

## Untersuchungen zum immunhistochemischen Verhalten der senilen Plaques des menschlichen Gehirnes

DETLEF KATENKAMP, DANKWART STILLER und KLAUS THOSS

Pathologisches Institut der Friedrich Schiller-Universität Jena (Direktor: Prof. Dr. F. Bolek)

Eingegangen am 16. September 1970

### Studies of the Immunohistochemical Behaviour of Senile Plaques of the Human Brain

*Summary.* Senile plaques showed an intensive fluorescence with thioflavine S caused by the deposition of amyloid. From these results fluorescence-immune histochemical studies of senile plaques with antihuman-gamma globuline serum and anti-human fibrin serum were carried out on ten brains. Forty brains were selected from autopsies of normally aged men without mental diseases. About 5–10% of senile plaques of each brain showed in the central cores positive immunohistochemical reactions whereas the fluorescence in their peripheral zones appeared less intensive or was totally absent. Furthermore, the walls of some meningeal and cerebral vessels were also positive with these methods, independent of the plaque-like degeneration of arteries and capillaries (Scholz).

It is assumed that the majority of senile plaques has no relation to the blood vessels and, therefore, the plaques arise locally in brain tissue. The findings of immunohistochemical positive plaques are due to an exudation of serum. An immunological genesis of senile plaques is discussed; it is concluded that the senile plaque is a particular form of senile amyloidosis due to insufficient regulatory mechanisms of glia cells.

*Zusammenfassung.* Die intensive Thioflavin-S-Fluoreszenz seniler Plaques weist auf Amyloidablagerungen hin. Davon ausgehend wurden immunhistochemische Untersuchungen an 10 Gehirnen mittels Anti-Human-Gammaglobulin- und Anti-Human-Fibrin-Serum vorgenommen. Die Fälle wurden dem Obduktionsmaterial 40 physiologisch gealterter Menschen entnommen. 5–10% der senilen Plaques des Gehirnes ergeben zentral positive immunhistochemische Reaktionen, wogegen die periphere Zone weniger intensiv fluoresziert oder reaktionslos ist. Darüber hinaus zeigen Wandungen einiger meningealer und cerebraler Gefäße unabhängig vom Vorliegen einer drusigen Entartung (Scholz) positive Befunde.

Die Mehrzahl der senilen Plaques kann daher keine Beziehungen zu Blutgefäßen aufweisen und muß folglich lokal im Hirngewebe entstehen. Die positiven immunhistochemischen Reaktionen sind auf eine Serumexsudation zurückzuführen. Die immunologische Genese der Plaques wird diskutiert, und es wird die Schlußfolgerung gezogen, daß die senilen Plaques eine besondere Form der senilen Amyloidose auf dem Boden zellulärer Regulationsstörungen darstellen.

Der Kern der senilen Plaques des Hirngewebes besteht aus Amyloid (Hager, 1968; Seitelberger, 1968; Katenkamp und Stiller, 1970). Dabei soll es sich um eine Sonderform der primären Amyloidose, die sogenannte senile Amyloidose handeln. Obwohl viele kausalpathogenetische Probleme der Amyloidosen noch offen stehen, darf für die senile Amyloidose *ein* wesentlicher Faktor in der altersbedingten Immunopathie im Sinne einer Autoimmunerkrankung gesehen werden (Schwartz, 1965; Walford, 1967, 1969; Hughes, 1970). Unbeantwortet blieb bisher die Frage,

ob der entscheidende Stimulus zur Plaquebildung lokal im Hirngewebe, also im örtlichen Zellbestand zu suchen ist oder auf dem Blutwege herangetragen wird. Im letzteren Falle müßten räumliche Beziehungen zu den Hirngefäßen vorliegen. Außerdem wären auch Unterschiede der stofflichen Zusammensetzung zu erwarten.

Durch den Einsatz von fluoresceinmarkierten Gammaglobulin- und Fibrin-antiseren versuchten wir einen Teil dieser Problematik in Angriff zu nehmen.

