

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИНАТРИЕВОЙ СОЛИ ПРОИЗВОДНОГО ФЛУОРЕНА В КАЧЕСТВЕ НОВОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОТЛОЖЕНИЙ АМИЛОИДА В МИОКАРДЕ МЫШЕЙ mdx

© В. В. Гусельникова,<sup>1,\*</sup> О. И. Антимонова,<sup>1,2</sup> Е. А. Федорова,<sup>1</sup>  
М. М. Шавловский,<sup>1, 3—5</sup> А. Н. Крутиков,<sup>2</sup> Е. В. Михайлова,<sup>4</sup> Е. В. Каминская,<sup>4</sup>  
А. Я. Гудкова,<sup>2,3</sup> Д. Э. Коржевский,<sup>1,3</sup> В. М. Михайлов<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376,

<sup>2</sup> Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова  
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, 197341,

<sup>3</sup> Первый С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова  
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, 197022,

<sup>4</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и

<sup>5</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова  
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, 195067;

\* электронный адрес: [Guselnicova.Valeriia@yandex.ru](mailto:Guselnicova.Valeriia@yandex.ru)

Целью настоящей работы стала разработка нового способа выявления амилоидных отложений, обнаруживаемых у лабораторных животных, при помощи аналога конго красного, синтезированного на основе диаминофлуорена. Аналог представляет собой динатриевую соль 2,7-(1-амино-4-сульфо-2-нафтилазо)флуорена (ДСНАФ). Материалом для исследования служили образцы миокарда мышей линии mdx обоего пола в возрасте от 1 до 1.5 года (n = 8). Результатом проведенного исследования стала разработка оптимального протокола окраски амилоида раствором ДСНАФ. Показано, что по чувствительности и специфичности выявления амилоида разработанный метод сопоставим с окраской конго красным. При этом несомненными преимуществами использования ДСНАФ являются устойчивость получаемого окрашивания, высокая интенсивность флуоресценции амилоидных скоплений и полное отсутствие фоновой флуоресценции, что значительно упрощает процедуру количественной оценки полученных результатов. Метод окраски амилоида ДСНАФ характеризуется простотой и хорошей воспроизводимостью. Все это делает разработанный способ очень удобным для выявления амилоидных скоплений на гистологических срезах тканей у мышей, а дальнейшие исследования позволят судить о возможности применения данного метода окраски для диагностики амилоидоза в практике клинических исследований.

Ключевые слова: амилоид, конго красный, 2,7-(1-амино-4-сульфо-2-нафтилазо)флуорен, мыши mdx, миокард, конфокальная лазерная микроскопия.

Принятые сокращения: ДСНАФ — динатриевая соль 2,7-(1-амино-4-сульфо-2-нафтилазо)флуорена.

Амилоид — общее название внеклеточных агрегатов, главным компонентом которых являются белки, способные формировать нитевидные структуры — фибриллы (Шавловский, 2010; Gillmore, Hawkins, 2013). В настоящее время известно 36 белков человека, которые обнаружены в качестве главных компонентов в составе амилоидов (Sipe et al., 2016). Отложение амилоида первоначально не сопровождается какими-либо специфичными проявлениями, поэтому диагностика амилоидоза полностью зависит от гистологической идентификации амилоида в тканях. Чтобы отличить амилоид от других отложений, чаще всего применяют гистохимические методы, среди которых наиболее широко используемым является окрашивание конго красным (Коржевский, Гиляров, 2010; Рыбакова и др., 2013; Raghunathan et al., 2017). Данный краситель способен регулярно встре-

иваться между амилоидными фибриллами, что придает красное окрашивание амилоиду при световой микроскопии и зеленый цвет при микроскопии в поляризованном свете (Bennhold, 1922; Sipe et al., 2016). Именно окраска конго красным является на сегодняшний день стандартом диагностики амилоидоза (Коржевский, Сухорукова, 2013; Real de Asúa et al., 2014; Sipe et al., 2016). Однако несмотря на повсеместное применение, данный метод идентификации амилоидных отложений имеет ряд недостатков, среди которых можно отметить присутствие фонового окрашивания неамилоидного компонента ткани, непостоянство зеленого оттенка амилоидных скоплений в поляризованном свете, а также присутствие фоновой флуоресценции (при использовании методов флуоресцентной или конфокальной микроскопии).

