

ХАРАКТЕРИСТИКА ОТЛОЖЕНИЙ АМИЛОИДА, ОБНАРУЖИВАЕМЫХ ВО ВНУТРЕННИХ ОРГАНАХ МЫШЕЙ ЛИНИИ mdx

© В. В. Гусельникова,^{1,*} А. Я. Гудкова,^{2,3} Е. Н. Семернин,^{2,3} Н. А. Грудина,^{1,2}
А. Н. Крутиков,² М. М. Шавловский,¹ Б. Л. Мильман,³ Д. Э. Коржевский,^{1,3}
Е. В. Михайлова,⁴ Е. В. Каминская,⁴ В. М. Михайлов⁴

¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376,

² Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197341,

³ Первый С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197022, и

⁴ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

* электронный адрес: Guselnicova.Valeriia@yandex.ru

Линия мышей mdx является наиболее широко используемой экспериментальной моделью мышечной дистрофии Дюшенна (МДД). Несмотря на то что в мышечных биоптатах пациентов с разными типами мышечных дистрофий ранее показано присутствие амилоида, в мировой литературе отсутствуют данные, свидетельствующие об анализе образцов тканей больных МДД или мышей mdx на наличие амилоидных скоплений. Целью настоящей работы стала проверка гипотезы о возможности накопления амилоида во внутренних органах мышей mdx. Материалом для исследования служили образцы миокарда, почки и печени мышей mdx (самцов и самок) в возрасте от 2 мес до 1.5 года. С помощью гистохимического метода окрашивания Конго красным показано присутствие амилоидных скоплений в исследованных органах мышей mdx. Описаны и проанализированы морфология и локализация данных скоплений. На основании масс-спектрометрического исследования установлено, что наиболее вероятными белками, входящими в состав амилоидных скоплений у мышей mdx, являются витронектин и аполипопротеин А-II.

Ключевые слова: амилоид, мыши mdx, Конго красный, масс-спектрометрия.

Принятые сокращения: апоА-II — аполипопротеин А-II, КМЦ — кардиомиоцит, МДД — миодистрофия Дюшенна, ЭКГ — электрокардиограмма.

Линия мышей mdx (от «X-chromosome-linked muscular dystrophy») получена более 30 лет назад в результате отбора мутации, спонтанно возникшей у мышей линии C57BL/10ScSnJ (Bulfield et al., 1984). Данная точечная мутация в гене белка дистрофина приводит к формированию преждевременного стоп-кодона и синтезу у мышей mdx укороченной формы этого белка (27 % от нормальной длины). Дистрофин, относящийся к цитоскелетным белкам суперсемейства спектрина, является компонентом дистрофинассоциированных комплексов, локализованных в мембране мышечных волокон. Данный белок необходим для передачи сигнала с экстраклеточного матрикса на цитоскелет, а также для стабилизации связи пучков сократительных филаментов с саркоплазматической мембраной (Durbeej, Campbell, 2002). Отсутствие неповрежденного дистрофина приводит к разрушению дистрофинассоциированных комплексов, нарушению целостности саркоплазматической мембраны и запуску процессов дегенерации мышечного волокна (De la Porte et al., 1999). Сходство развивающихся у мышей mdx патологических процессов с клинической картиной мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) привело к широкому использованию линии mdx в

качестве экспериментальной модели МДД (Manning, O'Malley, 2015).

МДД — наиболее распространенная форма наследственной мышечной дистрофии человека, которая характеризуется X-сцепленным рецессивным типом наследования и тяжелым, прогрессирующим течением. Отсутствие дистрофина, вызванное мутацией в соответствующем гене, у человека, как и у мышей mdx, приводит к дегенерации мышечных волокон, что вызывает атрофию поперечно-полосатой мышечной ткани, сердечную недостаточность, постепенную потерю подвижности и как следствие — преждевременную смерть пациентов с МДД (Kristen, 2004). Помимо патологических изменений в мышцах у больных с МДД нередко наблюдаются нарушения костной ткани (деформация позвоночника, стоп, грудины, сужение костномозгового канала и истончение коркового слоя диафизов длинных трубчатых костей). Особенностью данной формы миодистрофии является также умственная отсталость. У 30—50 % пациентов обнаруживаются патологические изменения в нейроэндокринной системе, приводящие к развитию синдрома Иценко—Кушинга, адипозогенитальной

дистрофии и т. п. (Горбунова и др., 2000; Wagner et al., 2007).

Важно отметить, что в литературе отсутствуют какие-либо результаты анализа образцов тканей больных МДД на наличие амилоидных скоплений, несмотря на то что в случае других типов мышечных дистрофий (вызванных мутациями в гене аноктамина 5 или гене дисферлина) присутствие амилоида показано в мышечных биоптатах пациентов (Spuler et al., 2008; Milone et al., 2012). В связи с этим возникает вопрос о возможности развития амилоидоза у экспериментальных животных, используемых для моделирования различных форм миодистрофий.

Целью настоящей работы стала проверка гипотезы о возможности накопления амилоида во внутренних органах мышей mdx.

Материал и методика

Материалом для исследования служили образцы миокарда, почки и печени мышей mdx (самцов и самок) в возрасте от 2 мес до 1.5 года ($n = 9$). В качестве контроля использовали образцы соответствующих органов, полученные от мышей линии C57Bl/6 (самцов и самок) ($n = 5$). Образцы фиксировали в 10%-ном растворе формалина и после стандартной гистологической проводки заливали в парафин по общепринятой методике. Для проведения гистологического и гистохимического исследования с парафиновых блоков делали срезы толщиной 5 мкм. После депарафинирования часть срезов окрашивали гематоксилином и эозином для оценки общей морфологии, другую часть — анилиновым синим по Массону для выявления соединительной ткани. Для идентификации амилоида использовали гистохимический метод окрашивания Конго красным (Sigma-Aldrich, США) (Коржевский, Гиляров, 2010). Перед проведением гистохимической окраски ядра клеток окрашивали гематоксилином Джилла (БиоВитрум, Россия). Идентификацию амилоидных отложений по результатам гистохимического исследования проводили с использованием микроскопии проходящего света, флуоресцентной микроскопии и микроскопии в поляризованном свете.

