

Cichacz-Kwiatkowska Beata, Sekita-Krzak Joanna, Kot-Bakiera Katarzyna, Jodłowska-Jędrych Barbara, Wawryk-Gawda Ewelina. Choroba Alzheimer'a – rola badań immunohistochemicznych w diagnostyce choroby = Alzheimer's disease - the role of immunohistochemistry in the diagnosis of disease. Journal of Education, Health and Sport. 2016;6(2):122-137. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.45939>  
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/3380>  
<https://pbn.nauka.gov.pl/works/713623>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 755 (23.12.2015).  
755 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Author (s) 2016;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland

Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 01.01.2016. Revised 12.01.2016. Accepted: 31.01.2016.

## Choroba Alzheimer'a – rola badań immunohistochemicznych w diagnostyce choroby Alzheimer's disease - the role of immunohistochemistry in the diagnosis of disease

Beata Cichacz-Kwiatkowska<sup>1ABD</sup>, Joanna Sekita-Krzak<sup>1ABD</sup>,  
Katarzyna Kot-Bakiera<sup>1ABD</sup>, Barbara Jodłowska-Jędrych<sup>1ABD</sup>,  
Ewelina Wawryk-Gawda<sup>1ABD</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii z Pracownią Cytologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny, Lublin, Polska

### Authors' Contribution:

A Study Design

B Data Collection

C Statistical Analysis

D Manuscript Preparation

E Funds Collection

**Słowa kluczowe:** badania immunohistochemiczne, choroba Alzheimer'a, wewnątrzkomórkowe zwyrodnienia włóknkowe typu Alzheimer'a, białkowe prekursor amyloidu.

**Key words:** immunohistochemistry, Alzheimer's disease, neurofibrillary tangles, amyloid precursor protein.

**Glosariusz:** Choroba Alzheimer'a – najczęstsza postać otępienia, nieuleczalna i postępująca choroba neurodegeneracyjna, po raz pierwszy opisana w 1906 przez Alois Alzheimer [1]

**Glossary:** Alzheimer's disease (AD), also known as Alzheimer disease, the most common form of dementia, progressive neurodegenerative disease, first described by Alois Alzheimer in 1906 [1]

### Streszczenie

Choroba Alzheimer'a jest przewlekłą i postępującą chorobą neurodegeneracyjną, będącą zarazem najczęstszą przyczyną zespołu otępiennego. Skutki tej choroby dotyczą zarówno samego pacjenta i jego otoczenie, przybierając wymiar zarówno społeczny jak i ekonomiczny. Częstość

występowania otępienia towarzyszącego chorobie Alzheimera podwaja się co 4,5 roku u osób po 65. roku życia. U podłoża tego schorzenia leży zróżnicowana grupa zaburzeń związanych ze starzeniem się organizmu oraz interakcjami genetycznymi i środowiskowymi. Procesy neurodegeneracyjne obserwowane w przebiegu choroby Alzheimera prowadzą do upośledzenia morfologicznego i fizjologicznego neuronów oraz w konsekwencji ich śmierci. Doprowadza to bezpośrednio do upośledzenia kontroli poznawczej. W zmienionej patologicznie tkance nerwowej chorych stwierdzono obecność nieprawidłowych struktur, takich jak blaszki amyloidowe i zwyrodnienia włóknkowe (spłątki neurofibrilarnie). Sformułowano wiele hipotez starających się wyjaśnić procesy prowadzące do neurodegeneracji, najczęściej wymieniana jest teoria kaskady amyloidowej. Metody immunohistochemiczne pozwalają na wykrycie, zlokalizowanie i oznaczenie zmian neurodegeneracyjnych związanych z chorobą Alzheimera. Wykorzystywane są tutaj zarówno przeciwciała poli- jak i monoklonalne, a same badania charakteryzują się dużą czułością i swoistością.

## Summary

Alzheimer's disease is a chronic, progressive disease, which has been classified as a most frequent causes of dementia in the elderly population. The consequences of this disease affects the patient and his family and have a social and economic dimension. In the population over 65 years of age the incidence of dementias accompanying Alzheimer's disease doubles every 4.5 years. This disease is caused by a diverse group of genetic and environmental disorders associated with aging of the organism. Neurodegenerative processes seen during the Alzheimer's Disease result in impairment of neurons morphological and physiological functions causing their death. This leads directly to the impairment of patients cognitive functions. In the pathologically altered nerve tissue the presence of abnormal structures such as amyloid plaques and fibrillar degeneration (neurofibrillary tangles) is revealed. Many hypotheses have been formulated trying to explain the processes leading to neurodegeneration, and the most often mentioned is the amyloid cascade theory. Immunohistochemistry can detect, locate and mark the changes related to the Alzheimer's disease neurodegeneration. They are used here both poly- and monoclonal antibodies, and the same tests are highly sensitive and specific.

