

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БЕТА-АМИЛОИДОЗОВ МОЗГА У ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ

К.М.КОЗЫРЕВ

Кафедра патологической анатомии Северо-Осетинской государственной медицинской академии, Владикавказ, 187020, ул. Пушкинская, 42

С.П.СЯТКИН, Т.Т.БЕРЕЗОВ

Кафедра биохимии РУДН, Москва, 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.8,
Медицинский факультет

Впервые дана оценка патогенетического значения отдельных факторов среды обитания в возникновении и прогрессировании бета амилоидозов мозга (болезнь Альцгеймера, сенильная деменция) у долгожителей различных климатических районов Республики Северная Осетия-Алания.

Предложены новые изоферментные тесты сыворотки крови – определение ВВ-изозима креатинкиназы и величин трансаминазной активности в спинномозговой жидкости, которые могут быть использованы в качестве потенциальных маркеров в биохимической диагностике болезни Альцгеймера. Они могут дать ценную информацию как о степени морфологических повреждений клеток мозга при болезни Альцгеймера, так и служить основой для дифференциальной диагностики разных деменций, при которых отсутствуют или слабо выражены дистрофические изменения клеток ЦНС.

Ключевые слова: бета амилоидозы, ВВ-изоферменты креатинкиназы, трансаминаза.

Отложение белка амилоида в виде амилоидных фибрилл в ткани и сосуды мозга являются одним из основных морфологических признаков болезни Альцгеймера, сенильной деменции и синдрома Дауна [3,12,13]. В 1992 г. амилоид бета, ранее считавшийся патологическим, был обнаружен в растворимой форме в плазме крови и спинномозговой жидкости не только больных, но и здоровых людей, а также в культуральных средах ряда клеточных линий [11,14,20].

До сих пор отсутствуют сведения об особенностях старческого амилоидоза среди различных этнических групп людей, населяющих Российскую Федерацию в контексте религиозных различий этиопатогенетических аспектов этой патологии. Нет обобщенного морфобиохимического и клинического материала об особенностях течения различных форм сенильных амилоидных висцеропатий, в частности, бета амилоидозов мозга (болезнь Альцгеймера, сенильная деменция). Имеющиеся представления о патогенезе старческого амилоидоза крайне разноречивы и в основном сводятся к концепции мутационных изменений генетического аппарата клеток [4,15], синтезирующих фибриллярные белки амилоида.

В последнее время возраст и наследственность [16-18] приводятся в качестве главных факторов риска в возникновении и прогрессировании болезни Альцгеймера и нигде не упоминается об антропогенных факторах риска среды обитания в развитии данной патологии. Не отражены в доступной литературе данные об особенностях старческого амилоидоза у долгожителей, не определена его роль в группе старческих полипатий. Существующие методы прижизненной диагностики данной патологии недостаточно эффективны и, несмотря на серьезные успехи в изучении клиники различных форм сенильного амилоидоза, они, к сожалению, диагностируются только постмортально [2].

Только отсутствием единой мультидисциплинарной стратегии в изучении старческого амилоидоза можно объяснить малую эффективность его лечения.

Все эти данные: сложность и противоречивость вопросов патогенеза, многообразие висцеральных проявлений, трудность диагностики, малая эффективность терапии, прогрессирующий рост частоты болезни Альцгеймера и сенильной деменции обуславливают актуальность проблемы старческого амилоидоза и необходимость комплексного его изучения. Актуальность нейродегенеративных заболеваний вообще, и болезни Альцгеймера в частности, заключается также в их социально-экономической значимости. Достигнутые успехи на этом пути будут способствовать увеличению продолжительности жизни и повышению уровня здоровья населения.

Цель работы – оценка патогенетического значения отдельных факторов обитания в возникновении церебрального амилоидоза у долгожителей различных климатических районов Республики Северная Осетия – Алания (PCO-Алания).