Наличие данных недостатков обуславливает тот факт, что окрашивание амилоида требует наличия большого опыта проведения соответствующих гистохимических исследований, при отсутствии которого возрастает риск получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов. В случае клинической диагностики амилоидозов возникающие трудности отчасти удается решить благодаря применению иммуногистохимических методов с использованием антител к основным типам амилоидогенных белков (Kebbel, Rocken, 2006). Однако вследствие видоспецифичности данных антител их применение невозможно при проведении исследований на лабораторных животных, в частности на мышцах, которые на протяжении многих лет используются для создания биологических моделей заболеваний, связанных с накоплением амилоида (Solomon et al., 1999; Vuxbaum, 2009). В связи с этим актуальным представляется создание новых простых и чувствительных методов селективной окраски амилоида.

Целью данной работы стала разработка нового способа выявления амилоидных отложений, обнаруживаемых у лабораторных животных, при помощи аналога конго красного, синтезированного на основе флуорена. Ранее мы показали, что у мышей линии mdx, используемых в качестве экспериментальной модели мышечной дистрофии Дюшенна, при старении наблюдается накопление амилоида во внутренних органах (преимущественно в сердце и почках) (Гусельникова и др., 2016). В связи с этим использование мышей mdx представляется удобным для сравнительного исследования особенностей идентификации амилоида разными методами.

### Материал и методика

Использованный препарат, представляющий собой динатриевую соль 2,7-(1-амино-4-сульфо-2-нафтилазо)флуорена (ДСНАФ), получили в результате синтеза и очистки целевого соединения в лабораторных условиях с последующим анализом синтезированного вещества с применением метода масс-спектрометрии. Предварительные исследования показали, что в присутствии фибрилл амилоидогенных белков наблюдается существенное возрастание интенсивности флуоресценции красителя (данные не представлены).

Материалом для гистохимического исследования служили образцы миокарда мышей mdx обоего пола в возрасте от 1 до 1,5 года ( $n = 8$ ). С животными обращались в соответствии с «Руководством по работе с лабораторными животными» Национального института здоровья США. Сразу после цервикальной дислокации образцы миокарда левого и правого желудочков и предсердий мышей фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде (Korzhevskii et al., 2015) или 10%-ном забуференном формалине. После стандартной гистологической проводки материал заливали в парафиновые блоки по общепринятой методике и делали срезы толщиной 5 мкм. Часть срезов окрашивали 0,5%-ным водным раствором конго красного (Sigma-Aldrich, США) по методике, использованной ранее (Гусельникова и др., 2016), другие срезы (тех же случаев) окрашивали водным раствором ДСНАФ.

Идентификацию амилоидных отложений по результатам гистохимического исследования проводили с использованием микроскопии проходящего света, флуорес-