## Wprowadzenie

Choroba Alzheimera (*Alzheimer Disease*, AD) należy do najczęściej występujących chorób otępiennych [1,2]. W zależności od źródła dotyczy ona od 60% [3] do nawet 80% wszystkich przypadków tego rodzaju chorób [4]. Zgodnie z definicją prezentowaną przez WHO (ICD-10) otępienie to zespół objawów spowodowany przewlekłą lub postępującą chorobą mózgu, charakteryzujący się licznymi upośledzeniami funkcji poznawczych (pamięć, myślenie, orientacja, rozumienie, liczenie, język, uczenie się, ocenianie). Zaburzeniom tym często towarzyszą lub poprzedzają je nieprawidłowości w zakresie funkcji emocjonalnych (apatia, drażliwość, labilność emocjonalna) oraz zaburzenia zachowania i motywacji [5]. Osłabienie funkcji poznawczych z zaburzeniami kontroli i zmianami zachowania związane z AD stanowią nie tylko problem jednostkowy, dotyczący samego pacjenta, ale także problem dotyczący jego rodziny i najbliższego otoczenia. Skutki tej choroby negatywnie wpływają również na sferę społeczną i ekonomiczną, które związane są z życiem zawodowym i nakładami finansowymi przeznaczanymi na opiekę i leczenie [6]. Najistotniejszym czynnikiem ryzyka wystąpienia otępienia typu alzheimerskiego jest wiek [1]. Ryzyko to wzrasta szczególnie w przedziale pomiędzy 65 a 85 rokiem życia - wyniki badań epidemiologicznych wskazują, że częstość występowania AD podwaja się u osób powyżej 65 roku życia co 4,5 lat [7]. Ryzyko to dla osób w wieku 60 lat wynosi 1%, natomiast dla 80-latków szansa wystąpienia wynosi już około 20% i więcej [1, 8]. Szacuje się, że w krajach rozwiniętych AD występuje u 5%-7% osób po 65. roku życia, natomiast w Polsce dotyka ona 5,7%-10% populacji osób w podeszłym wieku [7]. Prognozy demograficzne zakładają wydłużanie się średniej długości życia i starzenie się społeczeństwa, szczególnie w krajach

uprzemysłowionych [1, 4], co oznacza zwiększenie ryzyka wystąpienia zaburzeń związanych z podeszłym wiekiem, w tym choroby Alzheimera [9]. Obecnie w Polsce na AD choruje około 250 tysięcy osób, a przewiduje się, że do 2020 roku zachoruje na nią od 500 tysięcy do około miliona osób [10, 11]. Najprawdopodobniej AD rozwija się przez wiele lat przed wystąpieniem objawów klinicznych. Przebieg choroby jest odmienny u różnych pacjentów. Czas przeżycia od momentu rozpoznania zależy od wieku wystąpienia zmian i jest zróżnicowany – u niektórych znaczne pogorszenie następuje w okresie 2-3 lat, natomiast w innych przypadkach choroba ma znacznie wolniejszy przebieg i może trwać nawet 10 lat [12]. Uważa się, że średni czas od postawienia diagnozy do śmierci wynosi około 8 lat dla pacjentów w wieku 65 lat [13]. Biorąc pod uwagę wiek zachorowania wyróżnia się dwa główne typy AD: o wczesnym początku (występującą < 65. roku życia, *early onset AD*, EOAD) oraz o późnym początku (występującą > 65. roku życia, *late onset AD*, LOAD). Natomiast klasyfikacja oparta na liczbie osób dotkniętych AD w rodzinie wyróżnia postać rodzinną AD (FAD, co najmniej 2 przypadki zachorowania w rodzinie) oraz postać sporadyczną AD (SAD, bez uwarunkowań rodzinnych) [2]. Ponadto większą zachorowalność obserwuje się u kobiet, związaną prawdopodobnie z udziałem estrogenów w rozwoju AD oraz ich dłuższą w porównaniu do mężczyzn długością życia [4, 13]. Do pierwszych objawów towarzyszących otępieniu w AD zaliczane są zaburzenia pamięci, w tym zapamiętywanie i uczenie się nowych informacji, czy trudności w przypominaniu sobie niedawnych zdarzeń [7]. Najprawdopodobniej związane jest to z uszkodzeniem przyśrodkowych struktur skroniowych, w tym hipokampa [12]. W tym stadium chorzy zaczynają wycofywać się z życia zawodowego i społecznego, często towarzyszy temu apatia. Stopniowo pacjenci stają się coraz bardziej zależni od otoczenia i w końcowym etapie choroby wymagają całodobowej opieki [7]. Początek AD jest bardzo trudny do uchwycenia, a większość diagnoz stawiana jest zbyt późno, zazwyczaj gdy zmiany neurodegeneracyjne są już rozległe. Szacuje się, że w Polsce właściwe rozpoznanie otępienia w przebiegu AD dotyczy około 15-20% pacjentów [6,7]. Natomiast 8-9% chorych otrzymuje adekwatną terapię [12]. AD jest chorobą nieuleczalną, a podejmowana terapia ma na celu złagodzenie objawów oraz zahamowanie i spowolnienie postępujących zmian. Dlatego też niezmiernie ważne jest odpowiednio wczesne rozpoznanie AD i podjęcie odpowiedniego leczenia.