Масс-спектрометрический анализ для определения состава обнаруженных отложений амилоида проводили с использованием материала, полученного от мыши № 625, в образцах тканей которой амилоидные отложения были обнаружены в количестве, достаточном для проведения масс-спектрометрического анализа с использованием прицельной лазерной микродиссекции. Анализ полученного из гистологических срезов в результате лазерной микродиссекции конгофильного материала проводили с использованием прибора PALM Micro Beam (Carl Zeiss, Германия). С этой целью специально изготавливали гистологические срезы толщиной 10 мкм и наклеивали их на покрытые полимерной PEN-мембраной предметные стекла (Carl Zeiss, Германия). После депарафинирования эти срезы окрашивали Конго красным с последующей идентификацией конгофильных структур во флуоресцентном режиме. Лазерную микродиссекцию областей, содержащих амилоид, проводили с помощью лазерного микродиссектора PALM Micro Beam (Carl Zeiss, Германия). Для проведения масс-спектрометрии использовали образцы амилоидных включений с суммарной площадью не менее 150 000 мкм², которые экстраги-

ровали цвиттергентом (Calbiochem, Германия) по стандартной методике и гидролизовали трипсином. Гидролизат смешивали с матрицей для масс-спектрометрии MALDI (окисианокоричная кислота) и регистрировали масс-спектры с помощью масс-спектрометра MALDI UltrafleXtreme (Bruker, Германия). Обсчет и обработку масс-спектров осуществляли при помощи компьютерной программы MASCOT (Matrix Science, США) с использованием баз данных по всем известным белковым структурам. Результаты представляли в виде вероятностей идентифицированных белков в порядке убывания. На основе анализа делали заключение о предполагаемом составе амилоидных агрегатов.

Результаты

Гистологические исследования с применением окрасок гематоксилином и эозином и анилиновым синим по Массону. При анализе гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином и анилиновым синим, в контрольных образцах (сердце, печень и почка) патологических изменений и разрастаний соединительной ткани обнаружено не было. При анализе аналогичных препаратов, полученных от мышей линии mdx, обнаружены патологические изменения в сердце и почке. В миокарде мышей mdx отмечены признаки контрактурного повреждения (контрактурной дегенерации) кардиомиоцитов, что является отражением патологического сокращения миофибрилл. Кроме того, выявлена волнообразная деформация мышечных волокон миокарда, при которой волокна приобретали извилистый ход. Также обнаружены участки глыбчатого распада миофибрилл кардиомиоцитов и признаки внутриклеточного миоцитолита, выраженного в вакуолизации цитоплазмы некоторых кардиомиоцитов. В некоторых областях наблюдали деформацию ядер кардиомиоцитов. В нескольких случаях присутствовала лимфоцитарная инфильтрация межмышечных соединительнотканых прослоек миокарда. Окраска по Массону позволила выявить разрастания соединительной ткани в миокарде мышей mdx, преимущественно в областях межмышечных соединительнотканых прослоек (рис. 1, а).

В почке мышей mdx разрастания соединительной ткани не обнаружено, однако отмечали увеличение размеров некоторых почечных телец и дистрофические изменения эпителия канальцев (рис. 1, б). В печени мышей mdx выраженных патологических изменений не выявлено. Лишь в одном случае отмечено наличие в стенке сосудов печени утолщенных участков, образованных гомогенно окрашенным оксифильным веществом.

Результаты гистохимического окрашивания Конго красным. При анализе препаратов, окрашенных Конго красным, наличие или отсутствие амилоида в тканях определяли с применением метода световой микроскопии, флуоресцентной микроскопии и микроскопии в поляризованном свете.

На препаратах сердца, печени и почки животных контрольной группы, окрашенных Конго красным, амилоида не выявлено. При анализе препаратов соответствующих органов мышей mdx обнаружено, что по результатам окраски на амилоид все животные могут быть четко разделены на две группы: группа I — не содержащие конгофильных отложений ни в одном из исследованных органов; группа II — содержащие амилоид по меньшей мере в