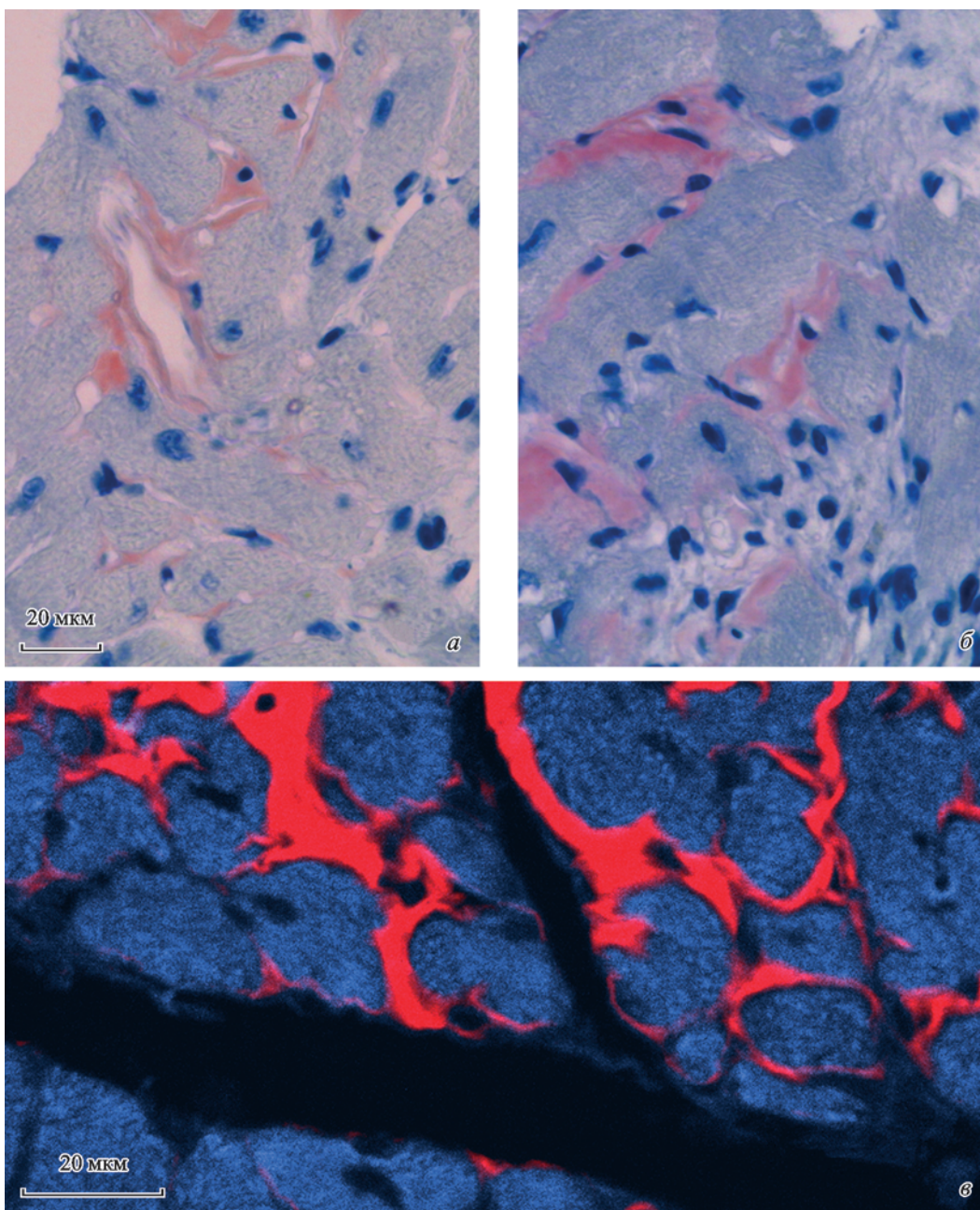
центной микроскопии и микроскопии в поляризованном свете. Для получения изображений в конфокальном микроскопе использовали одиночный оптический срез, для возбуждения флуоресценции — лазер 561 нм, для возбуждения автофлуоресценции мышечной ткани — диодный лазер 405 нм.