Методика исследования

1. Морфологические методы

Объектом исследования служил головной мозг 46 долгожителей обоего пола (21М и 25Ж) в возрасте 90-115 лет, из которых 23 (8М и 15Ж) долгожители проживали в высокогорных районах и 23 (13М и 10Ж) – на равнинной плоскости (табл.1).

Таблица 1

Частота сенильного церебрального амилоидоза у долгожителей различных климатических районов PCO-Алания в зависимости от характера патологии

ДЖ	Группы наблюдений										Всего	
	I		II		III		IV		V			
Количество наблюдений	6		4		16		10		10		46	
	М	Ж	М	Ж	М	Ж	М	Ж	М	Ж	М	Ж
Горные районы	2		-		5		8		8		23	
	1	1	-	-	1	4	4	4	2	6	8	15
Равнинные районы	4		4		11		2		2		23	
	2	2	2	2	7	4	1	1	1	1	13	10

Примечание I. Сенильная деменция.

II. Болезнь Альцгеймера.

III. Сочетание сенильного процесса с сосудистым.

IV. Психически здоровые лица с выраженной соматической патологией.

V. Психически здоровые лица без выраженной соматической патологии.

Каждое секционное наблюдение подвергалось тщательному макро- и микроскопическому изучению. Кроме головного мозга на предмет старческого амилоидоза исследовались легкие, сердце, аорта, язык, поджелудочная железа, печень, селезенка, почки, надпочечники, прямая кишка.

Для решения поставленных вопросов были применены следующие морфологические методы исследования: окраска гематоксилин-эозином; для выявления астроцитов были использованы комплексная методика Снесарева и золото-сулемовая проба Калаха; метод Бильшовского и его модификация, предложенная Белецким, были применены для окраски нейрофибрилл; состояние микроциркуляторного русла и капиллярное кровенаполнение изучались по методу Бочерикова; по Браше идентифицировали РНК; окраска на липиды и миелин осуществлялись по Лизону.

За последнее время наиболее специфичной и приоритетной окраской на амилоид все же считается красный конго в сочетании с поляризационной микроскопией. Для этой же цели были применены люминесцентно-гистохимические методы [18] с использованием флюорохромов тиофлавина-Т и тиазинового красного. Амилоид, окрашенный тиазиновым красным, как правило, светится оранжево-красным цветом на светло-зеленом фоне в отличие от золотой аутофлюоресценции липофуксина, что значительно облегчает их идентификацию. Водный раствор тиазинового красного в разных концентрациях позволяет выявить даже самые незначительные отложения амилоида в тканях на светооптическом уровне. Кислые гликозаминогликаны обладают способностью связывать различные флюорохромы, в частности тиофлавины S и T [10], на чем, собственно, и основан наиболее тонкий метод выявления амилоида.

Выявление сенильных бляшек и других форм отложений амилоида, а также микроглии, производилось по методике Мийагава-Алексанжровской. Известно, что в ультрафиолетовых лучах красный конго дает оранжево-желтую люминисценцию и это свойство нередко используется для идентификации амилоида [4,19,21].

Для количественной оценки распространенности патологического процесса по отношению ко всему органу применялись методы с использованием специальных планиметрических сеток-линеек [1]. Материал изучался под микроскопом МБИ-1 с люминисцентной приставкой ОИ-17 (ЛОМО), а также в поляризационном и люминисцентном микроскопе FM-200-B фирмы "Tiyoda". Кроме этого, в наших исследованиях был применен количественный метод [1] оценки амилоид-положительных структур с использованием фотометрической насадки ФМЭЛ-1А с блоком УБЦВ-1 и усилителем У-57.

2. Биохимические методы

Концентрацию ВВ-изозима креатинкиназы в сыворотке крови определяли методом электрофореза у 20 больных болезнью Альцгеймера и у 11 пациентов с другими синдромами деменции, включая фронтальную лобную дегенерацию (6 больных), цереброваскулярную деменцию (3), не установленную деменцию (2) и у 17 здоровых лиц.