### **Patogeneza i etiologia choroby Alzheimera**

U podłoża AD leżą stopniowe i nieodwracalne zmiany w mózgu polegające na zwyrodnieniu i obumieraniu neuronów. Towarzyszą temu zaburzenia szklaków

przekazywania sygnałów oraz powstawanie niefizjologicznych białek zdolnych do agregacji i odpornych na działanie enzymów. Neurodegeneracja rozpoczyna się w przyśrodkowych strukturach skroniowo-limbicznych (ciało migdałowe, hipokamp), a następnie obejmuje korę nową (skroniową, ciemieniową i czołową), jądra przodomózgowia i jądra podkorowe [14]. U pacjentów z AD stwierdza się obecność w tkance nerwowej zewnątrzkomórkowych blaszek amyloidowych (*amyloid plaques*, A $\beta$ ) i wewnątrzkomórkowych zwyrodnień włóknkowych typu Alzheimera (*neurofibrillary tangles*, *NFTs*), a także dystroficznych neurytów (*dystrophic neurites*, DN), nitek neuropilowych (*neuropil threads*), ciał Hirano oraz zwyrodnień ziarnisto-włóknkowych (*granulovacuolar degeneration*, GVD) [15,16]. Odkładanie się tych struktur w tkance nerwowej i w naczyniach mózgowych uruchamia szereg zmian patologicznych prowadzących do rozwoju otępienia.

Złogi amyloidowe mogą występować w trzech postaciach – jako blaszki klasyczne, dyfuzyjne i prymitywne. Klasyczna blaszka składa się z rdzenia utworzonego przez patologiczne białko  $\beta$ -amyloidu (A $\beta$ ). Peptyd ten składa się z 40-42 aminokwasów, a powstaje z białkowego prekursora amyloidu (*amyloid precursor protein*, APP). W wyniku proteolitycznego rozcinania łańcucha polipeptydowego APP przez enzymy określane jako sekretazy (głównie  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretazy) powstają peptydy A $\beta$ 40 i A $\beta$ 42, które składają się odpowiednio z 40 i 42 aminokwasów. Dłuższy peptyd, ze względu na znaczną hydrofobowość charakteryzuje się większą tendencją do tworzenia fibryli i uważany jest za główny czynnik odpowiedzialny za tworzenie złogów amyloidowych [17-19]. Rdzeń blaszki amyloidowej otoczony jest przez dystroficzne neuryty oraz komórki astrogleju i mikrogleju. Dystroficzne neuryty to grupa wypustek neuronalnych zawierających neurofilamenty, spiralnie skręcone włókna PHFs, zdegenerowane organelle komórkowe oraz ciała pochodzenia mitochondrialnego i liposomowego [15, 20]. Oprócz  $\beta$ -amyloidu w skład blaszek starczych wchodzi: apolipoproteina ApoE, białko Tau, ubikwityna,  $\alpha$ -1 antychymotrypsyna, acetylocholinoesteraza, białka układu dopełniacza i inne [21]. Blaszk starcze rozmieszczone są nierównomiernie w mózgu – najmniej jest ich w hipokampie, a najwięcej w korze potyliczno-czołowej [10]. Złogi amyloidowe odkładają się także w pobliżu naczyń krwionośnych, niekorzystnie wpływając w ten sposób na barierę krew-mózg [19]. Powstanie złogów amyloidowych prowadzi do aktywacji kaskad zapalnych, stresu oksydacyjnego, deregulacji metabolizmu wapnia, zaburzenia pracy mitochondriów oraz indukcji apoptozy neuronów. Powstałe w ten sposób zaburzenia równowagi w komórkach nerwowych przyczyniają się do nieprawidłowego metabolizmu APP i dalszej produkcji peptydów A $\beta$ . W dalszej perspektywie może to prowadzić do utraty neuronów i gęstości

synaptycznej oraz dystrofii neurytów [15, 22, 23]. W procesie proteolizy APP biorą udział białka transbłonowe – preseniliny (PS1 i PS2). Występują one przede wszystkim w komórkach nerwowych, gdzie mogą pełnić funkcje kanałów wapniowych lub receptorów błonowych. Sugeruje się, że PS1 może pełnić funkcję kofaktora  $\gamma$ -sekreazy lub działać jak ten enzym. Ponadto preseniliny powodują zwiększenie podatności na apoptozę [17, 24].

Wewnątrzkomórkowe zwyrodnienia włóknikowate typu Alzheimerera nazywane także splątkami neurofibrylarnymi (NFTs) utworzone są ze spiralnie skręconych włókien (paired helical filaments, PHFs) zawierających nadmiernie ufosforylowane białko tau. W warunkach fizjologicznych białko to odpowiada za stabilność i grupowanie się mikrotubul, co ma istotne znaczenie w stabilizacji struktury neuronów, transporcie wzdłuż aksonu, regulacji podziału komórki oraz w procesach apoptozy. Za stopień fosforylacji białka tau odpowiadają kinazy i fosfatazy, a w wyniku zaburzenia równowagi pomiędzy tymi enzymami dochodzi do hiperfosforylacji białka tau. Prowadzi to do zaburzeń stabilności cytoszkieletu oraz transportu aksonalnego. Zwykle prawidłowa cząsteczka białka tau posiada 2-3 grupy fosforanowe, natomiast występujące w AD hiperfosforylowane białko ma 8-10 takich grup [21, 25-28]. Wyróżniono trzy etapy tworzenia się NFTs: 1) Pre-NFTs (rozproszone NFTs) – rozproszone lub punktowe złogi białka tau w prawidłowo wyglądających neuronach; 2) dojrzałe NFTs (iNFTs) zawierające nitkowate agregaty białka tau, które wypierają jądro neuronu oraz 3) zewnątrzkomórkowe NFTs (eNFTs) leżące pozakomórkowo jako ślad po obumarłych komórkach nerwowych zawierających NFTs [15]. Splątki zlokalizowane są przede wszystkim w dużych neuronach piramidalnych kory wężowej, hipokampa, ciała migdałowatego oraz w neuronach niektórych jąder kresomózgowia i pnia mózgu. NFTs obok białka tau zawierają również inne białka, takie jak kinazę kazeiny II, czynnik wzrostu fibroblastów, ubikwitynę i inne [28]. Białko tau może także ulegać innym modyfikacjom potranslacyjnym, w tym acetylacji. Najnowsze doniesienia sugerują, że acetylacja lizyny K280 w białku tau występująca jedynie w zmienionych patologicznie tkankach może odgrywać rolę w rozwoju zmian neurodegeneracyjnych [29, 30]. Z włókien PHFs zbudowane są nitki neuropilowe. Gromadzą się one pomiędzy neuronami i towarzyszą blaszkom amyloidowym i NFTs [15]. Ciała Hirano oraz GVD spotykane są w neuronach piramidalnych hipokampa. Ich znaczenie i udział w neurodegeneracji jest niejasny, ale są częściej i w większej ilości występują u osób ze stwierdzoną AD [15, 31-32].