### Результаты

Предварительное изучение свойств ДСНАФ показало, что в водном растворе это соединение проявляет свойства флуоресцентного красителя. При этом при взаимодействии красителя с фибриллами модельных амилоидогенных белков *in vitro* наблюдали усиление флуоресценции красителя (данные не представлены). Эти данные послужили основанием для предположения о возможности эффективного использования данного вещества в качестве флуоресцентной пробы на амилоид. В ходе отработки методики окрашивания получили оптимальный протокол окраски амилоида раствором ДСНАФ. После депарафинизации и регидратации срезов обычным способом срезы промывали в дистиллированной воде в течение 5 мин, после чего на них наносили необходимое количество раствора гематоксилина (например, квасцового гематоксилина Джилла) (Коржевский, 2007) и инкубировали 1 мин при комнатной температуре. После удаления раствора гематоксилина со срезов стекла инкубировали в щелочной воде (70 мкл 10%-ного водного раствора аммиака на 100 мл дистиллированной воды) в течение 1 мин и промывали в дистиллированной воде. На срезы наносили 0,035—0,2%-ный водный раствор ДСНАФ, перемещали препараты во влажную камеру и инкубировали при 27 °С в течение 5 мин. Затем краситель удаляли и промывали препараты в дистиллированной воде в течение 10 мин. Окрашенные препараты помещали в водорастворимую заключающую среду Fluorescent Mounting Medium (Dako, США) под покровное стекло.

Анализ препаратов миокарда мышей линии mdx, окрашенных конго красным и его аналогом, проводили с применением методов световой (см. рисунок, *a*, *b*) и флуоресцентной микроскопии (см. рисунок, *в*). В результате анализа различий в характере распределения амилоидных скоплений при окраске срезов ДСНАФ в сравнении с окрашиванием конго красным не обнаружили. Во всех исследованных случаях обширные скопления амилоида обнаружены в миокарде левого желудочка сердца мышей mdx (см. рисунок). В миокарде правого желудочка и предсердий амилоид также присутствовал, но в значительно меньшем количестве. Скопления амилоида выявлены в межмышечных прослойках соединительной ткани и периваскулярно (преимущественно в субэндокардиальной области) (см. рисунок). Амилоид присутствовал и непосредственно в толще миокарда левого желудочка. Сведения о локализации отложений амилоида в сердце мышей линии mdx полностью согласуются с данными, полученными ранее с применением классического метода окраски конго красным (Гусельникова и др., 2016a).

Сопоставление результатов окраски препаратов конго красным с результатами, полученными при использовании разработанного аналога, позволило отметить ряд различий. При использовании световой микроскопии в случае применения ДСНАФ скопления амилоида характеризовались более насыщенным красновато-розовым окрашиванием (см. рисунок, *b*), в то время как при ис-



Репрезентативные микрофотографии амилоида в миокарде левого желудочка мышей линии mdx, окрашенного 0.5%-ным водным раствором конго красного (*а*) и 0.2%-ным раствором динатриевой соли 2,7-(1-амино-4-сульфо-2-нафтилазо)флуорена (*б*, *в*).

*а*, *б* — микроскопия в проходящем свете; *в* — конфокальная лазерная микроскопия. Масштабные отрезки — 20 мкм.

пользовании конго красного амилоид имел оранжево-розовый цвет (см. рисунок, *а*). При этом эквивалентное по интенсивности окрашивание достигалось при использовании нового красителя в концентрации 0.2%. Мышечная ткань сердца, в случае использования классической окраски имеющая голубовато-серый цвет (см. рисунок, *а*), при использовании нового красителя характеризовалась более темным синим оттенком, что, вероятно, связано с полным отсутствием фоновой окраски. Этот эффект визуально увеличивал контрастность амилоида (см. рисунок, *б*), что может иметь значение при выявлении его незначительных агрегатов в тканях.

При использовании метода конфокальной микроскопии отмечено, что применение ДСНАФ позволяет полу-

чить очень высокую интенсивность флуоресценции амилоида в красном диапазоне спектра (600—650 нм) (см. рисунок, *в*). При этом несомненными преимуществами данного красителя по сравнению с классической окраской конго красным являются его высокая селективность и полное отсутствие фоновой флуоресценции. Контрастность флуоресцентной визуализации амилоида можно повысить, возбуждая автофлуоресценцию мышечной ткани лазером с длиной волны 405 нм. В этом случае красная флуоресценция амилоида выглядит очень контрастно на фоне голубой автофлуоресценции мышечной ткани (см. рисунок, *в*).