Трансаминазную активность в спинномозговой жидкости определяли методом электрофореза и спектрофотометрически у 17 больных долгожителей высокогорья (возраст 80-100 лет), 10 больных плоскогорья (75-85 лет) и 10 здоровых лиц (70-80 лет, добровольцы).

Результаты исследования

Установлено, что при макроскопическом исследовании средняя масса мозга у долгожителей высокогорных районов колебалась в пределах 1300-1350 г, у долгожителей равнинной плоскости – в пределах 1000-1050 г. Из 46 (21М и 25Ж) умерших старожилков болезнь Альцгеймера была диагностирована лишь в 4 (2М и 2Ж) случаях и все они относились к жителям равнинной плоскости. Сенильная деменция в чистом виде идентифицирована у 6 (3М и 3Ж) умерших, из которых 2 (М и Ж) – проживали в горах, и 4 (2М и 2Ж) – в густонаселенной равнинной плоскости. Сочетание сенильного процесса с сосудистым отмечено в 16 секционных случаях (8М и 8Ж), 5 (М и 4Ж) из которых представляли долгожителей высокогорья и 11 (7М и 4Ж) – равнинной плоскости.

Из 46 долгожителей, 10 (5М и 5Ж) были представлены психически здоровыми лицами с соматической патологией, 8 (4М и 4Ж) из которых проживали в альпийской зоне и 2 (М и Ж) – на равнинной плоскости. И, наконец, 10 (3М и 7Ж) старожилков, умерших естественной смертью в возрасте 95-115 лет составили уникальную группу, из которой 8 (2М и 6Ж) относились к жителям высокогорных районов и 2 (М и Ж) – к жителям густонаселенных районов РСФСР – Алания. Результаты макроскопического исследования упомянутых 8 наблюдений долгожителей позволили констатировать лишь незначительную атрофию извилин и расширение борозд мозга при его средней массе 1350 г.

Микроскопически выявлено множество сохранных нейронов, умеренное количество сенильных бляшек (10-12 в поле зрения) и зерен липофусцина в отделах мозга, ответственных за высшие проявления интеллекта (поля 47, 9, 12, 11 лобного полюса). У 2 других долгожителей, проживавших на равнине, выявлена внутренняя водянка мозга при его средней массе 1100 г. Патоморфологически на фоне единичных сохранных нейронов количество старческих бляшек доходило до 15-20 в поле зрения с хорошо выраженной золотистой аутофлюоресценцией липофусцина в погибших пирамидных нейронах коры лобной и височной долей мозга (табл. 2,3).

При сенильной деменции и болезни Альцгеймера, а также сочетании сенильного процесса с сосудистым, макроскопические изменения костей черепа и ткани мозга носили стереотипный характер, хотя при болезни Альцгеймера эти изменения оказались более выражены. В этих случаях установлены внутренняя и наружная водянка мозга, значительное утолщение костей черепа и усиленное разрастание пахионовых грануляций с

признаками рассасывания теменных костей по линии стреловидного шва. Выявлена значительная очаговая симметричная атрофия коры лобного и затылочного полюсов, те-

Таблица 2

**Клинико-морфологическая характеристика различных форм
сенильных энцефалопатий у жителей предгорных и горных районов РСО-Алания**

Форма процесса	Клинико-морфологические критерии процесса				
	Количество сенильных бляшек (в поле зрения)	Нейрофибрилярные сплетения (в поле зрения)	Сохраненные нейроны (в поле зрения)	Амилоидоз цереброваскулярный, лептоменингеальный и сосуд. сплетений	Отклонения в памяти (в анамнезе)
Сенильная деменция	20-22	Отсутствуют	Единичные во всех полях зрения	Умеренно выраженный	Умеренно выраженные
Болезнь Альцгеймера (не установлена)					
Сочетание сенильного процесса с сосудистым	25-28	Отсутствуют	Единичные во всех полях зрения	Умеренно выраженный	Умеренно выраженные
Психически здоровые лица с соматической патологией	10-12	Отсутствуют	Умеренное количество во всех полях зрения	Слабо выраженный	Незначительные
Психически здоровые лица без соматической патологии	7-8	Отсутствуют	Значительное количество во всех полях зрения	Слабо выраженный или вовсе отсутствует	Незначительные

