Otvos L., Feiner L., Lang E., Szendrei GI., Goedert M., Lee VMY.; Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404, *J Neurosci Res*, 1994, 39, 669-673

Oyama F., Shimada H., Oyama R., Ihara Y.; Apolipoprotein E genotype, Alzheimer pathologies and related gene expression in the aged population, *Mol Brain Res*, 1995, 29, 92-98

Pahnert MR., Berman-Podlisny M., Golde T., Cohen ML., Kovacs DM., Tanzi RE., Gusella JF., Whitehouse PJ., Witker DS., Oltersdorf T., Younkin LH., Selkoe DJ., Younkin SG.; Analysis of the beta-amyloid protein precursor of Alzheimer's disease: mRNAs and protein products, *Advances in Neurology, Alzheimer's Disease*, ed. Richard J Wurtman, Raven Press, Ltd, New York 1990a, 51, 181-184

Pahnert MR., Usiak M., Mayeux R., Raskind M., Tourtellotte WW., Younkin SG.; Soluble derivatives of the beta amyloid protein precursor in cerebrospinal fluid: alterations in normal aging and in Alzheimer's disease, *Neurol*, 1990b, 40, 1028-1034

Palsdottir A., Abrahamson M., Thorsteinsson L., Arnanson A., Olafsson I., Grubb A., Jansson O.; Mutation in the Cystatin C gene causes hereditary brain hemorrhage, *W: Alzheimers disease and related disorders*, wyd.: A. Liss Inc., 1989, 241-247

Papasozomenos S.; Tau protein immunoreactivity in dementia of the Alzheimer type, *Lab Invest*, 1989, 60, 123-137

Pardridge WM., Vinters HM., Yang J., Eisenberg J., Choi TB., Tourtellotte WW., Heubner V., Shively HJE.; Amyloid angiopathy of Alzheimer's disease: amino-acid composition and partial sequence of a 4200 dalton peptide isolated from cortical microvessels, *J Neurochem*, 1987, 49, 1394-1401

Pasternack JM., Abraham CR., Van Dyke BJ., Potter H., Younkin SG.; Astrocytes in Alzheimer's disease gray matter express alpha 1-antichymotrypsin mRNA; *Am J Pathol*, 1989, 135, 827-834

Paulus W., Bancher C., Jellinger K.; Interrater reliability in the neuropathologic diagnosis of Alzheimer's disease, *Neurol*, 1992, 42, 329-332

Pauwels PJ., van Assouw H., De Ryck M., Leysen JE., Dom R., Van Gool D.; Towards an improved survival of rat brain neurons in culture by cerebrospinal fluid of patients with senile dementia of Alzheimer's type, *Brain Res*, 1993, 610, 8-15

Perlmutter LS., Barron E., Saperia D., Chui HC.; Association between vascular basement membrane components and the lesions of Alzheimer's disease, *J Neurosci Res*, 1991, 30, 673-681

Perry G., Friedman R., Shaw G., Chau V.; Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84, 3033-3036

Pike CJ., Burdic D., Walencewicz AJ., Glabe CG., Cotman CW.; Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides in vitro : The role of peptide assembly state, *J Neurosci*, 1993, 13, 1676-1687

Pike CJ., Cummings BJ., Cotman CW.; Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease, *Exp Neurol*, 1995, 132, 172-179

Pirttila T., Mattinen S., Frey H.; The decrease of CD 8-positive lymphocytes in Alzheimer's disease, *J Neurol Sci*, 1992, 107, 160-165

Pirttila T., Kim KS., Mehta PD., Frey H., Wiśniewski HM.; Soluble amyloid β -protein in the cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease, vascular dementia and controls, *J Neurol Sci*, 1994, 127, 90-95

Podlisny MB., Lee G., Selkoe DJ.; Gene dosage of the amyloid beta-precursor protein in Alzheimer's disease, *Science*, 1987, 238, 669-671

Ponte P., Gonzales de Whitt P., Schilling J., Miller J., Hsu D., Greenberg B., Davis K., Wallace W., Lieberburg I., Fuller F., Cordell B.; A new A 4 Amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors, *Nature*, 1988, 331, 525-527

Prelli F., Castano E., Glenner GG., Frangione B.; Differences between vascular and plaque core amyloid in Alzheimer's disease, *J Neurochem*, 1988, 51, 648-651

Pro JD., Smith MCH., Sumi SM.; Presenile Alzheimer disease: Amyloid plaques in the cerebellum, *Neurol*, 1980, 30, 820-825

Probst A., Ulrich J., Heitz U.; Senile dementia of Alzheimer type: Astroglial reaction to extracellular neurofibrillary tangles in the hippocampus, *Acta Neuropathol*, 1982, 57, 75-79