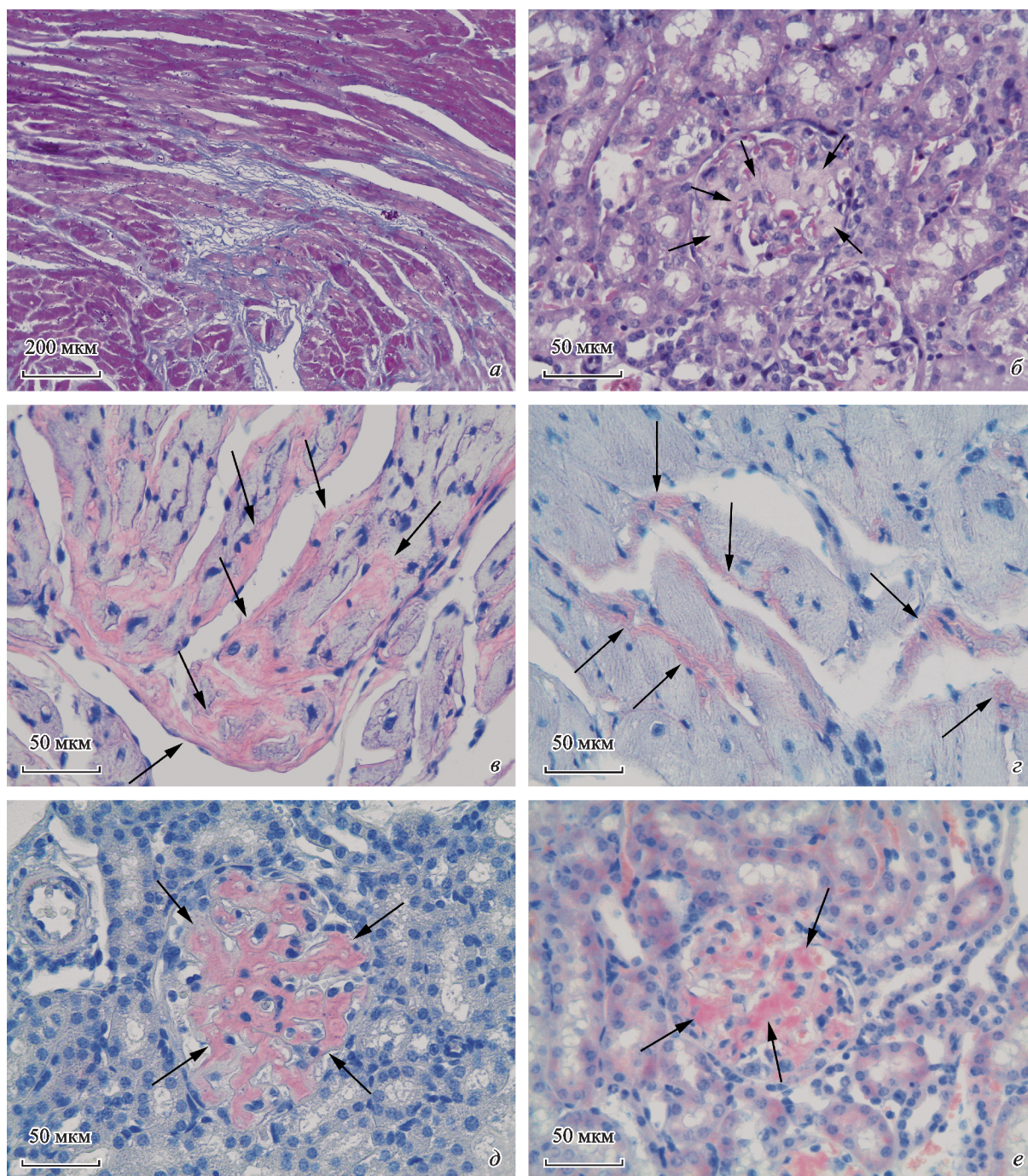


Рис. 1. Результаты гистологического исследования препаратов сердца (а, в, г) и почки (б, д, е) мышей линии mdx.

а — гистохимическое окрашивание ткани сердца анилиновым синим по Массону; наблюдается сильное разрастание межмышечной соединительной ткани, окрашенной анилиновым синим в синий цвет. б — гистохимическое окрашивание ткани почки гематоксилином и эозином; *стрелками* отмечено крупное скопление гомогенно окрашенного эозином вещества на месте капиллярного клубочка почечного тельца. в—е — гистохимическое окрашивание препаратов сердца (в, г) и почки (д, е) Конго красным; *стрелками* указаны отложения амилоида; ядра клеток окрашены гематоксилином Джилла с последующим подсинением в аммиачной воде.

одном из исследуемых органов. Сопоставление полученных результатов с имеющимися данными о возрасте использованных в исследовании мышей mdx позволило установить, что все мыши I группы являются молодыми животными возрастом 2—7 мес, а все мыши II группы — более старыми животными в возрасте от 1 до 1.5 года (см. таблицу).

В сердце мышей mdx в двух случаях из четырех (мыши № 616 и 631) обнаружены незначительные скоп-

ления амилоида, выявленные в субэндокардиальной области и прослойках межмышечной соединительной ткани. В двух других случаях (мыши № 624 и 625) обнаружены более обширные скопления амилоида, находящиеся в межмышечных прослойках соединительной ткани преимущественно в субэндокардиальной области. В одном из исследованных случаев (мышь № 625) амилоид располагался непосредственно под эндокардом левого желудочка. Именно в этой области наблюдали струк-

Амилоидные отложения в сердце, печени и почке мышей mdx

Идентификационный номер животного, линия mdx	Пол	Возраст, мес	Масса, г	Орган (интенсивность амилоидных отложений)
№ 617	Самка	2	17.0	Сердце (0), почка (0), печень (0)
№ 626	»	7	31.2	
№ 627	»	7	31.0	
№ 628	»	5	28.6	
№ 631	Самец	12	25.5	Сердце (2), почка (1), печень (0)
№ 632	»	18	26.5	Сердце (0), почка (2), печень (0)
№ 624	»	18	27.0	Сердце (3), почка (3), печень (0)
№ 625	»	18	28.0	Сердце (4), почка (4), печень (2)
№ 616	»	12	31.2	Сердце (2), почка (3), печень (0)

Примечание. 0 — отсутствие амилоида. Конгофильные скопления: 1 — незначительные, плохо детектируемые в проходящем, но имеющие зеленую окраску в поляризованном свете; 2 — небольшие, но детектируемые в поляризованном и в проходящем свете; 3 — крупные, хорошо детектируемые в проходящем свете; 4 — крупные множественные.

турные изменения (деформацию) ядер кардиомиоцитов (рис. 1, в, г).