### Material und Methode

Menschliches Hirngewebe (40 Fälle von über 70jährigen) wurde 8—20 Std post mortem nach Eröffnung des Schädels entnommen, sofort in Kohlsäureschnee eingefroren und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Auswahl geeigneten Materials kam als Suchmethode die Thioflavin-S-Färbung zur Anwendung (Stiller und Katenkamp, 1970). Wir entnahmen die Gewebeproben dem Lobus parietalis, um nicht durch eine besonders dichte Capillarisation (z. B. Ammons-horngebiet) zu Fehlschlüssen zu gelangen. Auf diese Weise wurden 10 menschliche Gehirne für die immunhistochemischen Untersuchungen ausgewählt.

Zur weiteren Bearbeitung wurde das Hirngewebe im Kryostat geschnitten (Schnitt-dicke:  $5\mu$ ), auf Objektträger gebracht und 24 Std im Kühlstrahl aufbewahrt. Von den Serienschritten wurden jeweils eine Thioflavin-S-Färbung und Übersichtungen mit fluoresceinisothiocyanat markiertem Anti-Human-Gammaglobulinserum bzw. Anti-Human-Fibrin-serum vorgenommen. Außerdem wurde eine Kontrollfärbung mit fluoresceinisothiocyanat-markiertem Kaninchen-Normalserum durchgeführt, da Fluorescein gelegentlich selbst Amyloid anfärben kann (Zucker-Franklin und Franklin, 1970).

*Herstellung der Seren.* Anti-Human-Gammaglobulinserum und Anti-Human-Fibrinserum wurden durch 3monatige Immunisierung von Kaninchen unter Verwendung von Aluminiumhydroxyd als Adjuvans gewonnen. 7 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere in Brevinarkon-Narkose entblutet. Die mit Ammoniumsulfat (40%ige Sättigung) gefällte Gammaglobulinfraktion der Antiseren wurde nach Dialyse gegen physiologische Kochsalzlösung und Einstellen auf eine 2%ige Proteinkonzentration mit 2% Fluoresceinisothiocyanat markiert. Die Entfernung des ungebundenen Farbstoffes erfolgte durch Gelchromatographie an Sephadex G 25 (Riggs u. Mitarb., 1958; Lipp, 1961).

*Immunhistochemie.* Die unfixierten Kryostatsschnitte wurden nach 10minütigem Spülen mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,8) 30 min bei Zimmertemperatur mit den auf 0,25% Protein verdünnten Konjugaten inkubiert. Nach 10 min Spülen in 1mal gewechseltem Puffer wurden die Schnitte mit gepuffertem Glycerin eingedeckt (Wagner, 1967).

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit dem Universalforschungsmikroskop NU des VEB Carl Zeiß Jena. Als Lichtquelle diente eine Osram-Lampe (HBO 50), Anregungsfilter war die Filterkombination  $\text{UG}_1$  und  $\text{BG}_{12}$ , als Sperrfilter wurde  $\text{GG}_9$  eingelegt. Die photographischen Aufnahmen wurden mit Hilfe der eingebauten photographischen Einrichtung angefertigt.

Außerdem kamen am formalinfixierten Hirnmaterial (Lobus frontalis, parietalis, temporalis und occipitalis sowie Ammons-horngebiet) die Versilberungsmethoden nach Bielschowski sowie v. Braunmühl (s. Romeis, 1968) zur Anwendung. An entsprechenden Paraffinschnitten wurden die senilen Plaques mittels Thioflavin S (Schwartz, 1964) dargestellt und HE- sowie Nissel-Färbungen ausgeführt.