Probst A., Brunnshweiler H., Lautenschlager C., Ulrich J.; A special type of senile plaque, possibly an initial stage, *Acta Neuropathol* 1987, 74, 133-141

Probst A., Langui D., Ipsen S., Robakis N., Ulrich J.; Deposition of beta/A4 protein along neuronal plasma membranes in diffuse senile plaques, *Acta Neuropathol*, 1992, 83, 21-29

Procter AW., Francis PT., Holmes C., Webster MT., Qume M., Stratmann GC., Doshi R., Mann DMA., Harrison PJ., Pearson RCA., Bowen DM.; β -amyloid precursor protein isoforms show correlations with neurones but not with glia of demented subjects, *Acta Neuropathol*, 1994, 88, 545-552

Rassol C., Abraham C., Anderton B., Haugh M., Kahn J., Selkoe DJ.; Alzheimer's disease: immunoreactivity of neurofibrillary tangles with anti-neurofilament and anti-paired helical filament antibodies, *Brain Res*, 1998, 30, 249-260

Redlich E.; Uber mihare Sklerose der Hirnrinde bei seniler Atrophie, *Jahrb Psychiatr Neurol*, 1898, 17, 208-216

Renkawek K., Bosman GJ., de Jong WW.; Expression of small heat-shock protein hsp 27 in reactive gliosis in Alzheimer disease and other types of dementia, *Acta Neuropathol*, 1994, 87, 511-519

Riekkinen P., Soiminen H., Helkala EL., Partanen K., Laakso M., Vanhanen M., Riekkinen P.; Hippocampal atrophy, acute THA treatment and memory in Alzheimer's disease, *NeuroReport*, 1995, 6, 1297-1300

Robakis NK., Wiśniewski HM., Jenkins EC., Devine-Gage E., Houck GE., Yao XL., Ramakrishna N., Wolfe G., Silverman WP., Brown WT.; Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic(senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome, *Lancet*, 1987a, 384-385

Robakis NK., Ramakrishna N., Wolfe G., Wiśniewski.; Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neurite plaque amyloid peptides, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987b, 84, 4190- 4194

Roberts GW.; Innunocytochemistry of neurofibrillary tangles in dementia pugilistica and Alzheimer's disease: Evidence for common genesis, *Lancet*, 1988, II, 1456-1458

Roberts GW., Gentleman SM., Lynch A., Graham DI.; β A4 amyloid protein deposition in brain after head trauma, *Lancet*, 1991, 338, 1422-1423

Roberts GW., Gentleman SM., Lynch A., Murray L., Landon M., Graham DI.; β -amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease, *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 1994, 57, 419-425

Robinson PM., Clemens JA., Smalstig EB., Stephenson D., May PC.; Decrease in amyloid precursor protein precedes hippocampal degeneration in rat brain following transient global ischemia, *Brain Res*, 1993, 608, 334-337

Rogers J., Luber-Narod J.; Immune actions in the nervous system: a brief review with special emphasis on Alzheimer's disease, *Drug Dev Res*, 1988a, 15, 227-235

Rogers J., Luber-Narod J., Styren SD., Civin WH.; Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease, *Neurobiol of Aging*, 1988b, 9, 339-349

Rosenblum WL., Haider A.; Negative correlations between parenchymal amyloid and vascular amyloid in hippocampus, *Am J Pathol*, 1988, 130, 532-536

Roses AD.; Apolipoprotein E affects the rate of Alzheimer disease expression: β -amyloid burden is a secondary consequence dependent on APO E genotype and duration of disease, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1994, 53, 429-437

Royston MC., Mann D., Pickering-Brown S., Owen F., Perry R., Raghavan R., Khin-Nu C., Tyrer S., Day K., Crook R., Hardy J., Roberts GW.; Apolipoprotein E ϵ 2 allele promotes longevity and protects patients with Down's syndrome from dementia, *NeuroReport*, 1994a, 5, 2583-2585

Royston MC., Kodical NS., Mann DMA., Groom K., Landon M., Roberts GW.; Quantitative analysis of β -amyloid deposition in Down's syndrome using computerized image analysis, *Neurodegeneration*, 1994b, 3, 43-51

Rozemuller JM., Eikelenboom P., Stam FC., Beyreuther K., Masters CL.; A4 protein in Alzheimer's disease: primary and secondary cellular events in extracellular amyloid deposition, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1989a, 48, 674-691

Rozemuller JM., Eikelenboom P., Pals ST., Stam FC.; Microglial cells around amyloid plaques in Alzheimer's disease express leukocyte adhesion molecules of the LFA-1 family, *Neurosci Lett*, 1989b, 101, 288-292