В ходе отработки методики окрашивания амилоида ДСНАФ протестировано несколько растворов красителя

разной концентрации. Помимо 0.2%-ного раствора использовали 0.035%-ный и 0.01%-ный растворы ДСНАФ. Применение ДСНАФ в различных концентрациях показало, что оптимального уровня флуоресценции можно достичь при использовании 0.035%-ного раствора красителя. При этом применение более концентрированного 0.2%-ного раствора способно усилить флуоресценцию амилоида без усиления фоновой флуоресценции. Однако при использовании микроскопии в проходящем свете в случае применения 0.035%-ного раствора интенсивность окраски амилоида была существенно ниже по сравнению с результатами, полученными при использовании 0.2%-ного раствора ДСНАФ или 0.5%-ного раствора конго красного. Окраска амилоида, полученная при использовании 0.01%-ного раствора ДСНАФ, не визуализировалась при наблюдении препаратов в проходящем свете и характеризовалась слабой интенсивностью при использовании конфокальной микроскопии. В связи с этим авторы рекомендуют использовать 0.035—0.2%-ный раствор ДСНАФ при проведении флуоресцентной микроскопии.

### Обсуждение

В настоящее время известно несколько способов гистохимического выявления амилоида. Золотым стандартом его идентификации принято считать окрашивание конго красным (Коржевский, Сухорукова, 2013; Real de Asúa et al., 2014; Sipe et al., 2016), среди недостатков которого следует отметить присутствие фонового окрашивания, затрудняющего анализ препаратов в проходящем свете, а также наличие фоновой флуоресценции, проявляющейся при анализе препаратов методами флуоресцентной и конфокальной микроскопии. Снизить фоновое окрашивание, увеличить интенсивность флуоресценции амилоида и оптимизировать соотношение сигнал/фон позволяет модификация классической методики окрашивания конго красным, которая требует введения в протокол окраски дополнительного этапа нагревания срезов в уксусной кислоте (Гусельникова и др., 2016б). Известен также способ окраски амилоида тиофлавином (Biancalana, Koidec, 2010). При этом отмечено, что окраска тиофлавином Т, при которой определяют светло-зеленую флуоресценцию, более чувствительна, но менее специфична по сравнению с окраской конго красным. Сходные данные получены при использовании для идентификации амилоида олиготиофенов (Sjolander et al., 2015) — на фоне высокой чувствительности данного метода (98 %) также отмечается его относительно низкая по сравнению с окраской конго красным специфичность (41 %). В связи с этим для более точной диагностики амилоидоза рекомендуют применять сочетание методов (конго красный/тиофлавин или конго красный/олиготеофены), что существенно усложняет процедуру идентификации амилоида и увеличивает время ее проведения.

В настоящем исследовании нами показано, что для окраски амилоида может быть использовано производное флуорена ДСНАФ, которое ранее никогда не применялось для окрашивания амилоида на гистологических срезах. По чувствительности и специфичности выявления амилоида разработанный метод сопоставим с окраской конго красным. При этом несомненными преимуществами использования ДСНАФ для идентификации амилоида являются высокая интенсивность флуоресценции амило-

идных скоплений при полном отсутствии фоновой флуоресценции, а также устойчивость получаемой окраски амилоида.

Предложенный способ окрашивания характеризуется хорошей воспроизводимостью и простотой, что не предполагает непрерывного контроля дифференцировки окрашивания под микроскопом. Все это делает разработанный способ окраски амилоида очень удобным для выявления амилоидных скоплений на гистологических срезах тканей у мышей. Дальнейшие исследования, в частности оценка эффективности использования данного красителя для выявления амилоида в различных тканях человека, позволят судить о возможности применения разработанного метода окраски для диагностики амилоидоза в практике клинических исследований.