В почке мышей mdx отложения амилоида выявлены преимущественно в корковом веществе, в области почечных телец. Большая часть капиллярного клубочка замещена конгофильными массами, которые легко детектировались даже при малом увеличении светового микроскопа ($\times 10$) и давали зеленоватое свечение при наблюдении препарата в поляризованном свете. Амилоидные массы содержали полости — просветы разрушенных капилляров или пустоты на месте дегенерировавших клеточных элементов (рис. 1, д, е).

Вовлечение в патологический процесс печени обнаружено у одной из мышей mdx (мышь № 625), для которой также показано отложение амилоида в почке и миокарде. В этом случае небольшие отложения амилоида выявили в стенке кровеносных сосудов, в междольковой соединительной ткани по ходу кровеносных сосудов печени, а также в виде небольших обособленных фрагмен-

тов внутри печеночной дольки (вблизи кровеносных сосудов) (рис. 2).

Масс-спектрометрический анализ. В одном из исследованных случаев (мышь № 625) количество амилоида в ткани почки было достаточным для определения его белкового состава. Массы амилоида получены из гистологических препаратов путем микродиссекции. Результаты масс-спектрометрии экстрагированного материала после триптического гидролиза показали, что в состав почечного амилоида входит несколько белков, из которых наиболее вероятными являются витронектин и аполипопротеин А-II (apoA-II).

Обсуждение

В рамках проведенного исследования показано, что в сердце, почке и печени мышей линии mdx присутствуют скопления аморфного вещества, обладающего гистохимическими характеристиками амилоида. К таким характеристикам можно отнести окрашивание данных скоплений Конго красным в насыщенный оранжево-розовый цвет и зеленое свечение данных конгофильных конгломератов в поляризованном свете. Используемая в работе методика окраски Конго красным в модификации Беннхольда является наиболее часто используемым способом выявления амилоида, что обусловлено прежде всего высокой специфичностью данного метода (Коржевский, Гилларов, 2010; Шавловский, 2010). В связи с этим можно с уверенностью утверждать, что выявленные нами во внутренних органах мышей mdx конгофильные скопления имеют амилоидную природу. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными, свидетельствующими об обнаружении амилоидных скоплений у пациентов с разными типами миодистрофий. Так, например, показано, что у больных с мышечной дистрофией, вызванной мутацией в гене аноктамина 5 или мутацией в гене дисферлина, наблюдается отложение амилоида в мышечной ткани (Spuler et al., 2008; Milone et al., 2012). При этом данные о наличии амилоидных скоплений в других органах больных миодистрофиями в литературе отсутствуют. Для пациентов с МДД подобных исследований, направленных на выявление амилоида в различных органах и тканях организма, выполнено не было. В связи

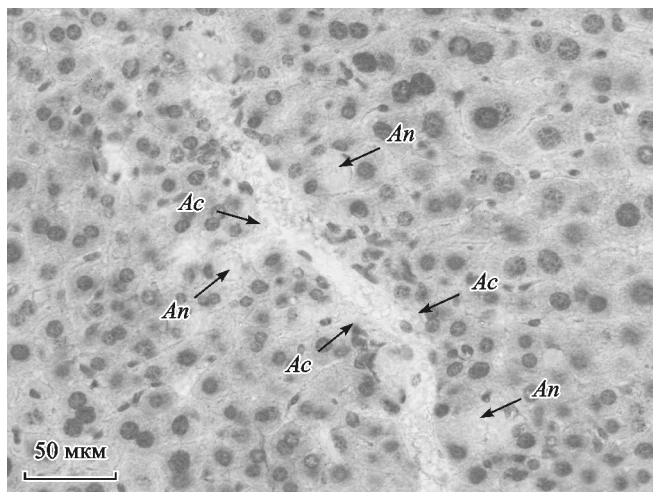


Рис. 2. Результаты гистохимического окрашивания Конго красным препаратов печени мыши mdx № 625.

Ac — отложения амилоида в стенке кровеносного сосуда и в периваскулярной соединительной ткани, An — обособленные амилоидные скопления внутри печеночной дольки. Ядра клеток окрашены гематоксилином Джилла с последующим подсинением в аммиачной воде.

с этим полученные нами данные о развитии амилоидоза в сердце, почке и печени мышей mdx могут служить важной предпосылкой для проведения клинических исследований с целью обнаружения данной системной патологии у пациентов с МДД.

Белковый состав амилоидных отложений у мышей mdx. Как уже отмечено выше, в составе амилоида, выделенного из ткани почки мыши № 625, нами идентифицированы (в качестве наиболее вероятных) два белка — витронектин и апоА-II. Полученные данные о присутствии этих белков в составе амилоидных скоплений у мышей mdx согласуются с имеющимися в литературе сведениями, свидетельствующими о принципиальной возможности участия витронектина и апоА-II в формировании амилоидных агрегатов у животных и человека. Так, ранее показано, что витронектин (S-белок системы комплемента) — гликопротеин с мол. массой 75 кДа, являющийся одним из компонентов плазмы крови и внеклеточного матрикса, присутствует в составе амилоидных отложений у людей с амилоидозом разной этиологии в качестве дополнительного компонента к главному амилоидогенному белку. Например, витронектин обнаружен в составе депозитов амилоида при болезни Альцгеймера (Shin et al., 2008), системном амилоидозе (Mullins et al., 2000) и гломерулонефрите (Ogawa et al., 1994). У человека описаны также случаи амилоидоза, характеризующегося образованием фибрилл апоА-II, который является вторым по значимости аполипопротеином липопротеинов высокой плотности. У мышей апоА-II является предшественником амилоидных фибрилл, формирующихся при старении. АпоА-II синтезируется преимущественно в печени, однако экспрессия мРНК апоА-II была обнаружена также в железистых клетках желудка, некоторых энтероцитах и клетках крипт тонкого кишечника, клетках слизистой оболочки языка и части клеток кожи. При этом авторы подчеркивают отсутствие экспрессии апоА-II в сердце (Fu et al., 2001).