Ruben GC., Novak M., Edwards PC., Iqbal K.; Alzheimer paired helical filaments, untreated and pronase digested, studied by vertical platinum-carbon replication and high resolution transmission electron microscopy, *Brain Res*, 1995, 675, 1-12

Rumble B., Retallack R., Hilbich C., Simms G., Multhaup G., Martins R., Hockey A., Montgomery P., Beyreuther K., Masters CL.; Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease, *N Engl J Med*, 1989, 320, 1446-1452

Samuel W., Terry RD., DeTeresa R., Butters N., Masliah E.; Clinical correlates of cortical and nucleus basalis pathology in Alzheimer dementia, *Arch Neurol*, 1994a, 51, 772-778

Samuel W., Masliah E., Hill LR., Butters N., Terry R.; Hippocampal connectivity and Alzheimer's dementia: effects of synapse loss and tangle frequency in a two-component model, *Neurology*, 1994b, 44, 2081-2088

Saunders AM., Strittmatter WJ., Schmechel D., St George-Hyslop PH., Pericak-Vance MA., Joo SH., Rosi BL., Gusella JF., Crapper-MacLachlan, Alberts MJ., Hulette C., Crain B., Goldgaber D., Roses AD.; Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease, *Neurology*, 1993, 43, 1467-1472

Savedia S., Kiernan JA.; Increased production of ubiquitin mRNA in motor neurons after axotomy, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1994, 20, 577-586

Scheff SW., Price DA.; Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease, *Ann Neurol*, 1993, 33, 190-199

Scholz W.; Studien zur Pathologie der Hirngefasse. Die drusige Entertung der Hirnar-
terien und kapillaren, Z Neurol Psychiatr, 1938, 162, 694-715

Schwagerl AL., Mohan PS., Cataldo AM., Vonsattel JP., Kowall NW., Nixon RA.;
Elevated Levels of the endosomal-lysosomal proteinase cathepsin D in cerebrospinal fluid
in Alzheimer disease, J Neurochem, 1995, 64, 443-446

Seiler N.; Is amonia a pathogenetic factor in Alzheimer's disease?, Neurochem Res,
1993, 18, 235-245

Selinger MJ., Mc Adam KP., Kaplan MM., Sipes JD., Vogel SN., Rosenstreich DL.;
Monokine-induced synthesis of serum amyloid A protein by hepatocytes, Nature, 1980,
285, 498-500

Selkoe DJ., Bell DS., Podlisny MB., Price DL., Cork LC.; Conservation of brain
amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease, Science, 1987,
235, 873-877

Selkoe DJ., Podlisny MB., Joachim SL., Vickers EA, Lee G., Oltersdorf T.; β -amyloid
precursor protein of Alzheimers disease occurs as 110-135 kilodalton membrane asso-
ciated proteins inneural and nonneural tissues. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85,
7341-7345

Selkoe DJ.; Alzheimer's disesae: A central role for amyloid, J Neuropathol Exp Neu-
rol, 1994, 53, 438-447

Shea TB.; Role of glial-derived nexin in neuronal differentiation and in acute brain
injury and potential involvement in exacerbation of neurodegeneration in Alzheimer's
disease, Brain Res, 1995, 20, 171-184

Shirama T., Cohen AS.; An analysis of the close relationship of lysosomes to early
deposits of amyloid, Am J Pathol, 1973, 73 97-114

Shivers BD., Hiblich C., Multhaup G., Salbaum JM., Beyreuther K., Seeburg PH.;
Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein: expression pattern in rat brain suggests
a role in cell contact, EMBO J, 1988, 7, 1365-1370

Shoji M., Hirai S., Harigaya Y., Kawarabayashi T., Yamaguchi H.; The amyloid
 β -protein precursor is localized in smooth muscle cells of leptomeningeal vessels, Brain
Res, 1990, 530, 113-116

Shoji M., Hirai S., Yamaguchi H., Harigaya Y., Ishiguro K., Matsubara E.; Alpha 1-antichymotripsin is present in diffuse senile plaques, *Am J Pathol*, 1991, 138, 247-257

Shoji M., Golde TE., Ghiso J., Cheung TT., Estus S., Shafer LM., Cai XD., McKay DM., Tintner R., Frangione B., Younkin SG.; Production of the Alzheimer amyloid β -protein by normal proteolytic processing, *Science*, 1992, 258, 126-129

Siman R., Card P., Nelson RB., Davis LG.; Expression of beta-amyloid precursor protein in reactive astrocytes following neuronal damage. *Neuron*, 1989, 3, 275-285

Simchowicz T.; Histopathologische studien, uber die senile demenz, w *Histologie und Histopatologische Arbeiten uber die Grosshirnrinde*, wyd. Nissl F, Alzheimer A, Jena, Germany, Fischer, 1911, 4, 267- 444

