

ПРИМЕНЕНИЕ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АМИЛОИДНЫХ СКОПЛЕНИЙ В ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА

В. В. Гусельникова^{1,2}✉, Д. А. Суфиева¹, Д. Л. Цыба¹, Д. Э. Коржевский¹

¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

В последнее время метод флуоресцентной микроскопии приобретает все большее распространение, открывая новые возможности для решения целого ряда задач экспериментальной биологии и медицины. Целью настоящей работы было оценить эффективность применения метода флуоресцентной микроскопии для идентификации амилоидных скоплений в тканях человека. В качестве материала для исследования были использованы фрагменты миокарда ($n = 12$) и коры головного мозга ($n = 8$) людей обоих полов в возрасте от 60 до 98 лет с верифицированным амилоидозом. Препараты окрашивали с применением 11 разных гистохимических красителей с последующим анализом методами световой и флуоресцентной микроскопии. Проведенные качественный и количественный анализ показали, что тиофлавин Т является наиболее эффективным красителем для флуоресцентного выявления β - и транстиретинового амилоида в тканях человека. Методика окраски конго красным обладает высокой эффективностью в отношении транстиретинового амилоидоза, но плохо подходит для идентификации β -амилоидных бляшек. Установлено, что способность конго красного флуоресцировать при связывании с амилоидными фибриллами может быть использована для верификации амилоидных скоплений вместо традиционной поляризационной микроскопии. Впервые отмечено, что краситель метиловый фиолетовый обладает способностью специфично связываться с β -амилоидными скоплениями с формированием флуоресцирующего комплекса, одновременно подавляя автофлуоресценцию нервной ткани. Это делает методику окраски метиловым фиолетовым перспективной для диагностики патологии альцгеймеровского типа.

Ключевые слова: флуоресцентная микроскопия, амилоид, амилоидные бляшки, гистохимия, конго красный, тиофлавин, метиловый фиолетовый

Вклад авторов: В. В. Гусельникова — анализ литературы, планирование исследования, окраска препаратов, анализ и интерпретация результатов, подготовка черновика рукописи; Д. А. Суфиева — количественный анализ данных; Д. Л. Цыба — количественный анализ данных; Д. Э. Коржевский — разработка концепции, планирование исследования, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013) и одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 3/18 от 22 ноября 2018 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Валерия Владимировна Гусельникова
ул. Акад. Павлова, д. 12, г. Санкт-Петербург, 197376; Guselnicova.Valeria@yandex.ru

Статья получена: 12.07.2021 **Статья принята к печати:** 25.07.2021 **Опубликована онлайн:** 31.07.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.034

FLUORESCENCE DETECTION OF AMYLOID DEPOSITS IN HUMAN TISSUES USING HISTOCHEMICAL DYES

Guselnikova VV^{1,2}✉, Sufieva DA¹, Tsyba DL¹, Korzhevskii DE¹

¹ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Recently, fluorescence microscopy becomes more available, presenting new opportunities to face several challenges of experimental biology and medicine. The study was aimed to assess the effectiveness of fluorescence microscopy for the identification of amyloid deposits in human tissues. Post-mortem samples of the myocardium ($n = 12$) and cerebral cortex ($n = 8$) obtained from subjects of both sexes aged 60–98 with verified amyloidosis were used as a material for the study. The specimens were stained using 11 different histochemical dyes and subsequently analyzed by light and fluorescence microscopy. Qualitative and quantitative analysis has shown that Thioflavin T is the most effective stain for fluorescence detection of β - and transthyretin amyloid in human tissues. Congo red staining is highly effective for the detection of transthyretin amyloidosis, however, it is ill-suited for the identification of β -amyloid plaques. It has been found that the ability of Congo red to exhibit fluorescence when binding to amyloid fibrils can be used for verification of amyloid deposits instead of the traditional polarized light microscopy. As has been first noted, methyl violet can selectively bind to β -amyloid with fluorescent complex formation. In addition, methyl violet treatment effectively reduces the autofluorescent background in the nervous tissue. This makes methyl violet staining a promising diagnostic tool for Alzheimer's-type pathology.