Zarówno blaszki amyloidowe, jak i NFTs nie są charakterystyczne wyłącznie dla AD. Spotykane są także w innych schorzeniach, a także towarzyszą tzw. starzeniu się fizjologicznemu. Do tej pory nie wykryto biomarkera specyficznego wyłącznie dla AD.

Chorobę tę diagnozuje się na podstawie oceny epidemiologicznej, neuropsychologicznej, elektroencefalograficznej oraz neuroobrazowania. Ponadto określa się wybrane wskaźniki biochemiczne i genetyczne [10].

Ze względu na złożoność procesów związanych z neurodegeneracją nie udało się do tej pory przedstawić jednoznacznego patomechanizmu odpowiedzialnego za rozwój choroby. Obecnie za najbardziej prawdopodobną hipotezę powstawania białek patologicznych uważana jest teoria kaskady amyloidowej. W myśl tej teorii odkładanie się w mózgu nierozpuszczalnych i odpornych na proteolizę złogów  $\beta$ -amyloidu jest początkowym procesem prowadzącym do zwyrodnienia włóknikowego i obumierania neuronów. Rola  $A\beta$  w patogenezie rodzinnej AD nie budzi wątpliwości, natomiast w przypadku sporadycznego AD udział złogów  $A\beta$  nie jest tak wyraźny [22]. Hipoteza cholinergiczna jako przyczynę rozwoju AD zakłada zaburzenia funkcji i zanik neuronów cholinergicznym w przodomózgowiu oraz zmniejszenie aktywności acetylotransferazy (ChAT) i acetylocholinesterazy (AChE) w mózгах chorych. AChE zaangażowana jest w tworzenie kompleksów z  $\beta$ -amyloidem i białkiem tau, przyczyniając się w ten sposób do powstawania patologicznych płytek starczych i zwyrodnień neurowłóknikowych [34]. U chorych obserwuje się zmniejszone uwalnianie acetylocholinyl oraz innych neuroprzekaźników, takich jak: kwas glutaminowy, serotonina oraz GABA. Współcześnie stosowana terapia lecznicza w AD opiera się na lekach będących inhibitorami cholinesteraz [35]. Niemniej jednak w patogenezie tej choroby postuluje się także udział innych czynników, takich jak stres oksydacyjny, procesy zapalne, zaburzenia pracy kanałów jonowych, nieprawidłowości w potranslacyjnej obróbce białek czy zaburzenia funkcji mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej [23, 36].

Pomimo intensywnych badań dokładna etiologia AD jest nieznana. Do rozwoju choroby przyczyniają się interakcje pomiędzy czynnikami genetycznymi a środowiskiem oraz naturalny proces starzenia. Wydaje się, że dużą rolę w rozwoju AD pełni także styl życia, w tym dieta, aktywność fizyczna czy nałogi takie jak niktynizm [9]. Ponadto zaobserwowano, że obecność cukrzycy typu II zwiększa ryzyko wystąpienia AD prawie dwukrotnie [9, 37]. W przypadku 80-90% pacjentów brak jest możliwości ustalenia jednoznacznej etiologii choroby. Natomiast u około 10-20% choroba ta dziedziczona jest autosomalnie dominująco. W przypadku rodzin osób z AD ryzyko zachorowania wśród krewnych pierwszego stopnia wynosi od 10 do nawet 50 % [38]. Zaburzenia genetyczne są drugim po wieku czynnikiem ryzyka AD. W przypadku AD o wczesnym początku zidentyfikowano mutacje trzech genów, które prowadzą do rozwoju tej choroby. Są to zmiany w obrębie genów: APP, kodującego