Отложения амилоида в почке мышей mdx. Обнаружение в различных органах мышей mdx ряда патологических изменений, напрямую не связанных с дегенерацией скелетной мускулатуры, ставит вопрос о механизмах, обеспечивающих развитие данной патологии, и характере ее связи с мутацией в гене белка дистрофина. В норме данный белок имеет мол. массу 427 кДа (Dp427), однако ген дистрофина кодирует также несколько коротких изоформ, длина которых составляет 260, 140, 116 и 71 кДа (Dp260, Dp140, Dp116 и Dp71 соответственно). В исследовании Токарц и соавторов методом ПЦР в реальном времени показана экспрессия (синтез) нормально-го дистрофина (Dp427) и различных его изоформ в скелетной мышце, сердце, мозге, сетчатке, кишечнике, почке, печени, легком, селезенке, желудке, тимусе, семенниках и матке мышей дикого типа (C57BL/6J) (Tokarz et al., 1998). При этом авторы полагают, что короткие изоформы дистрофина могут иметь свои уникальные функции в разных тканях. Это отчасти подтверждается данными, свидетельствующими о развитии у мышей mdx ряда патологических изменений, напрямую не связанных с дистрофией мышечной ткани. Так, морфологические исследования почек мышей mdx показали наличие диффузных кровоизлияний в корковом и мозговом веществе, а также уменьшение просвета между капсулой Боумена—Шумлянського и капиллярным клубочком почечного тельца (Oliveira et al., 2013). Результаты наших исследований также свидетельствуют о присутствии патологиче-

ских изменений в почке мышей mdx, проявляющихся в увеличении размеров некоторых почечных телец и дистрофических изменениях эпителия канальцев.

Вероятно, часть обнаруженных патологических изменений связана с мутацией в гене дистрофина. Известно, что в почке грызунов в норме экспрессируются (синтезируются) как нормальный дистрофин, так и его короткие изоформы Dp71 (Lumeng et al., 1999) и Dp140 (Lidov, Kunkel, 1998). Согласно результатам ряда исследований, все три формы дистрофина — Dp427, Dp140 и Dp71 — преимущественно локализованы в базальной части эпителиальных клеток почечных канальцев (Lidov, Kunkel, 1998; Lumeng et al., 1999). Данные белки, по мнению авторов, необходимы для поддержания нормальной структуры мембран эпителиальных клеток и вовлечены в закоривание транспортеров и ионных каналов на базальной мембране (Haenggi, Fritschy, 2006). С этой точки зрения кажется вполне возможным, что уменьшение количества или отсутствие дистрофина и его изоформ вследствие мутации в соответствующем гене может приводить к патологическим изменениям в эпителии почечных канальцев. Однако это не объясняет обнаруженную патологию в структуре почечных телец, где, согласно литературным данным, ген дистрофина не экспрессируется (Lumeng et al., 1999). Мы полагаем, что развитие данной патологии может быть объяснено накоплением амилоида, компоненты которого поступают из сыворотки крови. В соответствии с данным предположением наиболее обширные скопления амилоида обнаружены нами именно в почечных тельцах, где и располагаются структуры фильтрационного барьера. Интересно, что аналогичный характер накопления амилоида характерен для пациентов с системным амилоидозом, для которых заболевания почек являются частым проявлением болезни и при отсутствии лечения обычно прогрессируют до терминальной стадии почечной недостаточности (Dember, 2006). Здесь важно отметить, что результаты нескольких клинических исследований свидетельствуют об обнаружении почечной недостаточности у пациентов с МДД (Motoki et al., 2015). Зафиксированы также случаи смерти пациентов от острой почечной недостаточности на фоне сохраненной сердечной функции (Matsumura et al., 2012). При этом поиск возможной связи между развитием данной патологии и амилоидозом в упомянутых случаях не проводился. В свете представленных нами данных о развитии амилоидоза в почках мышей mdx очевидно, что подобные случаи, сопровождающиеся развитием патологии почек у пациентов с МДД, должны быть тщательно проанализированы на предмет присутствия в тканях почек амилоида.

Амилоид в миокарде мышей mdx. В рамках проведенного исследования нами показано присутствие амилоидных скоплений в миокарде мышей линии mdx (случаи № 616, 624, 625 и 632). Данное обстоятельство может иметь важное значение, в связи с тем что нарушение сердечной деятельности является одним из характерных признаков МДД. Развитие кардиомиопатии, сопровождающейся нарушениями сердечного ритма, изменениями параметров ЭКГ и эхокардиографии, отмечено у 95 % пациентов с диагнозом МДД старше 20 лет (Wehling-Henricks et al., 2005; McNally, 2008; Faysoil et al., 2010; Shirokova, Niggli, 2013). Гистологический анализ образцов тканей сердца, полученных при вскрытии умерших с прижизненным диагнозом МДД, выявил наличие обширного фиброза, развивающегося преимущественно в заднеинфундальной части стенки левого желудочка сердца.

Именно развитие фиброза многие исследователи считают главной причиной, обуславливающей появление функциональных нарушений деятельности сердца, наблюдаемых у пациентов с МДД (Moriuchi et al., 1993).