Sims NR., Finegan JM., Blass JP.; Altered metabolic properties of cultured skin fibroblast in Alzheimer's disease, *Ann Neurol*, 1987, 21, 451-457

Sisodia SS., Koo EH., Beyreuther K., Unterbeck A., Price DL.; Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing, *Science*, 1990, 24, 492-494

Sisodia SS.; β -amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89, 6075-6079

Smith C., Anderton BH.; The molecular pathology of Alzheimer's disease: are we any closer to understanding the neurodegenerative process?, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1994, 20, 322-338

Snow AD., Willmer J., Kisilevsky R.; Sulfated glycosaminoglycans: A common constituent of all amyloids?, *Laborat Invest*, 1987, 56, 120-123

Snow AD., Mar H., Nochlin D., Kimata K., Kato M., Suzuki S., Hassel J., Wight TN.; The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease, *Am J Pathol*, 1988, 133, 456-463

Soininen H., Syrjanen S., Heinonen O., Neittaanmaki H., Miettinen R., Paliarvi L., Syrianen K.; Amyloid beta-protein deposition in skin of patients with dementia, *Lancet*, 1992, 339, 245

Sopher BL., Fukuchi K., Smith AC., Lepping KA., Furlong CE., Martin GM.; Cytotoxicity mediated by conditional expression of a carboxyl-terminal derivative of the β -amyloid precursor protein, *Mol Brain Res*, 1994, 26, 207-217

Soto C., Frangione B., Two conformational states of amyloid β -peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Neurosci Lett*, 1995, 186, 115-118

Spillantini MG., Hunt J., Ulrich J., Goedert M.; Expression and cellular localization of amyloid beta-protein precursor transcripts in normal human brain and in Alzheimer's disease, *Molec Brain Res*, 1989, 6, 143-150

Spillantini MG., Goedert M., Jakes R., Klug A.; Topographical relationship between beta-amyloid and tau protein epitopes in tangle-bearing cells in Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87, 3952-3956

Stephenson DT., Rash K., Clemens JA.; Amyloid precursor protein accumulates in regions of neurodegeneration following focal cerebral ischemia in the rat, *Brain Res*, 1992, 593, 128-135

Sternberger LA., Sternberger NH.; Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80, 6126-6130

Strittmatter W., Weisgraber KH., Goedert M., Saunders AM., Huang D., Corder EH., Dong LM., Jakes R., Alberts MJ., Gilbert JR., Han SH., Hulette C., Einstein G., Schmechel DE., Pericak-Vance I., Roses AD.; Hypothesis: Microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer Disease brain are related to apolipoprotein E genotype, *Exp Neurol*, 1994, 125, 163-171

Su JH., Cummings BJ., Cotman CW.; Identification and distribution of axonal dystrophic neurites in Alzheimer's disease, *Brain Res*, 1993, 625, 228-237

Suenga T., Hirano A., Llenga JF., Książek- Reding H., Yen SH., Dickson DW.; Modified Bielschowsky and immunocytochemical studies on cerebellar plaques in Alzheimer's disease, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1990, 49, 31-40

Sulkava R., Haltia M., Partau A., Wikstrom J., Palo J.; Accuracy of clinical diagnosis in primary degenerative dementia: correlation with neuropathological findings, *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 1983, 46, 9-13

Tabaton M., Mandybur T., Perry G., Onorato M., Auttilo-Gambetti L., Gambetti P.; The widespread alteration of neurites in Alzheimer's disease may be unrelated to amyloid deposition, *Ann Neurol*, 1989, 26, 771-778

Tabaton M., Cammarata S., Mandybur T., Richey P., Kawai M., Perry G., Gambetti P.; Senile plaques in cerebral amyloid angiopathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abnormalities, *Brain Res*, 1992, 593, 299-303

Tagliavini F., Giaccone G., Frangione B., Bugiani O.; Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and nondemented individuals, *Neurosci Lett*, 1988, 93, 191-196

Tagliavini F., Giaccone G., Verga L., Ghiso J., Frangione B., Bugiani O.; Alzheimer patients: preamyloid deposits are immunoreactive with antibodies to extracellular domains of the amyloid precursor protein, *Neurosci Lett*, 1991, 128, 117-120

Takahashi M., Tomizawa K., Ishiguro K., Takamatsu M., Fujita SC., Imahori K.; Involvement of τ protein kinase I in paired helical filament-like phosphorylation of the juvenile τ in rat brain, *J Neurochem*, 1995, 64, 1759-1768