Keywords: fluorescence microscopy, amyloid, amyloid plaques, histochemistry, congo red, thioflavin, methyl violet

Author contribution: Guselnikova VV — literature analysis, study planning, staining specimens, analysis and interpretation of the results, manuscript draft writing; Sufieva DA — quantitative data analysis; Tsyba DL — quantitative data analysis; Korzhevskii DE — conceptual development, study planning, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was conducted in accordance with the requirements of the World Medical Association Declaration of Helsinki (2013) and approved by the Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine (protocol № 3/18 dated November 22, 2018).

✉ **Correspondence should be addressed:** Valeria V. Guselnikova
Acad. Pavlova, 12, Saint Petersburg, 197376; Guselnicova.Valeria@yandex.ru

Received: 12.07.2021 **Accepted:** 25.07.2021 **Published online:** 31.07.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.034

В последние годы при проведении морфологических исследований все шире применяют метод флуоресцентной микроскопии. Появление этого метода в арсенале исследователей и его быстрое внедрение в клинико-диагностическую практику открывает новые возможности для решения целого ряда задач экспериментальной биологии и медицины. Одной из таких задач является совершенствование методов морфологической диагностики амилоидозов.

Амилоидозы — это группа конформационных заболеваний, общим признаком которых является внеклеточное отложение в органах и тканях нерастворимых патологических фибриллярных белков, амилоидов [1]. Амилоидоз представляет собой тяжелое заболевание с высоким уровнем летальности, при этом наиболее злокачественные формы развиваются у лиц трудоспособного возраста. Накопление амилоида в разных органах (сердце, почках, печени,

легких, желудочно-кишечном тракте и др.) приводит к нарушению их функции и может стать причиной развития кардиомиопатии, сердечной и почечной недостаточности, тромбоза печеночных вен и т. д. Накопление амилоида в мозге является гистопатологическим признаком таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [2–4]. Дифференциальная диагностика амилоидозов сильно затруднена вследствие большого разнообразия клинических проявлений и отсутствия патогномичных симптомов. В настоящее время наиболее надежным методом диагностики остается гистологическое исследование образцов тканей с применением красителя Конго красного и последующим исследованием препаратов методами световой и поляризационной микроскопии [5]. Однако применение такого подхода нередко приводит к получению ложноположительных и/или ложноотрицательных результатов [6], что указывает на несовершенство существующей методической базы. Это обуславливает актуальность проблемы поиска новых подходов к улучшению качества морфологической диагностики амилоидозов. Определенный вклад в решение этой задачи может внести применение метода флуоресцентной микроскопии. В настоящее время многие клиничко-диагностические центры оснащены флуоресцентными микроскопами, что позволяет им использовать флуоресцентные свойства ряда красителей в диагностических целях, в том числе для диагностики амилоидозов.

Целью работы было оценить эффективность применения метода флуоресцентной микроскопии для идентификации амилоидных скоплений в тканях человека.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для исследования были использованы фрагменты миокарда ($n = 12$) и коры головного мозга ($n = 8$) пациентов обоих полов (четверо мужчин и восемь женщин, трое мужчин и пять женщин соответственно) в возрасте от 60 до 98 лет с иммуногистохимически детектированным амилоидозом. Критерии включения: присутствие иммунопозитивных β -амилоидных бляшек в коре головного мозга и скоплений агрегированного транскретина в миокарде. Критерии исключения: выраженные посмертные аутолитические изменения в ткани мозга или миокарда.

Для верификации присутствия амилоидных скоплений применяли кроличьи поликлональные ОС-антитела (Anti-

Amyloid Fibrils OC Antibody) к конформационным эпитопам амилоидных фибрилл (разведение 1:1000, кат. номер АВ2286, Sigma-Aldrich; США) и мышинные моноклональные (клон ТА5F4) антитела к агрегированному транскретину (разведение 1:600, кат. номер 848102, BioLegend; США).