Мыши линии mdx, как и пациенты с МДД, характеризуются наличием признаков нарушения сердечной деятельности, таких как аритмия, тахикардия, отклонения в параметрах ЭКГ и эхокардиографии (Chu et al., 2002; Lohan et al., 2005). Полученные нами в ходе гистохимического исследования данные о патологическом изменении миокарда мышей линии mdx согласуются с имеющимися в литературе сведениями о наличии в миокарде этих мышей признаков фиброза, некроза, лимфоидной инфильтрации и деструкции ядер кардиомиоцитов (Bridges, 1986; Михайлов и др., 1998; Nakamura et al., 2002; Ameen, Robson, 2010).

На сегодняшний день вопрос о механизмах, приводящих к развитию патологии сердца у мышей mdx и людей с МДД, остается открытым. Большинство исследователей полагают, что в обоих случаях дефицит полноразмерного (427 кДа) белка дистрофина вызывает нарушение структуры дистрофин-гликопротеинового комплекса, локализованного в мембране кардиомиоцитов, что приводит к увеличению хрупкости плазматической мембраны, а также к конформационным изменениям встроенных в мембрану кальциевых каналов. Нарушение работы данных каналов в свою очередь вызывает аномальное накопление ионов кальция в цитоплазме клеток, что приводит к активации Ca^{2+} -зависимых протеаз, интенсификации протеолитических процессов и митохондриальной дисфункции. Результатом описанных событий является запуск процесса апоптоза и (или) некроза кардиомиоцитов (Franco-Oregon et al., 1994; Pasternak et al., 1995; Alderton et al., 2000). Другой возможной причиной гибели кардиомиоцитов в сердце мышей mdx может быть окислительный стресс. Так, ранее показано, что в экстракте тотальной ДНК миокарда мышей mdx, содержащихся в обычных условиях, присутствуют фрагменты ДНК размером 65 т. п. н. и более, что указывает на повреждение ДНК этих клеток (Михайлов и др., 1998). Усиление окислительного стресса интенсифицирует образование двухнитевых разрывов и низкомолекулярных фрагментов ДНК, что, по мнению авторов, и является причиной включения апоптоза КМЦ (Казаков, Михайлов, 2001; Михайлов и др., 2001; Михайлов, Веженкова, 2007). Важно отметить, что, согласно данным литературы, повышенный окислительный стресс может быть причиной образования амилоидных фибрилл. Так, показано, что при болезни Альцгеймера измененные под воздействием активных форм кислорода фосфолипиды могут стимулировать образование амилоидных фибрилл (Abramov et al., 2011; Evangelisti et al., 2013; Cervellati et al., 2014). Возможно, повышенный окислительный стресс, описанный для кардиомиоцитов мышей mdx (Казаков, Михайлов, 2001; Михайлов, Веженкова, 2007), также является причиной окислительной модификации белков, что в свою очередь приводит к увеличению их амилоидогенности и развитию амилоидоза в сердце мышей mdx.

Полученные нами данные об отложении амилоида в миокарде мышей mdx могут внести существенное дополнение в существующие представления о причинах развития кардиомиопатии, ассоциированной с МДД. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что у людей с диагностированным амилоидозом сердца клинические проявления нарушений в работе органа сходны с та-

ковыми, описанными для пациентов с МДД. Кроме того, морфологический анализ биоптатов сердца пациентов с амилоидозом (Quarta et al., 2012) показал, что в данном случае локализация амилоидных скоплений совпадает с описанной нами в миокарде мышей mdx — и в случае амилоидоза, и в случае мышечной дистрофии амилоид локализуется в межмышечных прослойках соединительной ткани. Эти данные позволяют предположить, что накопление амилоида в сердце при мышечной дистрофии наряду с фиброзом может вносить существенный вклад в развитие кардиомиопатии и ее клинических проявлений, наблюдаемых у больных МДД. Косвенным свидетельством этого может служить также тот факт, что наличие амилоидных скоплений в миокарде мышей mdx выявлено нами только у животных в возрасте 1—1.5 года. Это хорошо согласуется с имеющимися в литературе данными о том, что дилатационная кардиомиопатия развивается у мышей mdx в возрасте 42 нед, в то время как у более молодых животных (8 и 29 нед) не выявляется признаков патологии на ЭКГ (Quinlan et al., 2004).

Таким образом, в рамках настоящей работы подтверждена гипотеза о возможности накопления амилоида во внутренних органах мышей линии mdx. Показано присутствие амилоидных скоплений в сердце, почке и печени мышей mdx, подробно описана и проанализирована локализация данных скоплений в каждом из исследованных органов. На основании результатов масс-спектрометрического исследования установлено, что наиболее вероятными белками, входящими в состав амилоидных скоплений у мышей mdx, являются витронектин и апоА-II. Анализ полученных в ходе проведенного исследования результатов и данных литературы позволил сформулировать несколько предположений относительно механизмов развития амилоидоза у мышей линии mdx, а также возможного вклада обнаруженного отложения амилоида в развитие ряда патологических изменений, напрямую не связанных с дистрофией скелетной мускулатуры, как у мышей mdx, так и у людей с МДД.