### Ergebnisse

Sowohl nach Versilberung als auch nach Färbung mit Thioflavin S treten die senilen Plaques deutlich hervor, wobei die Fluoreszenzmethode infolge der kontrastreichereren Darstellung durch die gelbaufleuchtenden Strukturen vorzuziehen ist (Schwartz, 1967; Katenkamp und Stiller, 1970). Die Mehrzahl der senilen Plaques stellt sich mit einem klumpigen bis homogenen Zentrum als Kern und fädigen bis nadelförmigen Gebilden in strahlenkranzartiger Anordnung als Außenzone dar (sog. Kernplaque). Daneben kommen Plaqueformen ohne den charakte-

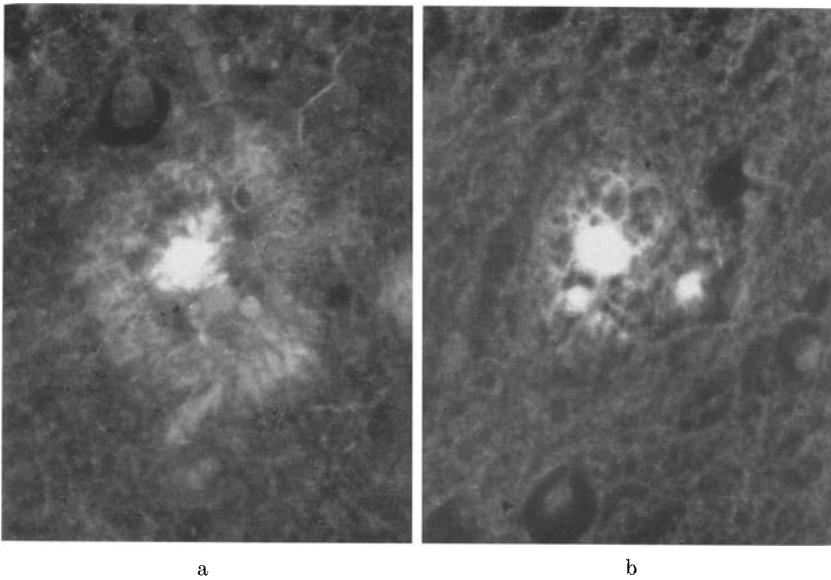


Abb. 1 a u. b. Intensiv, im Original gelb aufleuchtende Zentren mit teils strahlenkranzförmiger Anordnung weniger stark fluoreszierender Außenzone (a) und gröberen peripheren Ablagerungen (b) bei Darstellung der senilen Plaques mittels Thioflavin S (sog. Kernplaques; Vergr. 480fach)

ristischen dichten Kern vor, die lediglich aus einem Knäuel von fädigen und granulären Strukturen bestehen. Morphologisch können je nach angewandter Technik verschiedene Plaqueformen abgegrenzt werden (vgl. A. von Braunmühl, 1957; Schwartz, 1967), wobei von uns bei den immunhistochemischen Untersuchungen aus technischen Gründen nur die typischen Kernplaques berücksichtigt wurden (Abb. 1).

Nach Überschichtung mit den Antiseren waren senile Plaques und Gefäßwände in Hirnrinde, Marklager und Meningen markiert.

Die Anzahl der fluoreszierenden Plaques variierte in den einzelnen Gehirnen erheblich. Durch Auszählung der Plaques in korrespondierenden, mit Thioflavin-S-gefärbten und Antiseren-markierten Schnitten versuchten wir das Verhältnis zwischen Gesamtzahl und gammaglobulin- bzw. fibrinenthaltenden Plaques zu bestimmen. Dabei ergab sich, daß 5—10% der senilen Plaques eines Gehirnes Gammaglobulin enthalten. Der Kern markierter Plaques fluoresciert teils homogen, teils fibrillär-strukturiert grün. Angedeutet ist der Strahlenkranz vorhanden (Abb. 2). Eine vollständige Darstellung der Außenzone wurde allerdings nicht beobachtet. Ähnlich sind die Resultate nach Fibrindarstellung.

Im Falle von Amyloidablagerungen in Hirngefäßen sind Gammaglobuline und Fibrin nachzuweisen. Unabhängig vom Vorliegen einer kongophilen Angiopathie sind in 3 Gehirnen fluoreszierende Gefäßwände sichtbar. Die Fluoreszenz nach Inkubation mit Anti-Gammaglobulin ist intensiver (Abb. 3). Eine Bevorzugung bestimmter Gefäßregionen besteht nicht.