Tanaka S., Nakamura S., Kimura J., Ueda K.; Age-related change in the proportion of amyloid precursor protein mRNAs in the grey matter of cerebral cortex, *Neurosci Lett*, 1993, 163, 19-21

Tanno H., Nockels RP., Pitts LH., Noble LJU.; Immunolocalization of heat shock protein after fluid percussive brain injury and relationship to breakdown of the blood-brain barrier, *J Cereb Blood Flow Metab*, 1993, 13, 116-124

Tanzi RE., George-Hyslop PH., Haines JL., Polinsky RJ., Nee L., Foncin JF., Neve RL., McClatchey AI., Conneally PM., Gusella JF.; The genetic defect in familial Alzheimer's disease is not tightly linked to the amyloid-beta protein gene, *Nature*, 1987a, 329, 156-159

Tanzi RE., Gusella JF., Watkins PC., Bruns GA., George-Hyslop P., Van Keuren M., Patterson D., Pagan S., Kurnit DM., Neve R.; Amyloid beta-protein gene: cDNA, mRNA distribution and genetic linkage near the Alzheimer locus, *Science*, 1987b, 235, 880-884

Tanzi RE., McClatchey AI., Lamperti ED., Villa-Komaroff L., Gusella JF., Neve RL.; Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease, *Nature*, 1988, 331, 528-530

Terry RD., Hansen LA., De Teresa R., Davies P., Tobias H., Katzman R.; Senile dementia of the Alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles, *J Neuropath Exp Neurol*, 1987, 46, 262-268

Thorsteinsson L., Georgsson G., Asgeirsson B., Bjarnadottir M., Olafsson I., Jensson O., Gundmundsson G.; On the role of monocytes/macrophages in the pathogenesis of central nervous system lesions in hereditary cystatin C amyloid angiopathy, *J Neurol Sci*, 1992, 108, 121-128

Tomlinson BE., Irving D., Blessed G.; Cell loss in the locus coeruleus in senile dementia of Alzheimer type, *J Neurol Sci*, 1981, 49, 419-428

Tomlinson BE., Kitchener D.; Granulovacuolar degeneration of hippocampal pyramidal cells, *J Pathol*, 1982, 106, 165-185

Tomonaga M.; Amyloid angiopathy and dementia, *Int Symp. on Dementia and Amyloid "Neuropathology" Suppl.3*, 1986, 23-35

Topper R., Gehrman J., Banati R., Schwarz M., Block F., Noth J., Kreutzberg GW.; Rapid appearance of β -amyloid precursor protein immunoreactivity in glial cells following excitotoxic brain injury, *Acta Neuropathol*, 1995, 89, 23-28

Ulrich J.; Senile plaques and neurofibrillary tangles of the Alzheimer type in nondemented individuals at presenile age, *Gerontol*, 1982, 28, 86-90

Ulrich J.; Alzheimer changes in nondemented patients younger than sixty-five: Possible early stages of Alzheimer's disease and senile dementia of Alzheimer type, *Ann Neurol*, 1985, 17, 273-277

Ulrich J., Anderton BH., Probst A.; Alzheimer dementia: A study of the senile plaque with antisera and a monoclonal antibody specific for neurofilament proteins, *Acta Histochem*, Suppl. 1987, 34, 115-121

Vallet PG., Guntern R., Hof PR., Golaz J., Delacourte A., Robakis NK., Bouras C.; A comparative study of histological and immunohistochemical methods for neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol*, 1992, 83, 170-178

van Braunmühl A.; Kongophilie Angiopathie und "Senile Plaques" bei greisen Hunden, *Arch Psychiat Nervenkr*, 1956, 194, 396-404

Van Broeckhoven C., Genthe AM., Vandenberghe A., Horsthemke B., Backhovens H., Raeymaekers P., Van Hul W., Wehnert A., Gheuens J., Cras P., Bruyland M., Martin JJ., Salbaum M., Multhaup G., Masters CL., Beyreuther K., Gurling HMD., Mulian CL., Holland A., Barton A., Irving N., Williamson SJ., Richards SJ., Hardy JA.; Failure

of familial Alzheimer's disease to segregate with the A 4-amyloid gene in several European families, *Nature*, 1987, 329, 153-155

Van Nostrand WE., Wagner SL., Suzuki M., Choi BH., Farrow JS., Geddes JW., Cotman CW., Cunningham DD.; Protease nexin -II, a potent antichymotrypsin, shows identity to amyloid beta-protein precursor, *Nature*, 1989, 341, 546-549

Van Nostrand WE., Schamaier AH., Farrow JS., Cunningham DD.; Protease Nexin-II (Amyloid beta-protein precursor): a platelet alpha-granule protein, *Science*, 1990, 248, 745-748