Список литературы

- Горбунова В. Н., Савельева-Васильева Е. А., Красильников В. В. 2000. Молекулярная неврология: заболевания нервно-мышечной системы. СПб.: Интермедика. 320 с. (Gorbunova V. N., Saveleva-Vasileva E. A., Krasilnikov V. V. 2000. Diseases of neuromuscular system. Molecular neurology. St. Petersburg: Intermedica. 320 p.)
- Казаков В. И., Михайлов В. М. 2001. Фрагментация ДНК кардиомиоцитов мышей mdx и C57BL/6 после стресса. Цитология. 43 (1): 72—75. (Kazakov V. I., Mikhailov V. M. 2001. DNA fragmentation in cardiomyocytes of mdx and C57Bl mice Tsitologiya. 43 (1): 72—75.)
- Коржневский Д. Э., Гиляров А. В. 2010. Основы гистологической техники. СПб.: СпецЛит. 95 с. (Korzhnevskiy D. E., Gilyarov A. V. 2010. Basics of histological techniques. St. Petersburg: SpecLit. 95 p.)
- Михайлов В. М., Веженкова И. В. 2007. Двухнитевые разрывы ДНК кардиомиоцитов мышей C57BL и mdx после динамического стресса. Цитология. 49 (5): 401—406. (Mikhailov V. M., Vezhenkova I. V. 2007. Double strand DNA breaks in C57Bl and mdx mice cardiomyocytes after dynamical stress. Tsitologiya. 49 (6): 491—496.)
- Михайлов В. М., Казаков В. И., Комаров С. А., Нилова В. К., Штейн Г. И., Баранов В. С. 1998. Апоптоз и деградация ДНК кардиомиоцитов мышей mdx и C57Bl. Цитология. 40 (5): 401—406. (Mikhailov V. M., Kazakov V. I., Komarov S. A., Nilova V. K., Shtein G. I., Baranov V. S. 1998. Apoptosis and DNA

degradation of cardiomyocytes of mdx and C57Bl mice. *Tsitologiya*. 40 (5) : 401—406.)

Михайлов В. М., Комаров С. А., Нилова В. К., Штейн Г. И., Баранов В. С. 2001. Ультраструктурный и морфометрический анализ стадий апоптоза кардиомиоцитов мышей mdx. *Цитология*. 43(8) : 729—737. (Mikhailov V. M., Komarov S. A., Nilova V. K., Shtein G. I., Baranov V. S. 2001. Ultrastructural and morphometrical analysis of apoptosis stages in cardiomyocytes of MDX mice. *Tsitologiya*. 43 (8) : 729—737.)

Шавловский М. М. 2010. Молекулярные и генетические основы этиопатогенеза амилоидозов. *Мед. акад. журн.* 10 (4) : 63—81. (Schavlovsky M. M. 2010. Etiology and pathogenesis of amyloidosis: the molecular and genetic basis. *Med. Acad. J.* 10 (4) : 63—81.)

Abramov A. Y., Ionov M., Pavlov E., Duchon M. R. 2011. Membrane cholesterol content plays a key role in the neurotoxicity of β -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Aging Cell*. 10 : 595—603.

Alderton J. M., Steinhardt R. A. 2000. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J. Biol. Chem.* 275 : 9452—9460.

Ameen V., Robson L. G. 2010. Experimental models of Duchenne muscular dystrophy: relationship with cardiovascular disease. *Open Cardiovasc. Med. J.* 4 : 265—277.

Bridges L. R. 1986. The association of cardiomyocyte necrosis and inflammation with the degenerative and persistent myopathy of MDX mice. *J. Neurol. Sci.* 72 : 147—157.

Bulfield G., Siller W. G., Wight P. A., Moore K. J. 1984. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 81 : 1189—1192.

Cervellati C., Romani A., Seripa D., Cremonini E., Bosi C., Magon S., Bergamini C. M., Valacchi G., Pilotto A., Zuliani G. 2014. Systemic oxidative stress and conversion to dementia of elderly patients with mild cognitive impairment. *Biomed Res. Int.* 2014 : 1—7.

Chu V., Otero J. M., Lopez O., Sullivan M. F., Morgan J. P., Amende I., Hampton T. G. 2002. Electrocardiographic findings in mdx mice: a cardiac phenotype of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 26 : 513—519.

De la Porte S., Morin S., Koenig J. 1999. Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice. *Int. Rev. Cytol.* 191 : 99—148.

Dember L. M. 2006. Amyloidosis-associated kidney disease. *J. Amer. Soc. Nephrol.* 17 : 3458—3471.

Durbeej M., Campbell K. P. 2002. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 12 : 349—361.

Evangelisti E., Wright D., Zampagni M., Cascella R., Fiorillo C., Bagnoli S., Relini A., Nichino D., Scartabelli T., Nacmias B., Sorbi S., Cecchi C. 2013. Lipid rafts mediate amyloid-induced calcium dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 10 : 143—153.

Fayssol A., Nardi O., Orlikowski D., Annane D. 2010. Cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy: pathogenesis and therapeutics. *Heart Fail. Rev.* 15 : 103—107.

Franco-Obregon A. Jr., Lansman J. B. 1994. Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. *J. Physiol.* 481 : 299—309.

Fu L., Matsuyama I., Chiba T., Xing Y., Korenaga T., Guo Z., Fu X., Nakayama J., Mori M., Higuchi K. 2001. Extrahepatic expression of apolipoprotein A-II in mouse tissues: possible contribution to mouse senile amyloidosis. *J. Histochem. Cytochem.* 49 : 739—748.

Haenggi T., Fritschy J. M. 2006. Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cell Mol. Life Sci.* 63 : 1614—1631.

Koenig M., Beggs A. H., Moyer M., Scherpf S., Heindrich K., Bettecken T., Meng G. 1989. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Amer. J. Hum. Genet.* 45 : 498—506.

Kristen J. N., Kay E. D. 2004. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep.* Sep. 5 : 872—876.

Lidov H. G., Kunkel L. M. 1998. Dystrophin and Dp140 in the adult rodent kidney. *Lab. Invest.* 78 : 1543—1551.

Lohan J., Culligan K., Ohlendieck K. 2005. Deficiency in cardiac dystrophin affects the abundance of the dystroglycan complex. *J. Biomed. Biotechnol.* 1 : 28—36.

Lumeng C. N., Hauser M., Brown V., Chamberlain J. S. 1999. Expression of the 71 kDa dystrophin isoform (Dp71) evaluated by gene targeting. *Brain Res.* 830 : 174—178.