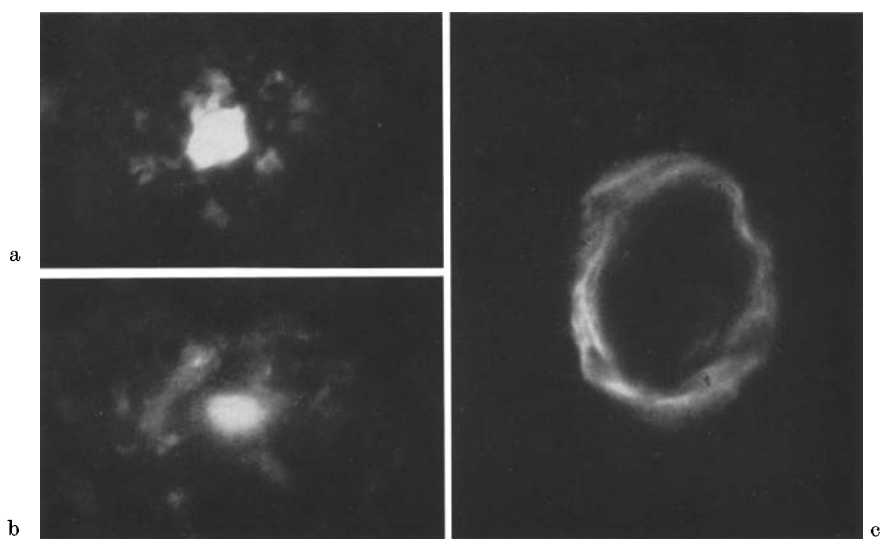


Abb. 2 a—c. Immunhistochemischer Nachweis von Gammaglobulin mit intensiver Fluoreszenz des Zentrums (a) oder nur angedeuteter Außenzone (b). Deutliche Darstellung eines Blutgefäßes (c). (Vergr. 480fach)

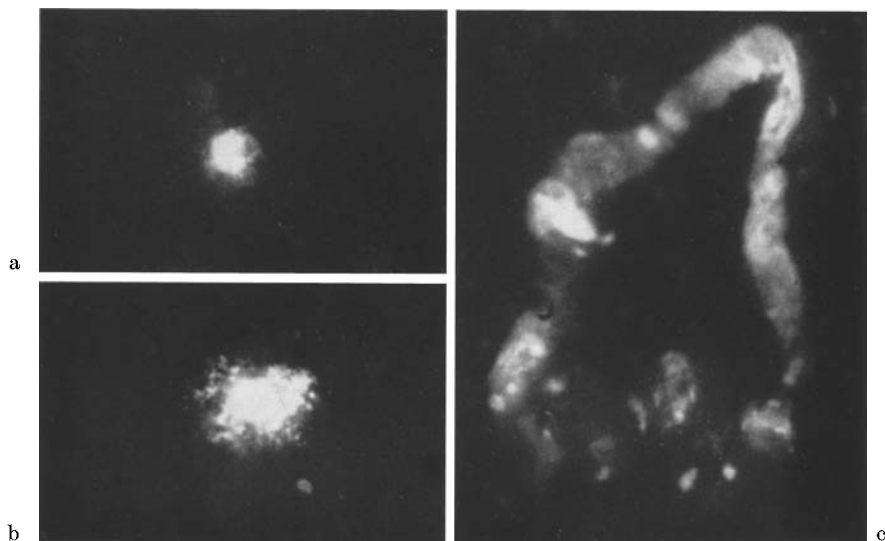


Abb. 3 a—c. Immunhistochemischer Nachweis von Fibrin. Aufleuchtende Zentren der Plaques (a, b) sowie Darstellung einer Arterie. (Vergr. 480fach)

Zur Beurteilung der immunhistochemischen Befunde mußten strenge Kriterien angelegt werden, da einerseits das Hirngewebe durch die Kryostattechnik teilweise schlecht erhalten war und andererseits offenbar fluoreszierende Artefakte vorkommen können.