Таблица 3

**Клинико-морфологическая характеристика различных форм
сенильных энцефалопатий у жителей равнинной плоскости РСО-Алания**

Форма процесса	Клинико-морфологические критерии процесса				
	Количество сенильных бляшек (в поле зрения)	Нейрофибрилярные сплетения (в поле зрения)	Сохраненные нейроны (в поле зрения)	Амилоидоз цереброваскулярный, лептоменингеальный и сосуд. сплетений	Отклонения в памяти (в анамнезе)
Сенильная деменция	25-30	Отсутствуют	Единичные во всех полях зрения	Выраженный	Существенные
Болезнь Альцгеймера	55-60	7-8	Единичные во всех полях зрения	Резко выраженный	Полное отсутствие
Сочетание сенильного процесса с сосудистым	30-35	Отсутствуют	Единичные во всех полях зрения	Выраженный	Существенные
Психически здоровые лица с соматической патологией	15-20	Отсутствуют	Единичные во всех полях зрения	Умеренно выраженный	Незначительные
Психически здоровые лица без соматической патологии	7-12	Отсутствуют	Значительное количество во всех полях зрения	Слабо выраженный	Незначительные

менных и височных долей в сочетании с заметным помутнением оболочек мозга, плотно сращенных с костями свода черепа при средней массе мозга 900-1100 г.

Фактические результаты наших исследований подтверждают прямую связь между степенью развития локального церебрального амилоидоза и прогрессированием болезни Альцгеймера и сенильной деменции, как проявление возрастной патологии [7].

Достоверно установлено, что при болезни Альцгеймера амилоидоз мозга выражен значительно сильнее, в связи с чем она является наиболее частой причиной глубокого слабоумия. Болезнь Альцгеймера нами рассматривается как генетически гетерогенное заболевание, фенотипически характеризующееся наличием внеклеточных (сенильные бляшки), внутриклеточных (нейрофибрилярные сплетения) и церебральных отложений амилоида.

Эти данные подтверждают положение о том [5], что возможно появление нового качества вследствие рекомбинации функционально активных элементов при одном и том же их количестве. При старческом амилоидозе различные белки в условиях прогрессирующей брадитрофии тканей приобретают совершенно новое качество, качество особого фибриллярного белка, причем в основе этого процесса лежат рекомбинантные преобразования на основе конформации.

Установлено, что большинство долгожителей горных районов РСО-Алания не страдает деменцией по причине благоприятного влияния на их организм многофакторного положительного потенциала горного климата и отдаленности горных территорий от антропогенных, стресс-обуславливающих факторов.

По нашим данным средняя продолжительность жизни долгожителей в горных районах РСО-Алания составляет 98-100 лет, а на равнинной плоскости – 91-93 года.

Таким образом, накопление амилоида в структурах ткани мозга и его оболочках по мере старения прогрессивно возрастает и среди долгожителей равнинной плоскости старше 90 лет достигает 95-100%, тогда как у старожил высокогорных районов эти данные существенно ниже и составляют 60-65%. Полученные данные являются отражением общебиологической закономерности, проявляющейся в возрастном инволюционном угасании возможностей системного реагирования [6,7].

Биохимическая диагностика болезни Альцгеймера и других дементных состояний

1. Диагностика болезни Альцгеймера, основанная на выявлении и определении в сыворотке крови больных ВВ-изоэла креатинкиназы

Для болезни Альцгеймера характерными морфологическими признаками являются нейрональные дегенеративные изменения, выражающиеся во внутри- и внеклеточном отложении нерастворимого амилоида. Известно также, что креатинкиназа в избытке содержится только в мышечной ткани, включая сердечную мышцу, и в ткани мозга, причем, если в мышечной ткани фермент преимущественно представлен в виде мышечной изоформы ММ-изоэла, то в ткани мозга – в виде мозговой изоформы ВВ-изоэла. Мы высказали предположение, что появление ВВ-изоэла в сыворотке крови больных при болезни Альцгеймера может служить указанием на определенные структурные изменения в ткани мозга, если у больных нет других явных органических поражений мышц и сердца [9].