Manning J., O'Malley D. 2015. What has the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy contributed to our understanding of this disease? *J. Muscle Res. Cell Motil.* 36 : 155—167.

Matsumura T., Saito T., Fujimura H., Sakoda S. 2012. Renal dysfunction is a frequent complication in patients with advanced stage of Duchenne muscular dystrophy. *Rinsho Shinkeigaku*. 52 : 211—217.

McNally E. M. 2008. Duchenne muscular dystrophy: how bad is the heart? *Heart*. 94 : 976—977.

Milone M., Liewluck T., Winder T. L., Pianosi P. T. 2012. Amyloidosis and exercise intolerance in ANO5 muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 22 : 13—15.

Moriuchi T., Kagawa N., Mukoyama M., Hizawa K. 1993. Autopsy analyses of the muscular dystrophies. *Tokushima J. Exp. Med.* 40 : 83—93.

Motoki T., Shimizu-Motohashi Y., Komaki H., Mori-Yoshimura M., Oya Y., Takeshita E., Ishiyama A., Saito T., Nakagawa E., Sugai K., Murata M., Sasaki M. 2015. Treatable renal failure found in non-ambulatory Duchenne muscular dystrophy patients. *Neuromuscul. Disord.* 25 : 754—757.

Mullins R. F., Russell S. R., Anderson D. H., Hageman G. S. 2000. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J.* 14 : 835—846.

Nakamura A., Yoshida K., Takeda S., Dohi N., Ikeda S. 2002. Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin by physical exercise, in hearts of mdx mice. *FEBS Lett.* 520 : 18—24.

Ogawa T., Yorioka N., Yamakido M. 1994. Immunohistochemical studies of vitronectin, C5b-9, and vitronectin receptor in membranous nephropathy. *Nephron*. 68 : 87—96.

Oliveira D. M., Santos A. C., Bertassoli B. M., Viana D. C., Prado A. A. F., Assis Neto A. C. 2013. Comparative study of the kidneys from dystrophic mice. *J. Morphol. Sci.* 30 : 186—190.

Pasternak C., Wong S., Elson E. L. 1995. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J. Cell Biol.* 128 : 355—361.

Quarta C. C., Kruger J. L., Falk R. H. 2012. Cardiac amyloidosis. *Circulation*. 126 : e178—e182.

Quinlan J. G., Hahn H. S., Wong B. L., Lorenz J. N., Wernisch A. S., Levin L. S. 2004. Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul. Disord.* 14 : 491—496.

Shin T. M., Isas J. M., Hsieh C. L., Kaye R., Glabe C. G., Langen R., Chen J. 2008. Formation of soluble amyloid oligomers and amyloid fibrils by the multifunctional protein vitronectin. *Molecular Neurodegeneration*. 3 : 16.

Shirokova N., Niggli E. 2013. Cardiac phenotype of Duchenne muscular dystrophy: insights from cellular studies. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 58 : 217—224.

Spuler S., Carl M., Zabojszcza J., Straub V., Bushby K., Moore S. A., Bähring S., Wenzel K., Vinkemeier U., Rocken C. 2008. Dysferlin-deficient muscular dystrophy features amyloidosis. *Ann. Neurol.* 63 : 323—328.

Tokarz S. A., Duncan N. M., Rash S. M., Sadeghi A., Dewan A. K., Pillers D. A. 1998. Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of duchenne muscular dystrophy. *Mol. Genet. Metab.* 65 : 272—281.

Wagner K. R., Lechtzin N., Judge D. P. 2007. Current treatment of adult Duchenne muscular dystrophy. *Biochim. biophys. acta.* 1772 : 229—237.

Wehling-Henricks M., Jordan M. C., Roos K. P., Deng B., Tidball J. G. 2005. Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hearts is

prevented by expression of a neuronal nitric oxide synthase transgene in the myocardium. *Hum. Mol. Genet.* 14 : 1921—1933.

Поступила 28 IV 2016

CHARACTERISTICS OF AMYLOID DEPOSITS DETECTED IN THE INTERNAL ORGANS OF mdx MICE

V. V. Gusel'nikova,¹ * A. Ya. Gudkova,^{2,3} E. N. Semernin,^{2,3} N. A. Grudinina,^{1,2} A. N. Krutikov,²
M. M. Shavlovsky,¹ B. L. Milman,³ D. E. Korzhevskiy,^{1,3} E. V. Mikhailova,⁴
E. V. Kaminskaja,⁴ V. M. Mikhailov⁴

¹ Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376,

² Federal V. A. Almazov North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, 197341,

³ I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Institute of Cardiovascular Diseases,
St. Petersburg, 197022, and

⁴ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

* e-mail: Guselnicova.Valeriia@yandex.ru

The dystrophin-deficient mdx mouse is the most commonly used experimental model of Duchenne muscular dystrophy (DMD). Although the amyloid has been shown in the muscle biopsies of patients with different types of muscular dystrophies, there are no data on the amyloid accumulations in the biopsy of DMD patients or mdx mouse. Therefore, the aim of the present study was to testify the hypothesis of probable accumulation of amyloid in the visceral organs of mdx mouse. Specimens of myocardium, kidneys, and liver of male and female mdx mice aged from 2 months to 1.5 years (n = 9) were used in the study. The histochemical staining with Congo red demonstrated amyloid accumulations in the studied organs of the mdx mice. Morphology and localization of the found accumulations were described in details and analyzed. The mass-spectrometric study determined the vitronectin and apolipoprotein A-II as the most probable components of the amyloid accumulations in the mdx mouse.

Key words: amyloid, mdx mouse, Congo red, mass-spectrometry.