### Besprechung der Befunde

Die immunhistochemischen Befunde am physiologisch gealterten Gehirn zeigen, daß Gammaglobulin und Fibrin keine essentiellen Bestandteile seniler Plaques sind, obwohl Stam (1966) das generelle Vorkommen in den Kernen beschrieb. Zwar ist im Amyloid der Nachweis von Gammaglobulin (Schultz u. Mitarb., 1966, 1967; weitere Literatur bei Calkins, 1968) und auch Fibrinogen bzw. Fibrin (Horowitz u. Mitarb., 1965; Cathcart und Cohen, 1966; Schultz u. Mitarb., 1967; Cathcart u. Mitarb., 1967) ein geläufiger Befund, jedoch werden diese Substanzen heute von den meisten Autoren auf Kontaminationen aus dem Blut zurückgeführt (zusammenfassende Darstellung bei Cohen, 1967). Bei den senilen Amyloidosen kann der Nachweis von adsorbierten Plasmaproteinen gelegentlich schwächer ausfallen (Brozman und Grigel, 1970).

Im normalen Gehirn sind Immunglobuline und Fibrin bzw. Fibrinogen außerhalb der Gefäße nicht zu erwarten. Folglich sprechen unsere Ergebnisse dafür, daß 5—10% der senilen Plaques einer Seruminpermeation unterliegen und daher enge Beziehungen zu Gefäßen aufweisen. Der Nachweis von Plasmaproteinen in den Gefäßwänden dürfte auf die zum Teil erhöhte Permeabilität bestimmter Gefäßstrecken im Alter zurückzuführen sein und unterstützt die Annahme eines Exsudationsvorganges. Eine lokale Immunglobulinsynthese ist wegen der fehlenden entzündlichen Zellinfiltrate auszuschließen.

Bülow (1956), Schwartz (1967) und Kraft (1969) beschrieben eine enge Nachbarschaft zwischen Plaques und Gefäßen, während nach Friede und Magee (1962) bei 92% der Plaques Capillaren fehlen und auch Hager (1968) eine Gefäßabhängigkeit der Plaques durchaus nicht immer nachweisen konnte.

Die erhobenen Befunde ließen sich auch als Äquivalent qualitativer Unterschiede der senilen Plaques deuten, da variierende morphologische Formen bekannt sind (v. Braunmühl, 1957; Schwartz, 1967), die als Zustandsformen einer stadienhaften Metamorphose aufgefaßt werden könnten. Jedoch war durch elektronenmikroskopische Untersuchungen nachzuweisen, daß die fibrilläre Grundstruktur gleich ist und trotz verschiedener Altersstufen eine gleiche stoffliche Zusammensetzung derselben vorliegt, ein Befund, der auch durch enzymhistochemische Untersuchungen ergänzt wird (Ishii, 1969; Wisniewski und Terry, 1970). Andererseits ist eine Alterung von Zellorganellen und filamentären Strukturen wohl kaum mit dem Auftreten von Gammaglobulin oder Fibrin ursächlich verbunden.

Die nur geringe Gefäßbezogenheit der senilen Plaques unterstützt die Theorie von ihrer gefäßunabhängigen Entstehung (vgl. Thomas, 1968), wie auch Beobachtungen über Gefäßwandamyloidose im Gehirn ohne senile Plaques (Peterson und Schulz, 1961).