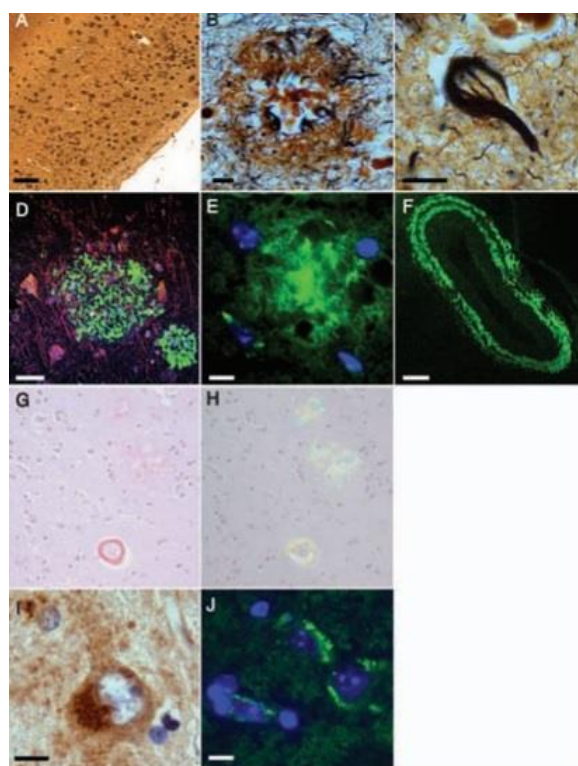
białko prekursorowe amyloidu, PSEN1, kodującego presenilinę 1 oraz PSEN2, kodującego presenilinę 2. Mutacje te prowadzą do zwiększenia powstawania  $\beta$ -amyloidu [38, 39]. W AD o późnym przebiegu wykryto i udowodniono dotychczas jeden genetyczny czynnik ryzyka, a mianowicie obecność wariantu  $\epsilon$ -4 genu kodującego apolipoproteinę E (APOE). Obecność allelu  $\epsilon$ -4 nie jest warunkiem wystarczającym, ani koniecznym do ujawnienia się choroby, ale powoduje obniżenie się wieku zachorowania [38, 39].

### **Badania immunohistochemiczne w chorobie Alzheimera**

Większość badań dokumentujących obecność zmian neurodegeneracyjnych (A $\beta$ , NFTs i inne) w mózgach osób chorych na AD opartych jest o metody immunohistochemiczne [40]. U podstaw tych technik leży zjawisko wiązania antygeny przez swoiste i charakterystyczne przeciwciała. Takie wiązanie cechuje wysoka specyficzność, ponieważ cząsteczka przeciwciała rozpoznaje i wiąże antygen o ściśle określonej strukturze przestrzennej. W celu uwidocznienia miejsca wiązania przeciwciała z antygenem wykorzystuje się znakowanie przeciwciał fluorochromami, enzymami lub metalami. Reakcje immunohistochemiczne mogą być bezpośrednie i pośrednie. Najczęściej stosowanym typem są metody pośrednie, które polegają na stosowaniu nieznakowanego, pierwszorzędowego przeciwciała wykrywającego interesujący badacza antygen, a w następnej kolejności znakowanego przeciwciała drugorzędowego, które umożliwia wizualizację poszukiwanego kompleksu antygen-przeciwciała. Ważnym elementem badania jest przygotowanie próbki do analizy mikroskopowej, które obejmuje utrwalanie, odwadnianie oraz zatapianie. Na tym etapie bardzo ważne jest aby wstępne przygotowanie nie zaburzyło wewnętrznej struktury badanej tkanki, w tym struktury samego antygeny. Pomimo tego, że reakcje immunohistochemiczne wykazują znaczną swoistość, niezbędne jest wykonanie prób kontrolnych negatywnych i pozytywnych, które będą świadczyć o wiarygodności uzyskanych wyników.

W badaniach naukowych dotyczących AD, a także w diagnostyce neuropatologicznej wykorzystuje się metody immunohistochemiczne z zastosowaniem szeregu przeciwciał poli- i monoklonalnych swoistych dla  $\beta$ -amyloidu, białka Tau oraz ubikwityny i neurofilamentów [15, 24]. Narodowy Instytut Starzenia się (*National Institute on Aging*) oraz Towarzystwo Alzheimerowskie (*Alzheimer's Association*) sugerują także wykorzystanie tioflawiny S oraz czulego barwienia z wykorzystaniem srebra (m.in. zmodyfikowaną metodą Bielschowsky) [24]. Tioflawina S jest barwnikiem fluorescencyjnym z powodzeniem wykorzystywanym do wykrywania blaszek amyloidowych zarówno w badaniach *in vivo*, jak *in vitro*. Ponadto wiąże

się ona także z NFTs . Wykrywane w ten sposób struktury wykazują charakterystyczne zielono-żółte świecenie w mikroskopie fluorescencyjnym. Oprócz tioflawiny S często wykorzystywanym barwnikiem jest także czerwień Kongo, która daje jaskrawo-zielone świecenie w świetle spolaryzowanym. Z kolei stosowanie soli srebra w celu wizualizacji struktur białkowych jest jedną z najpopularniejszych metod barwienia, co wynika z ich wysokiej czułości, łatwości wykonania i niskiego kosztu odczynników [16]. Stosowanie standardowych barwień w połączeniu z metodami immunohistochemicznymi pozwala na potwierdzenie uzyskanych wyników i ich ocenę.



Rycina 1. Zmiany zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe w chorobie Alzheimera [41].