Установлено, что концентрация ВВ-изоэла креатинкиназы в сыворотке крови больных болезнью Альцгеймера была существенно выше ($6,5 \pm 1,2$ МЕ/л), чем в крови больных другими формами деменции ($2,3 \pm 0,4$ МЕ/л); в сыворотке крови здоровых лиц открывались лишь следовые количества ВВ-изоэла. Укажем также, что величины общей концентрации креатинкиназы сыворотки крови, определяемые спектрофотометрическим методом по количеству образовавшегося креатинфосфата в реакции Креатин + АТФ Креатинфосфат АДФ, были в пределах нормы.

Таким образом, предложенный изоферментный тест сыворотки крови – определение ВВ-изозима креатинкиназы может быть использован в качестве потенциального маркера в биохимической диагностике болезни Альцгеймера.

2. Трансаминазная активность спинномозговой жидкости как биохимический маркер болезни Альцгеймера у жителей различных климатических районов РСО-Алания

Нейродегенеративные изменения, наблюдаемые при болезни Альцгеймера и сенильной деменции, морфобиохимически характеризуются отложением и накоплением амилоидных фибрилл (нерастворимого белка амилоида) как в самих нервных клетках, так и во внеклеточных структурах.

В предыдущих наших морфологических исследованиях были обнаружены существенные различия в содержании амилоидных отложений у умерших старожилы горных районов и равнинной плоскости. Учитывая эти данные, была высказана гипотеза о возможности повышения активности ключевых ферментов обмена, в частности трансаминаз, в спинномозговой жидкости прижизненно, в соответствии со степенью поражения клеток ткани мозга при болезни Альцгеймера и сенильной деменции.

В соответствии с клиническими наблюдениями у первых двух групп были отмечены лишь минимальные отклонения в памяти. Показано, что самые высокие значения трансаминазной активности спинномозговой жидкости наблюдаются у больных болезнью Альцгеймера равнинных районов РСО-Алания (от 8,6 до 11,8 МЕ/л). У жителей горных районов РСО-Алания, несмотря на более высокий возраст, величины активности фермента оказались существенно ниже (4,5 - 6,7 МЕ/л), приближаясь к результатам у здоровых лиц (3,6 - 4,7 МЕ/л).