Van Nostrand WE., Wagner S., Haan J., Bakker E., Roos RAC.; Alzheimer's disease and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type share a decrease in cerebrospinal fluid levels of amyloid β -protein precursor, *Ann Neurol*, 1992, 32, 215-218

Vereecken Th., Vogels JM., Nieuwenhuis R.; Neuron loss and shrinkage in the amygdala in Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging*, 1994, 15, 45-54

Vigo-Pelfrey C., Seubert P., Barbour R., Blomquist C., Lee M., Lee D., Coria F., Chang L., Miller B., Lieberberg I., Schenk D.; Elevation of microtubule-associated protein tau in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease, *Neurology*, 1995, 45, 788-793

Vinters HV., Pardridge WM.; The blood-brain-barrier in Alzheimer's disease, *Can J Neurol Sci*, 1986, 13, 446

Vinters HV., Pardridge WM., Yang J.; Immunohistochemical study of cerebral amyloid angiopathy: use of an antiserum to a synthetic 28-amino acid peptide fragment of the Alzheimer's disease amyloid precursor, *Hum Pathol*, 1988a, 19, 214-222

Vinters HV., Pardridge WM., Secor DL., Ishii N.; Immunohistochemical study of cerebral amyloid angiopathy, *Am J Pathol*, 1988b, 133, 150-162

Vinters HV.; Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease: two entities or one?, *J Neurol Sci*, 1992, 112, 1-3

Wang GP., Khatoun S., Iqbal K., Grundke-Iqbal I.; Brain ubiquitin is markedly elevated in Alzheimer disease, *Brain Res*, 1991, 566, 146-151

Warcham KA., Lyon MF., Glenister PH., Wilhams ED.; Age related reactivation of an X-linked gene, *Nature*, 1987, 327, 725-727

Wattendorff AR., Bots AM., Went LN., Enditz LJ.; Familial cerebral amyloid angiopathy presenting as recurrent cerebral haemorrhage, *J Neurol Sci*, 1982, 55, 121-135

Wattendorf AR., Frangione B., Luyendijk W., Bots G.; Hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis, Dutch type (HCHWA-D): *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 1995, 58, 699-705

Weidemann A., Konig G., Bunke D., Fischer P., Salbaum JM., Masters CL., Beyreuther K.; Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein, *Cell*, 1989, 57, 115-126

Weiss JH., Pike CJ., Cotman CW.; Ca²⁺ channel blockers attenuate β -amyloid peptide toxicity to cortical neurons in culture, *J Neurochem*, 1994, 62, 372-375

Wender M.; Epidemiologia otępienia starczego typu Alzheimer'a, XIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Neurologicznego, Warszawa, 1988,

West M., Coleman PD., Flood DG., Trocoso JC.; Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease, *Lancet*, 1994, 344, 769-772

Whitehouse P., Price DL., Clark AW., Coyle JT., DeLong MR.; Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis, *Ann Neurol*, 1981, 10, 122-126

Wilcock GK., Esiri MM.; Plaques, tangles and dementia, *J Neurol Sci*, 1982, 56, 343-356

Wilcock GK., Esiri MM., Bowen DM., Smith CCT.; Alzheimer's disease, *J Neurol Sci*, 1982, 57, 407-417

Wilcock E.; The temporal lobe dementia of Alzheimer's type, *Gerontology*, 1983, 29, 320-324

Wischik CM., Novak M., Edwards PC., Klug A., Tichelaar W., Crowther; Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988a, 85, 4884-4888

Wischik CM., Novak M., Thogersen HC., Edwards PC., Runswick MJ., Jakes R., Walker JE., Milstein C., Roth M., Klug A.; Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988b, 85, 4506-4510

Wiśniewski H., Johnson AB., Raine CS., Kay WJ., Terry RD.; Senile plaques and cerebral amyloidosis in aged dogs, *Lab Invest* 1970a, 23, 287-296

Wiśniewski HM., Terry RD., Hirano A.; Neurofibrillary pathology, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1970b, 29, 163-176

Wiśniewski HM., Sinatra RS., Iqbal K., Grundke-Iqbal I.; Neurofibrillary and synaptic pathology in the aged brain, *W: Aging and cell structure*, wyd. Johnson JE, Plenum Publishing Corporation, 1981, 105-141

Wiśniewski HM., Kozłowski PB.; Evidence for blood-brain-barrier changes in senile dementia of the Alzheimer type (SDAT), *Ann New York Acad Sci*, 1982, 119-129

Wiśniewski HM., Wen GY.; A comparative study on the substructures of neurofilaments and paired helical filaments from Alzheimer neurofibrillary tangles, *Ann New York Acad Sci*, 1985a, 455, 814-815

Wiśniewski HM., Wen GW.; High-resolution stereo electron microscopy of neurofilaments and Alzheimer type paired helical filaments, *Procc 43th Ann Meeting Electron Microscopy Soc Am*, wyd. Bailey GW, San Francisco, 1985b, 730-732

Wiśniewski HM., Wen GY, Wang KC., Iqbal K., Rubenstein R. W: *Metuzals J*, wyd.; *Electron microscopy and Alzheimer's disease*, San Francisco: San Francisco Press, 1986, 21-24.