A-C Barwienie srebrem zmodyfikowaną metodą Bielschowsky A – kora skroniowa (skala 200  $\mu\text{m}$ ) B – blaszki amyloidowe zabarwione na brązowo i ciemne dystroficzne neuryty oraz NFTs (skala 10 $\mu\text{m}$ ) C- NFTs (skala 10 $\mu\text{m}$ );

D-F – Metoda immunohistochemiczna z obróbką wstępną kwasem mrówkowym i wykorzystaniem przeciwciał anti-A $\beta$ 42 i AT8 D – blaszki amyloidowe (zielone) oraz hiperfosorylowane białko tau (czerwone). Jądra komórkowe widoczne są w kolorze niebieskim (skala 30  $\mu\text{m}$ ); E – Blaszkamyloidowe w mózgu transgenicznych myszy (zielony) (skala 10  $\mu\text{m}$ ) F – Amyloid odkładający się wzdłuż naczyń krwionośnych (kolor zielony) (skala 150  $\mu\text{m}$ )

G-H Klasyczne barwienie z wykorzystaniem czerwieni Kongo: G – blaszki amyloidowe widziane w świetle białym (kolor czerwony) H – oraz w świetle spolaryzowanym (kolor jasnozielony);

I-J Wewnątrzkomórkowy amyloid widoczny u ludzi (I) oraz myszy transgenicznych (J) (skala 10 $\mu\text{m}$ )



Do wykrywania NFTs w preparatach histopatologicznych wykorzystywane są: srebrzenie metodą Gallyasa, technika fluorescencyjna z wykorzystaniem tioflawiny S, która rozpoznaje strukturę  $\beta$ -harmonijki oraz metody immunochemiczne wykorzystujące przeciwciała skierowane przeciwko białku tau i jego ufosforylowanej formie (tabela 1.) [15].

Tabela 1. Przeciwciała wykorzystywane w immunohistochemicznych metodach wykrywania zwyrodnień włóknkowych NFTs. [25, 29, 30]

Przeciwciało	Antygen
Tau-C3	Białko tau D <sup>421</sup>
T46.1	Białko tau aminokwasy C-końcowe (428–441)
Tau 12	Białko tau aminokwasy N-końcowe (9–18)
HT7	Białko tau aminokwasy 159-161
12E8	Hiperfosforylowane białko tau w Ser <sup>262</sup> , Ser <sup>356</sup>
AT100	Hiperfosforylowane białko tau w Thr <sup>212</sup> , Ser <sup>214</sup>
AT8	Hiperfosforylowane białko tau w Ser <sup>199–202</sup> – Thr <sup>205</sup>
PHF-1	Hiperfosforylowane białko tau w Ser <sup>396–404</sup>
RD4	Białko tau aminokwasy 275–291
MC1	Białko tau aminokwasy 5–15;312–322
Alz 50	Białko tau aminokwasy 5–15;312–322
5A6	Białko tau aminokwasy 19-46

Zarówno wykorzystanie srebra, jak i tioflawiny S oraz niektórych przeciwciał anty-tau, takich jak AT8 oraz PHF1 pozwalają na identyfikację iNFTs oraz eNFTs . Natomiast preNFTs mogą zostać uwidocznione przy wykorzystaniu przeciwciał MC1 i Alz50. Sugeruje to, że zmiana konformacyjna w cząsteczce białka tau i jego fosforylacja stanowią wczesny etap agregacji [15]. Badania z użyciem przeciwciała TOC1 wskazują, że działanie neurodegeneracyjne wykazują nie tylko NFTs, także oligomery tau. Przeciwciało to selektywnie rozpoznaje dimery i oligomery tau [42]. Z kolei w badaniach poświęconych wykrywaniu zmodyfikowanego w wyniku acetylacji białka tau wykorzystywane jest przeciwciało Ac-K280 [30, 43].

Błazki amyloidowe wykrywane są podobnie jak NFTs poprzez wykorzystanie tioflawiny S lub czerwieni Kongo, barwienia srebrem oraz przeciwciał mono- i poliklonalnych (tabela 2.) [15].

Tabela 2. Przeciwciała wykorzystywane w immunohistochemicznych metodach wykrywania złogów amyloidowych [40, 44]

<b>Przeciwciało</b>	<b>Antygen</b>
Amyloid $\beta$ (N) 82E1	Rozpoznaje reszty aminokwasowe 1-16
Amyloid $\beta$ 6E10	Rozpoznaje reszty aminokwasowe N-końcowe 1-16 Epitop: aminokwasy 4-9
Amyloid $\beta$ 6F/3D	Rozpoznaje reszty aminokwasowe 8-17 Epitop aminokwasy 10-15
Amyloid $\beta$ 4G8	Rozpoznaje reszty aminokwasowe 18-22 Epitop aminokwasy 18-22
Amyloid $\beta$ 9F1	Rozpoznaje reszty aminokwasowe C-końcowe 34-39
Amyloid $\beta$ 40 MBC40	Reaguje z resztami aminokwasowymi 32-40
Amyloid $\beta$ 42 MBC42	Reaguje z resztami aminokwasowymi 37-42
Amyloid $\beta$ 42 12F4	Reaguje z resztami aminokwasowymi 36-42
Amyloid prekursor protein A4 22C11	Rozpoznaje aminokwasy 66-81 N-końcowego fragmentu pre-A4
Amyloid prekursor protein C-terminal	Rozpoznaje C-końcowy fragment APP 751-770

Niektóre sekwencje aminokwasowe są wspólne zarówno dla  $A\beta$  jak i APP. Przeciwciało anti-  $A\beta$  6E10, które jest specyficzne dla sekwencji aminokwasowej 4-13  $A\beta$ , rozpoznaje nie tylko  $A\beta$ , ale także APP. Podobnie przeciwciało 4G8 skierowane przeciw środkowej części łańcucha  $A\beta$  (18-22) reaguje zarówno z  $A\beta$  jak i APP. Metody z wykorzystaniem tych przeciwciał pozwalają na wykrycie zarówno APP, różnych pochodnych APP oraz  $A\beta$ . W celu odróżnienia  $A\beta$  od APP wykorzystywane są przeciwciała skierowane przeciwko C-końcowi łańcucha  $A\beta$ . Na ogół w badaniach immunohistochemicznych w celu obróbki wstępnej materiału i umożliwienia wykrycia  $A\beta$  stosuje się kwas mrówkowy, który powoduje zmiany strukturalne w obrębie  $A\beta$ . Verwey i wsp. zaproponowali dwa nowe przeciwciała monoklonalne VU-17 oraz IC16, których wykorzystanie w badaniu z pominięciem obróbki wstępnej daje porównywalne rezultaty ze standardowymi metodami z wykorzystaniem przeciwciał 4G8 i 6F/3D [45].