Материал получен из архива Отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ». Образцы фиксировали в 10%-ом формалине и заливали в парафин. С парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5, 7 и 14 мкм. Чтобы оценить возможность использования гистохимических красителей для флуоресцентного выявления амилоидов, препараты коры головного мозга и миокарда человека окрашивали с применением ряда гистохимических красителей (табл. 1).

Анализ и фотографирование препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Leica Microsystems; Германия) и флуоресцентного микроскопа Leica DM2500 (Leica Microsystems; Германия), оснащенного системой фильтров флуоресценции от 340 до 560 нм. Система фильтров состояла из следующих возбуждающих фильтров: ВР=340–380 нм (первый — «А»), ВР=450–490 нм (второй — «В») и ВР=515–560 нм (третий — «N2,1»).

Подсчет количества выявленных разными методами амилоидных бляшек проводили на серийных срезах коры головного мозга одного и того же случая. Подсчет осуществляли три разных исследователя в идентичных условиях, используя объектив $\times 40$. Так как распределение амилоидных бляшек в нервной ткани характеризуется выраженной неравномерностью, подсчет проводили по всей площади среза ($0,67 \text{ см}^2$) с последующим пересчетом на см^2 . В качестве контрольного значения использовали количество амилоидных бляшек, выявленных при использовании иммунофлуоресцентной реакции. Для этого применяли мышинные моноклональные (клон DE2B4) антитела к β -амилоиду (разведение 1:200, кат. номер ab11132, Abcam; Великобритания); в качестве вторичных реагентов использовали биотинилированный антимышиный Fab-фрагмент иммуноглобулина ослы (Jackson ImmunoResearch; США) и конъюгат стрептавидина с флуорохромом Cy2 (Jackson ImmunoResearch; США).

Статистический анализ полученных данных выполнен в программе GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc.; США). Для сравнения показателей использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим попарным сравнением групп (тиофлавин Т, конго красный, метиловый фиолетовый) с контролем (иммуногистохимия) с помощью post hoc критерия Даннета. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 1. Перечень использованных красителей

Название красителя	Фирма и страна-производитель	Использованный для окраски раствор красителя
Конго красный	Sigma, США	0,1%-й водный раствор
Тиофлавин Т	Fluka, США	1%-й водный раствор
Альциановый синий	BioVitrum, Россия	Коммерческий раствор
Толуидиновый синий	Acros Organics, США	1%-й спиртовой раствор
Метиловый фиолетовый	Pr. G. Grubler, Германия	0,1%-й водный раствор
Метиленовый зеленый	Ferak Berlin, Германия	0,1%-й водный раствор
Эозин Y спиртовой	BioVitrum, Россия	Коммерческий раствор
Янус зеленый	Merck, Германия	0,1%-й водный раствор
Пиронин G	British Drug Houses, Великобритания	0,1%-й водный раствор
Фуксин основной	Serva, Германия	0,1%-й водный раствор
Нейтральный красный	National Aniline Division, США	0,1%-й водный раствор

Таблица 2. Результаты окраски β -амилоида в коре головного мозга человека

Краситель	Цвет амилоидных скоплений при наблюдении в проходящем свете	Флуоресценция амилоидных скоплений
Конго красный	Розово-красный	+
Тиофлавин Т	–	+
Альциановый синий	Синий	–
Толуидиновый синий	–	–
Метиловый фиолетовый	–	+
Метиленовый зеленый	–	–
Эозин Y	Светло-розовый	–
Янус зеленый	–	–
Пиронин G	–	–
Фуксин основной	–	–
Нейтральный красный	–	–

Данные представляли в следующем формате: среднее \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эффективность применения гистохимических красителей для флуоресцентного выявления амилоидных скоплений

Результаты применения разных гистохимических красителей для идентификации скоплений β -амилоида и транстиретинового амилоида с использованием методов световой и флуоресцентной микроскопии представлены в табл. 2 и 3 соответственно.

Способность связываться с амилоидными фибриллами с формированием флуоресцирующего комплекса характерна для трех красителей — тиофлавина Т (ThT), конго красного и метилового фиолетового.