Wiśniewski HM., Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Rubinstein R.; The solubility controversy of paired helical filaments: a commentary, *Neurochem Res*, 1987, 12, 93-95

Wiśniewski HM., Rabe A., Zigman W., Silverman W.; Neuropathological diagnosis of Alzheimer disease, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1989a, 48, 606-609

Wiśniewski HM., Wen GY., Kim KS.; Comparison of four staining methods on the detection of neuritic plaques, *Acta Neuropathol*, 1989b, 78, 22-27

Wiśniewski HM., Węgiel J., Wang KC., Kujawa M., Lach B.; Ultrastructural studies of the cells forming amyloid fibers in classical plaques, *Can J Neurol Sci*, 1989c, 16, 535-542

Wiśniewski HM., Iqbal K., Baner C., Miller D., Currie J.; Cytoskeletal protein pathology and the formation of beta-amyloid fibers in Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging*, 1989d, 44, 13-16

Wiśniewski HM., Vorbrodt AW., Węgiel J., Moryś J., Lossinsky A.; Ultrastructure of cells forming amyloid fibers in Alzheimer disease and scrapie, *Am J Med Genetics, Suppl.* 1990, 7, 287-297

Wiśniewski HM., Dymecki J., Węgiel J., Kulczycki J., Schmidt-Sidor B., Grundke-Iqbal I., Strojny P.; Neurofibrillary pathology in subacute sclerosing panencephalitis, *Dementia*, 1991a, 2, 133-141

Wiśniewski HM., Węgiel J.; Spatial relationship between astrocytes and classical plaque components, *Neurobiol Aging*, 1991b, 12, 593-600

Wiśniewski HM., Węgiel J., Lach B.; Ultrastructural studies of the cells forming amyloid in the cortical vessel wall in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol*, 1992, 84, 117-127

Wiśniewski HM., Węgiel J.; β -amyloid formation by myocytes of leptomeningeal vessels, *Acta Neuropathol*, 1994, 87, 233-241

Wiśniewski HM., Frąckowiak F., Mazur-Kolecka B.; In vitro production of β -amyloid in smooth muscle cells isolated from amyloid angiopathy-affected vessels, *Neurosci Lett*, 1995, 183, 120-123

Wiśniewski K., Jervis GA., Moretz RC., Wiśniewski HM.; Alzheimer neurofibrillary tangles in diseases other than senile and presenile dementia, *Ann Neurol*, 1979, 5, 288-294

Wiśniewski KE., Dalton AJ., Crapper MacLachlan DR., Wen GY, Wiśniewski HM.; Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies, *Neurology*, 1985, 35, 957-961

Wiśniewski T., Frangione B.; Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid, *Neurosci Lett*, 1992, 135, 235-238

Wiśniewski T., Lalowski M., Golobek A., Vogel T., Frangione B.; Is Alzheimer's disease an apolipoprotein E amyloidosis?, *Lancet*, 1995, 345, 956-957

Wolozin BL., Pruchnicki A., Dickson DW., Davies P.; A neuronal antigen in the brain of Alzheimer patients, *Science*, 1986, 232, 648-650

Wolozin B., Davies P.; Alzheimer related neuronal protein A68: specificity and distribution, *Ann Neurol*, 1987, 22, 521-526

Wood JG., Mirra SS., Pollock NJ., Binder LI.; Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule - associated protein tau, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83, 4040- 4043

Yamada T., Kondo A., Takamatsu J., Tateishi J., Goto I.; Apolipoprotein E mRNA in the brains of patients with Alzheimer's disease, *J Neurol Sci*, 1995, 129, 56-61

Yamaguchi H., Morimatsu M., Hirai S., Takahashi K.; Alzheimer's neurofibrillary tangles are penetrated by astroglial processes and appear eosinophilic in their final stages *Acta Neuropathol*, 1987, 72, 214-217

Yamaguchi H., Hirai S., Morimatsu M., Shoji M., Ihara Y.; A variety of cerebral amyloid deposits in the brains of the Alzheimer- type dementia demonstrated by beta protein immunostaining, *Acta Neuropathol*, 1988a, 76, 541-549