Die Bildung der amyloiden fibrillären Grundtextur der Plaques müßte durch mikrogliale Zellen erfolgen, die als wahrscheinliches organeigenes RHS-Äquivalent des Zentralnervensystems angesehen werden können (Suzuki und Terry, 1967). Ferner wird auch bei den meisten Amyloidoseformen, einschließlich der senilen Amyloidose, eine unspezifische immunopathische Reaktion angenommen (Janigan und Druet, 1967; Letterer, 1968). Aus dieser Sicht handelt es sich um eine Sonderform der Amyloidablagerungen, da keine kollagenen Fasern als Voraussetzung

einer primären Amyloidose (Missmahl und Gafni, 1964) vorhanden sind. Auf Grund unserer Befunde läßt sich in Übereinstimmung mit Muckle (1968) keine immunopathische Genese der senilen Plaques vermuten, so daß eine *besondere* Genese dieser Amyloidablagerungen vorliegen muß.

Im Alter bestehen offenbar insuffiziente Steuer- und Regelmechanismen der (Glia-)Zelle, die zur Bildung der Amyloidfibrillen führen, wobei anzunehmen ist, daß es sich um keine prinzipiell anomalen Zellprodukte handelt.

### Literatur

- Braunmühl, A. v.: Alterserkrankungen des Zentralnervensystems. Senile Involution. Senile Demenz. Alzheimer'sche Krankheit. In: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie (F. Henke, O. Lubarsch und R. Rössle, Hrsg.), Bd. XIII, S. 337. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.
- Brozman, M., Grigel, M.: Immunohistochemical identification of amyloid deposits. *Acta histochem. (Jena)* **35**, 200 (1970).
- Bülow, I. C.: Die Anwendung histochemischer Methoden zur Darstellung der Drusen am Gehirn. *Arch. Psychiat. Neurol.* **195**, 1 (1956).
- Calkins, E.: Relationship of amyloidosis to immunologic mechanisms. In: Proc. Sympos. Amyloidosis. Edit.: E. Mandema, L. Ruinen, J. H. Scholten und A. S. Cohen, S. 87, Groningen, Sept. 1967. Amsterdam: Excerpta Med. 1968.
- Cathcart, E. S., Cohen, A. S.: The relation between isolated human amyloid fibrils and human gamma-globulin and its subunits. *J. Immunol.* **96**, 239 (1966).
- Wollheim, F. A., Cohen, A. S.: Plasma protein constituents of amyloid fibrils. *J. Immunol.* **99**, 376 (1967).
- Cohen, A. S.: Amyloidosis. *New Engl. J. Med.* **277**, 522 (1967).
- Friede, R. L., Magee, K. R.: Alzheimer's disease. Presentation of a case with pathologic and enzymatic-histochemical observations. *Neurology (Minneapolis)* **12**, 213 (1962).
- Hager, H.: Allgemeine morphologische Pathologie des Nervengewebes. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie. Hrsg: H.-W. Altmann, F. Büchner, H. Cottier, G. Holle, E. Letterer, W. Masshoff, H. Meessen, F. Roulet, G. Seifert, G. Siebert und A. Studer, Bd. III, Teil 3. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.
- Horowitz, R. E., Stuyvesant, V. W., Wigmore, W., Tatter, D.: Fibrinogen as a component of amyloid. *Arch. Path.* **79**, 238 (1965).
- Hughes, W.: Alzheimer's disease. *Geront. clin.* **12**, 129 (1970).
- Ishii, T.: Enzyme histochemical studies of senile plaques and the plaque-like degeneration of arteries and capillaries (Scholz). *Arch. neuropath.* **14**, 250 (1969).
- Janigan, D. T., Druet, R. L.: Amyloidosis in X-irradiated mice receiving spleen cells and serum from sensitized donors. *Fed. Proc.* **26**, 688 (1967).
- Katenkamp, D., Stiller, D.: Der Alzheimer'sche Symptomenkomplex (kongophile Angiopathie, senile Plaques und Alzheimer'sche Fibrillenveränderungen) und seine Beziehungen zum Amyloid. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **114**, (im Druck).
- Kraft, G.: Licht- und polarisationsoptische Untersuchungen an einem Fall von seniler Demenz (mit besonderer Berücksichtigung der Gefäßbeziehungen von senilen Plaques). Diss. Tübingen 1969. Zit. nach Pfeiffer, J., Durch Alterung der Hirngefäße bedingte Abbauprozesse. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 52. Tagg., S. 155 (1968).
- Letterer, E.: History and development of amyloid research. In: Proc. Sympos. Amyloidosis. Edit.: E. Mandema, L. Ruinen, J. H. Scholten und A. S. Cohen, S. 3, Groningen, Sept. 1967. Amsterdam: Excerpta Med. 1968.
- Lipp, W.: Use of gel filtration and polyethylene glycol in the preparation of fluorochrome-labelled proteins. *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 458 (1961).
- Missmahl, H. P., Gafni, J.: Peri-collagen and peri-reticular amyloidoses. Their differentiation by polarization microscopy. *Path. et Microbiol. (Basel)* **27**, 826 (1964).
- Muckle, T. J.: Impaired immunity in the etiology of amyloidosis: a speculative review. *Israel J. med. Sci.* **4**, 1020 (1968).