### Список литературы

- Гусельникова В. В., Гудкова А. Я., Семернин Е. Н., Грудинина Н. А., Крутиков А. Н., Шавловский М. М., Мильман Б. Л., Коржевский Д. Э., Михайлова Е. В., Каминская Е. В., Михайлов В. М. 2016а. Характеристика отложений амилоида, обнаруживаемых во внутренних органах мышей линии mdx. Цитология. 58 (10) : 763—770. (Gusel'nikova V. V., Gudkova A. Ya., Semernin E. N., Grudinina N. A., Krutikov A. N., Shavlovskii M. M., Mil'man B. L., Korzhevskii D. E., Mikhailova E. V., Kaminskaya E. V., Mikhailov V. M. 2017. Characterization of amyloid deposits found in internal organs of mdx mice. Cell tissue Biol. 11 (1) : 27—34.)
- Гусельникова В. В., Кирик О. В., Федорова Е. А., Шавловский М. М., Гудкова А. Я., Коржевский Д. Э. 2016б. Быстрый способ окраски амилоида конго красным для световой и флуоресцентной микроскопии. Морфология. 149 (2) : 84—88. (Gusel'nikova V. V., Kirik O. V., Fyodorova Ye. A., Shavlovskiy M. M., Gudkova A. Ya., Korzhevskiy D. E. 2016b. Rapid method of the amyloid staining with congo red for light and fluorescence microscopy. Morphologiya. 149 (2) : 84—88.)
- Коржевский Д. Э. 2007. Применение гематоксилина в гистологической технике. Морфология. 132 (6) : 77—82. (Korzhevskiy D. E. 2007. Application of hematoxylin in histological technique. Morphologiya. 132 (6) : 77—82.)
- Коржевский Д. Э., Гиляров А. В. 2010. Основы гистологической техники. СПб.: СпецЛит. 95 с. (Korzhevskiy D. E., Gilyarov A. V. 2010. Osnovy gistologicheskoi tekhniki (Basics of Histological Techniques). St. Petersburg: SpetsLit. 95 p.)
- Коржевский Д. Э., Сухорукова Е. Г. 2013. Гистохимические методы окрашивания гистологических препаратов. В кн.: Морфологическая диагностика. СПб.: СпецЛит. 85—97. (Korzhevskiy D. E., Sukhorukova E. G. 2013. Histochemical methods of histological slides staining. In: Morphological diagnostics. St. Petersburg: SpecLit. 85—97.)
- Рыбакова М. Г., Кузнецова И. А., Семернин Е. Н., Гудкова А. Я., Бармашева А. А. 2013. Информативность биопсии слизистой оболочки полости рта для диагностики системного амилоидоза. Арх. патол. 75 (5) : 3—7. (Rybakova M. G., Kuznetsova I. A., Semernin E. N., Gudkova A. Ya., Barmasheva A. A. 2013. The informative value of oral mucosal biopsy for the diagnosis of systemic amyloidosis. Arch. Pathol. 75 (5) : 3—7.)
- Шавловский М. М. 2010. Молекулярные и генетические основы этиопатогенеза амилоидозов. Мед. акад. журн. 10 (4) : 63—81. (Shavlovskiy M. M. 2010. Etiology and pathogenesis of amyloidoses: the molecular and genetic basis. Med. Acad. J. 10 (4) : 63—81.)
- Bennhold H. 1922. Eine spezifische amyloidfarbung mit Kongorot [Specific staining of amyloid with Congo red]. Munchener Medizinische Wochenschrift. 69 : 1537—1538.
- Biancalana M., Koidec S. 2010. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. Biochim. biophys. acta (BBA). Proteins and Proteomics. 1804 : 1405—1412.

Buxbaum J. N. 2009. Animal models of human amyloidoses: are transgenic mice worth the time and trouble? FEBS Lett. 583 : 2663—2673.