При окраске ThT амилоидные бляшки в коре головного мозга хорошо визуализируются уже на малом увеличении микроскопа ($\times 10$). Выявленные скопления имеют вид компактных очаговых образований, флуоресцирующих в синем диапазоне спектра (рис. 1А). Амилоидные бляшки характеризуются морфологической гетерогенностью, которая выражается в том, что для одних бляшек характерно наличие интенсивно флуоресцирующего плотного центра округлой формы и расположенного вокруг него волокнистого ореола (рис. 1А; *стрелка 1*), при этом другие бляшки выглядят как скопления, сформированные

только волокнистыми структурами (рис. 1А; *стрелка 2*). Флуоресценция характерна для амилоидных бляшек обоих морфологических типов. При окраске ThT они визуализируются с одинаковой эффективностью (рис. 1А). Анализ препаратов выявил присутствие небольшой фоновой флуоресценции ядер клеток и автофлуоресценции липофусцина — пигмента, накапливающегося в нейронах при старении.

Транстиретиновый амилоид в миокарде человека при окраске ThT также характеризуется интенсивной флуоресценцией в синем диапазоне спектра (рис. 1Б). Как и в случае изучения препаратов коры головного мозга, в миокарде было отмечено присутствие фоновой флуоресценции ядер клеток (рис. 1Б, *головка стрелки, бирюзовый цвет*) и автофлуоресценции липофусцина (рис. 1Б, *короткая стрелка, оранжевый цвет*), накопление которого характерно не только для нейронов, но и для кардиомиоцитов. Важно отметить, что, хотя цвет флуоресценции неамилоидных компонентов ткани отличается от цвета флуоресценции связавших ThT амилоидных фибрилл, присутствие дополнительных флуоресцирующих элементов затрудняет идентификацию амилоидных скоплений и их количественный анализ.

Анализ препаратов, окрашенных конго красным, с помощью флуоресцентного микроскопа показал, что конгофильные амилоидные скопления в тканях человека флуоресцируют в красном диапазоне спектра (рис. 1В, Г). При изучении препаратов коры головного мозга было отмечено, что после окраски конго красным амилоидные бляшки выявляются не во всех исследованных образцах.

Таблица 3. Результаты окраски транстиретинового амилоида в миокарде человека

Краситель	Цвет амилоидных скоплений при наблюдении в проходящем свете	Флуоресценция амилоидных скоплений
Конго красный	Розово-красный	+
Тиофлавин Т	–	+
Альциановый синий	Синий	–
Толуидиновый синий	Светло-фиолетовый	–
Метиловый фиолетовый	Насыщенно-фиолетовый	–
Метиленовый зеленый	–	–
Эозин Y	Светло-розовый	–
Янус зеленый	Серо-фиолетовый	–
Пиронин G	Светло-розовый	–
Фуксин основной	Красный	–
Нейтральный красный	Темно-красный	–