- Peterson, E. W., Schulz, D. M.: Amyloid in vessels of a vascular malformation in brain. *Arch. Path.* **72**, 480 (1961).
- Riggs, J. L., Seiwald, R. J., Burckhalter, J. H., Downs, C. M., Metcalf, T. G.: Isothiocyanate compounds as fluorescent labelling agents for immune serum. *Amer. J. Path.* **34**, 1081 (1958).
- Romeis, B.: *Mikroskopische Technik*. München-Wien: Oldenbourg Verlag 1968.
- Schultz, R. T., Calkins, E., Milgrom, F.: Antigenic components of human amyloid. *Amer. J. Path.* **50**, 957 (1967).
- — — Witebsky, E.: Association of gamma-globulin with amyloid. *Amer. J. Path.* **48**, 1 (1966).
- Schwartz, Ph.: Morphologische und pathogenetische Untersuchungen über Veränderungen im Greisenalter. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **106**, 320 (1964).
- Senile cerebral pancreatic insular and cardiac amyloidosis. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **27**, 393 (1965).
- Neue Beiträge zur Pathologie des Alterns. *Psychiat. Neurol.* **154**, 337 (1967).
- Seitelberger, F.: Allgemeine Neuropathologie der Alterns- und Aufbrauchkrankheiten des Gehirns. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 52. Tagg, S. 32 (1968).
- Stam, F. C.: Histochemistry of the senile involution of the brain. *Proc. 5th Intern. Congr. Neuropathol.*, Sept. 1965, Zürich (F. Lüthy und A. Bischoff, Hrsg.), S. 513. Amsterdam: Excerpta Med. Found. 1966.
- Stiller, D., Katenkamp, D.: Untersuchungen zum fluoreszenzoptischen Nachweis von Amyloid durch Thioflavin S. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **113**, 451 (1970).
- Suzuki, K., Terry, R. D.: Fine structural localization of acid phosphatase in senile plaques in Alzheimer's presenile dementia. *Acta neuropath. (Berl.)* **8**, 276 (1967).
- Thomas, E.: Histochemie der Alternsvorgänge des Nervensystems, insbesondere der Alzheimerschen Fibrillenveränderungen. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 52. Tagg, S. 74 (1968).
- Wagner, M.: *Fluoreszierende Antikörper und ihre Anwendung in der Mikrobiologie*. Jena: G. Fischer 1967.
- Walford, R. L.: *Advances in gerontological research*. New York 1967.
- Immunologische Aspekte des Alterns. *Klin. Wschr.* **47**, 599 (1969).
- Wisniewski, H., Terry, R. D.: Morphogenesis of the senile plaque. *Amer. J. Path.* **59**, 4a (1970).
- Zucker-Franklin, D., Franklin, E. C.: Intracellular localization of human amyloid by fluorescence and electron microscopy. *Amer. J. Path.* **59**, 23 (1970).

Dr. Detlef Katenkamp  
Pathologisches Institut der  
Friedrich-Schiller-Universität  
DDR-69 Jena  
Ziegmühlengeweg 1