Полученные данные свидетельствуют о том, что величины трансаминазной активности в спинномозговой жидкости могут дать ценную информацию как о степени морфологических повреждений клеток мозга при болезни Альцгеймера, так и служить основой для дифференциальной диагностики разных форм деменций, при которых отсутствуют или слабо выражены атрофические изменения клеток ЦНС.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию. М. Медицина, 1980.
2. Зыкова Л.Д. Старческий амилоидоз: клинко-морфологический аспект проблемы. Автореф. дис. д-ра мед. наук. М. 1989.
3. Кудинова Н.В., Березов Т.Т., Козырев К.М., Бурбаева Г.Ш., Кудинов А.Р. Влияние амилоида бета на этерификацию холестерина в плазме крови и на синтез липидов в культуре клеток печени человека. *Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии*. 1998; 2:13-16.
4. Ойфа А.И. Сенильный церебральный амилоидоз. М. Медицина, 1987.
5. Саркисов Д.С. О сущности так называемых периодов болезни. *Арх. пат.* 1984; 4:3-11.
6. Серов В.В. Амилоидоз: новые факты, спорные и нерешенные вопросы. *Арх. пат.* 1989; 51:3-10.
7. Серов В.В. Локальные формы амилоидоза как проявление возрастной патологии: новый взгляд на проблему. Там же. 1994; 5:39-43.
8. Шамов И.А. Биопсия слизистой оболочки толстого кишечника в диагностике амилоидоза. Материалы I Всесоюз. съезда нефрологов. Минск, 1974.
9. Berezov T.T., Kozirev K.M. Elevated cerebrospinal fluid transaminase level as predictor of dementia in memory-impaired patients. *Abst. 25th FEBS Meeting*. Copenhagen, Denmark. 1998: 28-32.
10. Burns J., Pennoch C., Stoward P. The specificity of the staining of amyloid deposits with Thioflavine T. *J. Path. Bact.* 1967; 94:337-344.
11. Haass C., Schlossmacher M.G., Hung A.Y. et al. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*. 1992; 359:322-325.
12. Koudinov A.R., Koudinova N.V., Burbaeva D.S., Kozirev K.M., Berezov T.T., Uvarov V.Y., Ivanov Y.D. Alzheimer's amyloid beta secondary structure: Effect of high density lipoprotein lipid. *Neurosci. Lett. Brain Res. Neled. Suppl.* 1997; 48:29.
13. Koudinov A.R., Koudinova N.V. Alzheimer's soluble amyloid beta protein is secreted by Hep G 22 cells as an apolipoprotein. *Cell Biol. Int.* 1997; 21:265-271.
14. Koudinova N.V., Berezov T.T., Koudinov A.R. Multiple inhibitory effects of Alzheimer's peptide ABC-40 on lipid biosynthesis in cultured human Hep G 2 cells. *FEBS Letters*. 1996; 395:204-206.
15. Koudinova N.V., Koudinov A.R., Berezov T.T., Yavin E. Alzheimer's amyloid beta modulates lipid synthesis in rat hippocampus. *Soc. Neurosc. Abs.* 1999; 25:1859.

16. Koudinova N.V., Koudinov A.R., Berezov T.T., Yavin E. Alzheimer's A β_{1-40} Peptide Modulates Lipid Synthesis in Neuronal Cultures and Intact Rat Fetal Brain Under Normoxic and Oxidative Stress Conditions. *Neurochem. Res.* 2000; 25: 653-660.
17. Marks N., Berg M.J. *Drugs of Abuse and Neurobiology* (ed. R.R.Watson). CRC Press. Boca Raton, FL. 1992;303-338.
18. Pauli B., Lugenbuhl H. Fluoreszenz mikroskopische untersuchungen der cerebralen amyloidose bei alten Hunden und senilen Menschen. *Acta Neuropathol. (Berl.)*. 1971; 19:121-128.
19. Puchler H., Sweat F. Congo-red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J.Histochem. Cytochem.* 1965; 13:693-694.
20. Shoji M., Golde T., Chiso J. et al. Production of the Alzheimer's amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*. 1992; 258:126-129.
21. Zucker-Franklin D., Franklin E. Intracellular localization of human amyloid by fluorescence and electron microscopy. *Intracellular Am. J. Path.* 1970; 59:23-41.

THE MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL MARKERS OF THE LONGLIVERS CEREBRAL AMYLOIDOSIS

K.M.KOZYREV

Department of pathological anatomy of Nothen-Ossetia State Medical Academy, Vladikavkaz,
187020, Pushkinskaya st 42

S.P.SYATKIN, T.T.BEREZOV

Department of biochemistry RPFU, Moscow 117198, *Micluho - Maklaya str. 8, , Medical Faculty.*

The qualitative and quantitative changes (both morphological and biochemical) in different sections of brain of the Ossetia-Alaniya longlivers with cerebral amyloidosis were analyzed. The significant lower amyloidosis was observed in the brain of high mountain region longlivers (60-65%) against to the data of plain longlivers (95-100%). Correspondingly the more lower transaminase activity in cerebrospinal fluid as well as lower creatine kinase BB-isoenzyme in blood serum were obtained in mountainous longlivers. We postulated that the elevation of both serum creatine kinase BB-isoenzyme and cerebrospinal transaminase tests may be considered as potential biochemical markers of Alzheimer's disease and serve as predictors of the progression to dementia in memory-impaired patients.

Key words: amyloidosis, creatine kinase BB-isoenzyme, transaminase