Gillmore J. D., Hawkins P. N. 2013. Pathophysiology and treatment of systemic amyloidosis. Nat. Rev. Nephrol. 9 : 574—586.

Kebbel A., Röcken C. 2006. Immunohistochemical classification of amyloid in surgical pathology revisited. Amer. J. Surg. Pathol. 30 : 673—683.

Korzhevskii D. E., Sukchorukova E. G., Kirik O. V., Grigorev I. P. 2015. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zink-ethanol-formaldehyde. Eur. J. Histochem. 59 : 233—237.

Raghunathan V., Louis D., Wirk B. 2017. Gastrointestinal tract amyloidosis presenting with pneumatosis intestinalis. J. Clin. Med. Res. 9 : 654—658.

Real de Asúa D., Costa R., Galván J. M., Filigheddu M. T., Trujillo D., Cadiñanos J. 2014. Systemic AA amyloidosis: epi-

demiology, diagnosis, and management. Clin. Epidemiol. 6 : 369—377.

Sipe J. D., Benson M. D., Buxbaum J. N., Ikeda S. I., Merlini G., Saraiva M. J., Westermarck P. 2016. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. Amyloid. 23 : 209—213.

Sjölander D., Bijzet J., Hazenberg B. P., Nilsson K. P., Hammarström P. 2015. Sensitive and rapid assessment of amyloid by oligothiophene fluorescence in subcutaneous fat tissue. Amyloid. 22 : 19—25.

Solomon A., Weiss D. T., Schell M., Hrnčić R., Murphy C. L., Wall J., McGavin M. D., Pan H. J., Kabalka G. W., Paulus M. J. 1999. Transgenic mouse model of AA amyloidosis. Amer. J. Pathol. 154 : 1267—1272.

Поступила 9 VIII 2017

FLUORENE DERIVATIVE DISODIUM SALT AS A NEW FLUORESCENT DYE FOR IDENTIFICATION OF AMYLOID DEPOSITS IN THE MYOCARDIUM OF mdx MICE

V. V. Gusel'nikova,<sup>1,\*</sup> O. I. Antimonova,<sup>1,2</sup> E. A. Fedorova,<sup>1</sup> M. M. Shavloskii,<sup>1,3–5</sup> A. N. Krutikov,<sup>2</sup> E. V. Mikhailova,<sup>4</sup> E. V. Kaminskaya,<sup>4</sup> A. Ya. Gudkova,<sup>2,3</sup> D. E. Korzhevskii,<sup>1,3</sup> V. M. Mikhailov<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376,

<sup>2</sup> V. A. Almazov North-Western Federal Medical Research Center, Ministry of Public Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 197341,

<sup>3</sup> St. Petersburg I. P. Pavlov State Medical University, Ministry of Public Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 197022,

<sup>4</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and

<sup>5</sup> North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov under the Ministry of Public Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 195067;

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

The aim of this study was to develop a new method for the detection of amyloid deposits found in laboratory animals using the analogue of Congo red, synthesized on the basis of diaminofluorene. The analogue is the disodium salt of 2,7-(1-amino-4-sulfo-2-naphthylazo)fluorene (DSNAF). Myocardial samples from mdx mice of both genders aged 1 to 1.5 years (n = 8) were used as the material for this study. As the main result of presented study, the optimal protocol for amyloid staining with DSNAF was developed. It has been shown that the sensitivity and specificity of amyloid detection by developed method is comparable with the Congo red staining. The undoubted advantages of DSNAF using are the stability of the resulting staining, high fluorescence intensity of amyloid deposits and complete absence of background fluorescence that greatly simplifies the procedure of quantitative evaluation of obtained results. The method of amyloid staining with DSNAF is characterized by simplicity and good reproducibility. Further research will allow to access to the future application of this method for diagnosis of amyloidosis in the practice of clinical research.

Key words: amyloid, Congo red, 7-(1-amino-4-sulfo-2-naphthylazo)fluorene, mdx mice, myocardium, confocal laser microscopy.