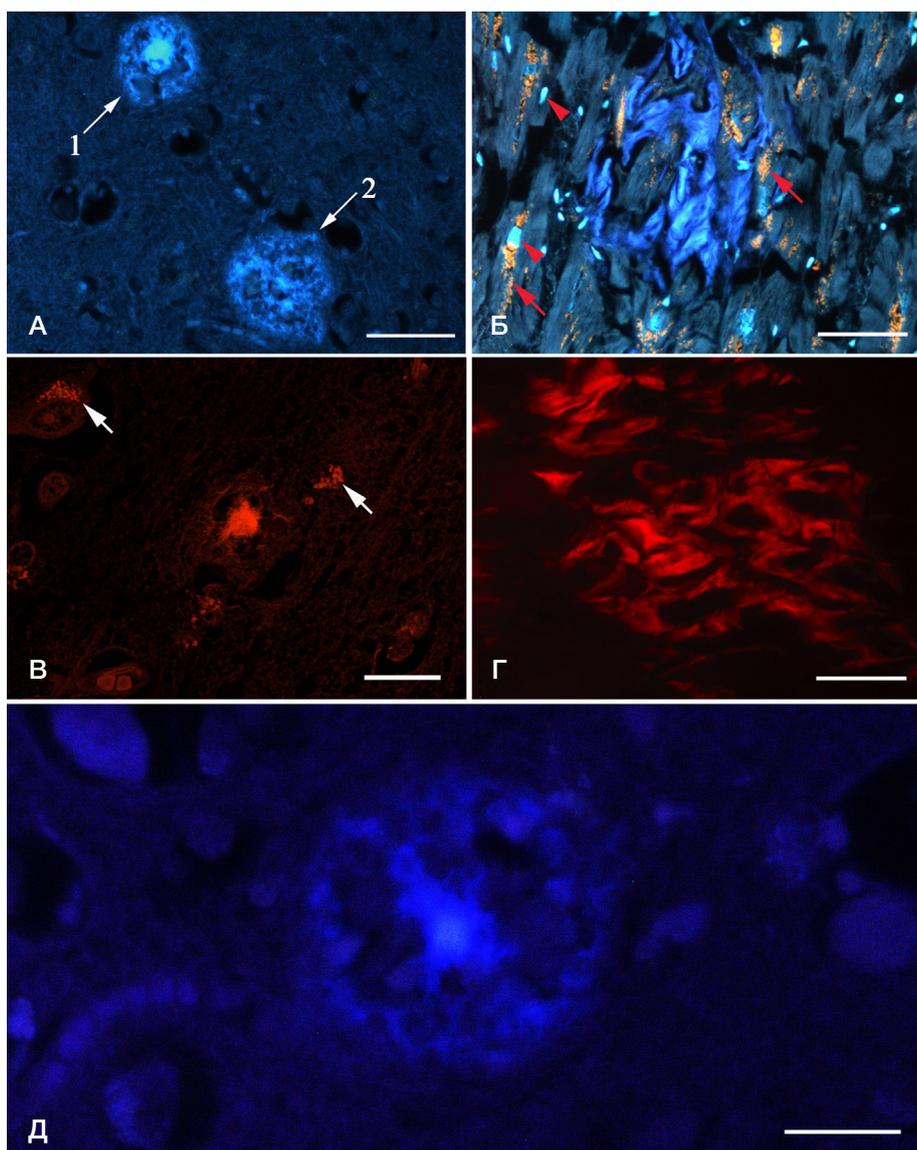


Рис. 1. Флуоресцентное выявление амилоидных скоплений в коре головного мозга (А, В, Д) и миокарде (Б, Г) человека. Окраска тиофлавином Т (А, Б), конго красным (В, Г) или метиловым фиолетовым (Д). Стрелка 1 указывает на амилоидную бляшку с центральным плотным ядром, стрелка 2 — на волокнистую амилоидную бляшку (без плотного центра), короткая стрелка — на скопление липофусцина, головка стрелки — на клеточное ядро. Масштабный отрезок равен 50 мкм (А, Б, Г) и 20 мкм (В, Д)

Лишь в трех проанализированных случаях из восьми в тканях мозга были идентифицированы единичные конгофильные скопления. Наиболее высокой интенсивностью флуоресценции при окраске конго красным обладает плотное центральное ядро амилоидной бляшки. Периферический волокнистый ареол плохо визуализируется. Бляшки, не имеющие компактного центра, значительно хуже различимы по сравнению с бляшками, имеющими ярко флуоресцирующую центральную область. Было также отмечено присутствие значительной фоновой флуоресценции (в красном диапазоне спектра) ядер клеток коры головного мозга, эритроцитов и липофусцина (рис. 1В).

При изучении препаратов миокарда, окрашенных конго красным, амилоидные скопления выглядели как волокнистые агрегаты разного размера, локализованные в интерстициальном пространстве миокарда и интенсивно флуоресцирующие в красном диапазоне (рис. 1Г). Было отмечено присутствие автофлуоресценции липофусцина, которая сильно затрудняла идентификацию амилоидных скоплений, особенно в случае накопления большого количества этого пигмента кардиомиоцитами.