Yamaguchi H., Hirai S., Morimatsu M., Shoji M., Harigaya Y.; Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia, *Acta Neuropathol*, 1988b, 77, 113-119

Yamaguchi H., Hirai S., Morimatsu M., Shoji M., Nakazato Y.; Diffuse type of senile plaques in the cerebellum of Alzheimer-type dementia demonstrated by beta-protein immunostain, *Acta Neuropathol*, 1989a, 77, 314-319

Yamaguchi H., Nakazato Y., Hirai S., Shoji M., Harigaya Y.; Electron micrograph of diffuse plaques, initial stage of senile plaque formation in the Alzheimer brain, *Am J Pathol*, 1989b, 135, 593-597

Yamaguchi H., Nakazato Y., Hirai S., Shoji M.; Immunoelectron microscopic localization of amyloid beta- protein in the diffuse plaques of Alzheimer-type dementia, *Brain Res*, 1990, 508, 320-324

Yamaguchi H., Nakazato Y., Kawarabayashi T., Ishiguro K., Ihara Y., Morimatsu M., Hirai S.; Extracellular neurofibrillary tangles associated with degenerating neurites and neuropil threads in Alzheimer-type dementia, *Acta Neuropathol*, 1991a, 81, 603-609

Yamaguchi H., Nakazato Y., Shoji M., Okamoto K., Ihara Y., Morimatsu M., Hirai S.; Secondary deposition of beta amyloid within extracellular neurofibrillary tangles in Alzheimer-type dementia, *Am J Pathol*, 1991b, 138, 699-705

Yamamoto T., Hirano A.; A comparative study of modified Bielschowsky, Bodian and Thioflavin S stains on Alzheimer's neurofibrillary tangles, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1986, 12, 3-9

Yamazaki T., Yamaguchi H., Okamoto K., Hirai S.; Ultrastructural localization of argyrophilic substances in diffuse plaques of Alzheimer-type dementia demonstrated by methenamine silver staining, *Acta Neuropathol*, 1991, 81, 540-545

Yamazaki T., Yamaguchi H., Nakazato Y., Ishiguro K., Kawarabayashi T., Hirai S.; Ultrastructural characterization of cerebellar diffuse plaques in Alzheimer's disease, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1992, 51, 281-286

Yang F., Mak K., Vinters HV., Frautschy, Cole GM.; Monoclonal antibody to the C-terminus of β -amyloid, *NeuroReport*, 1994, 5, 2117-2120

Yanker BA., Dawes L., Fisher S., Villa-Komaroff L., Oster-Granite ML., Neve RL.; Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease, *Science*, 1989, 245, 417-420

Yanker B., Duffy LK., Kirschner DA.; Neurotrophic and neurotoxic effects of Amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides, *Science*, 1990, 250, 279-282

Yoshimura M., Yamanaouchi H., Kuzuhara S., Mori H., Sugiura S., Mizutami T., Shimada H., Tomonaga M., Toyokura Y.; Dementia in cerebral amyloid angiopathy: a clinicopathological study, *J Neurol*, 1992, 239, 441-450

Zain SB., Salim M., Chou WG., Sajdel-Sulkowska M., Majocha RE., Marotta CA.; Molecular cloning of amyloid cDNA derived from mRNA of the Alzheimer disease brain: Coding and noncoding regions of the fetal precursor mRNA are expressed in the cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85, 929-933

Zahn SS., Sandbrink R., Beyreuther K., Schmitt HP.; APP with Kunitz type protease inhibitor domain (KPI) correlates with neuritic plaque density but not with cortical synaptophysin immunoreactivity in Alzheimer's disease and non-demented aged subjects: a multifactorial analysis, *Clin Neuropath*, 1995, 14, 142-149

Zhao B., Sisodia SS., Kusiak JW.; Altered processing of mutant amyloid precursor protein in neuronal and endothelial cells, *J Neurosci Res*, 1995, 40, 261-268

Zimmermann K., Herget T., Salbaum JM., Schubert W., Hilbich C., Cramer M., Masters CL., Multhaup G., Kang J., Lemaire HG., Beyreuther K., Starzinski-Porwitz A.; Localization of the putative precursor of Alzheimer's disease - specific amyloid at nuclear envelopes of adult human muscle, *EMBO J*, 1988, 367-372

Zlokovic BV., Ghiso J., Mackie JB., McComb JG., Weiss MH., Frangione B.; Blood-brain barrier transport of circulating Alzheimer's amyloid β , *Bioch Biophys Res Comm*, 1993, 197, 1034-1040

Zubenko GS., Cohen BM., Boller F., Malinakova I., Keefe N., Chojnacki B.; Platelet membrane abnormality in Alzheimer's disease, *Ann Neurol*, 1987, 22, 237- 244