Wykorzystanie metod immunohistochemicznych w badaniu zmian neurodegeneracyjnych w AD pozwala nie tylko na identyfikację i ocenę choroby, ale także pomaga w zrozumieniu jej patomechanizmów.

### **Podsumowanie**

Leczenie AD opiera się przede wszystkim na spowolnieniu jej postępów i złagodzeniu towarzyszących jej objawów. Pomimo stosowania wielu bardzo różnych modeli badawczych do tej pory nie udało się uzyskać terapii o wysokiej skuteczności. Podobnie wiele aspektów dotyczących samego procesu neurodegeneracyjnego pozostaje niejasnych. Intensywne badania nad przyczynami AD z wykorzystaniem coraz bardziej zaawansowanych metod (w tym immunohistochemicznych) budzą nadzieję nie tylko na wykrycie swoistego dla tej choroby biomarkera, ale także sposobów na wczesną diagnozę przed wystąpieniem objawów klinicznych. Badania immunohistochemiczne zmian patologicznych występujących w mózgu osób dotkniętych AD z wykorzystaniem coraz to nowszych i coraz bardziej specyficznych przeciwciał dają możliwość na lepsze poznanie patomechanizmu AD i rozwianie istniejących wątpliwości.

## Literatura

1. Thies W., Bleiler L., *Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures.* *Alzheimers Dement* 2011; 7: 208-44.
2. Mayeux R., Stern Y., *Epidemiology of Alzheimer disease.* *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012, 2(8): 1-18.
3. Povova J., Ambroz P., Bar M., Pavukova V., Sery O., Tomaskova H., Janout V., *Epidemiological of and risk factors for Alzheimer's disease: A review.* *Biomedical Papers* 2012, 156(2): 108-114.
4. Yaffe K., Middleton L. E., Lui L. Y., Spira A. P., Stone, K., Racine, C., Kramer J. H., *Mild cognitive impairment, dementia, and their subtypes in oldest old women.* *Archives of neurology* 2012, 68(5): 631-636.
5. World Health Organization. *Dementia: a public health priority.* World Health Organization, 2012: 8-9.
6. Babiarczyk B., Sternal D., *Zastosowanie opieki paliatywnej u chorych w zaawansowanym stadium otępienia.* *Gerontologia Polska* 2012, 20(2): 39-44.
7. Polskie Towarzystwo Alzheimerowskie. *Sytuacja osób chorych na Alzheimerera.* Raport RPO. 2014: 8-9.
8. Fąfara A., Ciesielska N., Damiza A., Chatys Ż., Bentryn D., Gajos A., Sokołowski R. *Comorbidities disorders and Alzheimer's disease.* *Journal of Health Sciences* 2014, 4(6): 57-70.
9. Dudkowiak R., *Rola wybranych czynników ryzyka w etiopatogenezie i przebiegu choroby Alzheimerera.* *Aktualności Neurologiczne* 2013, 13(2): 109-118.
10. Leszek J., *Choroba Alzheimerera: obecny stan wiedzy, perspektywy terapeutyczne.* *Polski Przegląd Neurologiczny* 2012, 8(3): 101-106.
11. Rachel W., Datka W., Zyss T., Zięba A., *Wpływ sprawowania długotrwałej opieki na stan zdrowia opiekunów pacjentów z otępieniem w chorobie Alzheimerera.* *Przegląd Lekarski* 2014, 71 (12): 703-706
12. Rachel W., Grela A., Zyss T., Zięba A., Piekoszewski W. *Biomarkery choroby Alzheimerera,* *Przegląd Lekarski* 2014, 71 (2): 98-101
13. Opala G., *Epidemiologia otępień w perspektywie prognoz demograficznych.* [W]: Leszek J.(red.): *Choroby otępienne. Teoria i praktyka.* Wydawnictwo Continuo, Wrocław.

14. Nelson P. T., Alafuzoff I., Bigio E. H., Bouras C., Braak H., Cairns N. J., Beach T. G., *Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature*. Journal of neuropathology and experimental neurology 2012, 71(5): 1-32.
15. Serrano-Pozo A., Frosch M. P., Masliah E., Hyman B. T., *Neuropathological alterations in Alzheimer disease*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2011, 1(1): 1-23
16. Braak H., Thal D. R., Ghebremedhin E., Del Tredici, K., *Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years*. Journal of Neuropathology Experimental Neurology 2011, 70(11): 960-969.
17. De Strooper B., Iwatsubo, T., Wolfe M. S., *Presenilins and  $\gamma$ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer disease*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2012, 2(1): 1-20
18. Haass C., Kaether C., Thinakaran G., Sisodia S., *Trafficking and proteolytic processing of APP*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2012, 2(5): 1-25.
19. Masters C. L., Selkoe, D. J., *Biochemistry of amyloid  $\beta$ -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2012, 2(6): 1-25.
20. Nixon R. A., Yang D. S., *Autophagy failure in Alzheimer's disease—locating the primary defect*. Neurobiology of disease 2011, 43(1): 38-45.
21. Szwed A., Miłowska K., *Rola białek w chorobach neurodegeneracyjnych*. Advances in Hygiene Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej 2012, 66: 187-195.
22. Karran E., Mercken M., De Strooper B., *The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics*. Nature Reviews Drug Discovery 2011, 10(9): 698-712.
23. Wyss-Coray T., Rogers, J. (2012). *Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2012, 2(1): 1-23.
24. Hyman B. T., Phelps C. H., Beach T. G., Bigio E. H., Cairns N. J., Carrillo M. C., Montine, T. J., *National Institute on Aging–Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease*. Alzheimer's Dementia 2012, 8(1): 1-13.
25. Hu X., Li X., Zhao M., Gottesdiener, A., Luo, W., Paul, S., *Tau pathogenesis is promoted by  $A\beta$ 1-42 but not  $A\beta$ 1-40*. Molecular neurodegeneration 2014, 9(1): 1-11.
26. de Calignon A., Polydoro M., Suárez-Calvet M., William C., Adamowicz D. H., Kopeikina K. J., Hyman, B. T., *Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease*. Neuron 2012, 73(4): 685-697.

27. Kolarova M., García-Sierra F., Bartos A., Ricny J., Ripova D., *Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease*. International journal of Alzheimer's disease 2012, 2012: 1-13.
28. Wolfe M. S. *The role of tau in neurodegenerative diseases and its potential as a therapeutic target*. Scientifica 2012, 2012: 1-20.
29. Cohen T. J., Guo J. L., Hurtado D. E., Kwong L. K., Mills I. P., Trojanowski J. Q., Lee V. M., *The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation*. Nature Communications 2011, 2, 252.
30. Irwin D. J., Cohen T. J., Grossman M., Arnold S. E., Xie S. X., Lee V. M. Y., Trojanowski J. Q., *Acetylated tau, a novel pathological signature in Alzheimer's disease and other tauopathies*. Brain 2012, 135(3): 807-818.
31. Funk K. E., Mrak R. E., Kuret J., *Granulovacuolar degeneration (GVD) bodies of Alzheimer's disease (AD) resemble late-stage autophagic organelles*. Neuropathology and applied neurobiology 2011, 37(3): 295-306.
32. Castellani R., Perry G., *Molecular Pathology of Alzheimer's Disease*. San Mateo California Morgan and Claypool. 2014.
33. Griffin P., Furukawa R., Piggott C., Maselli A., Fechtner M., *Requirements for Hirano body formation*. Eukaryotic cell 2014, 13(5): 625-634.
34. Contestabile A., *The history of the cholinergic hypothesis*. Behav. Brain Res 2011, 221: 334-340.
35. Martorana A., Esposito Z., Koch G., *Beyond the cholinergic hypothesis: do current drugs work in Alzheimer's disease?* CNS Neurosci. Ther 2010. 16: 235-245.
36. Carmo Carreiras M., Mendes E., Jesus Perry M., Paula Francisco A., Marco-Contelles, J., *The multifactorial nature of Alzheimer's disease for developing potential therapeutics*. Curr Topics Med Chem 2013; 13: 1745–1770.
37. Vagelatos N. T., Eslick G. D., *Type 2 diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: the confounders, interactions, and neuropathology associated with this relationship*. Epidemiologic reviews 2013, 35: 1-9.
38. Vilatela M. E. A., López-López M., Yescas-Gómez P., *Genetics of Alzheimer's disease*. Archives of medical research 2012, 43(8), 622-631.
39. Tanzi R. E., *The genetics of Alzheimer disease*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2012, 2(10): 1-11.

40. Aho L., Pikkarainen M., Hiltunen M., Leinonen V., Alafuzoff I., *Immunohistochemical visualization of amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta in extra-and intracellular compartments in the human brain*. Journal of Alzheimer's disease 2009, 20(4): 1015-1028.
41. Tam J. H., Pasternak S. H., *Amyloid and Alzheimer's disease: inside and out*. The Canadian Journal of Neurological Sciences 2012, 39(03): 286-298.
42. Ward S. M., Himmelstein D. S., Lancia J. K., Binder L. I. *Tau oligomers and tau toxicity in neurodegenerative disease*. Biochemical Society Transactions 2012, 40(4), 667 - 671.
43. Min, S. W., Chen X., Tracy T. E., Li Y., Zhou Y., Wang C. i wsp., *Critical role of acetylation in tau-mediated neurodegeneration and cognitive deficits*. Nature medicine 2015, 21: 1154–1162.
44. Perchiacca J. M., Ladiwala A. R. A., Bhattacharya M., Tessier P. M., *Structure-based design of conformation-and sequence-specific antibodies against amyloid  $\beta$* . Proceedings of the National Academy of Sciences 2012, 109(1): 84-89.
45. Verwey N. A., Hoozemans J. J., Korth C., van Royen M. R., Prikulis I., Wouters D., Veerhuis R., *Immunohistochemical characterization of novel monoclonal antibodies against the N-terminus of amyloid  $\beta$ -peptide*. Amyloid 2013, 20(3):179-187.