При анализе препаратов, окрашенных метиловым фиолетовым, с помощью флуоресцентного микроскопа было обнаружено, что в данном случае амилоидные бляшки интенсивно флуоресцировали в синем диапазоне спектра (рис. 1Д). При этом фоновая флуоресценция ткани полностью отсутствовала. Наблюдалось лишь слабое темно-малиновое окрашивание нервной ткани, что усиливало контрастность выявления амилоидных бляшек (рис. 1Д). Полное отсутствие фоновой флуоресценции значительно облегчало идентификацию амилоидных бляшек. Бляшки с плотным центральным ядром и бляшки без него визуализировались одинаково эффективно. Интересно, что транстретиновый амилоид в миокарде человека не флуоресцирует при окраске метиловым фиолетовым (в отличие от амилоидных бляшек в коре головного мозга), хотя при наблюдении окрашенных препаратов в проходящем свете амилоидные депозиты в миокарде четко визуализируются за счет метахроматической окраски амилоида в насыщенный фиолетовый цвет (рис. 2А).

Интересной находкой в рамках проведенного исследования стала окраска транстретинового амилоида

миокарда основным фуксином. При использовании этого красителя амилоидные скопления приобретают насыщенный красный цвет при наблюдении в проходящем свете (рис. 2Б). По нашим данным, ранее способность основного фуксина метахроматически окрашивать амилоид описана не была.

Количественный анализ амилоидных бляшек, выявляемых с использованием разных красителей

В ходе анализа препаратов коры головного мозга человека было отмечено, что визуальное количество выявляемых амилоидных бляшек сильно варьирует в зависимости от выбранной методики окраски. В связи с этим было проведено количественное исследование, которое заключалось в подсчете амилоидных бляшек тремя разными исследователями на препаратах одного и того же случая, окрашенных разными красителями. Результаты проведенного количественного анализа представлены на рис. 3. Полученные результаты были сопоставлены с результатами иммуногистохимической реакции на β -амилоидные фибриллы как наиболее чувствительного метода идентификации амилоидных бляшек.

Из представленной гистограммы видно, что количество амилоидных бляшек, выявляемых при использовании любого гистохимического красителя, значительно меньше по сравнению с количеством иммунопозитивных бляшек. Среднее количество выявляемых методом иммунофлуоресценции амилоидных бляшек в образце, взятом для количественного анализа, составило $1106 \pm 76,72$ на см^2 ткани мозга. Наименьшие количественные различия с группой контроля наблюдались при окрашивании срезов ThT. При применении такой окраски среднее количество амилоидных бляшек составило $810,9 \pm 44,49$ на см^2 . Наибольшие различия с группой контроля наблюдались при использовании конго красного: количество визуализируемых бляшек составило $268,1 \pm 15,34$ на см^2 . Среднее количество бляшек при окраске метиловым фиолетовым было $399,0 \pm 60,03$ на см^2 , что являлось промежуточным значением между результатами использования ThT и конго красного.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Способность формировать флуоресцирующие комплексы при связывании с клеточными и тканевыми структурами ранее была показана для целого ряда гистохимических красителей. Так, флуоресцентные свойства эозина применяются для визуализации эластических волокон [7], оценки повреждения печени [8], морфологической оценки состояния селезенки [9], изучения структуры и функционального состояния пародонта [10]. Основной фуксин также обладает способностью флуоресцировать при связывании с эластическими волокнами [11]. В связи с этим поиск среди известных гистохимических красителей новых флуоресцентных зондов, специфичных в отношении амилоидных фибрилл, может способствовать разработке новых диагностических подходов для выявления амилоидозов.

Окраска срезов ThT является наиболее известным способом флуоресцентного выявления амилоида. Показано, что молекулы этого красителя способны специфично встраиваться в β -складчатую структуру амилоидных фибрилл. По мнению исследователей, такое встраивание блокирует вращение диметиламинобензольного кольца

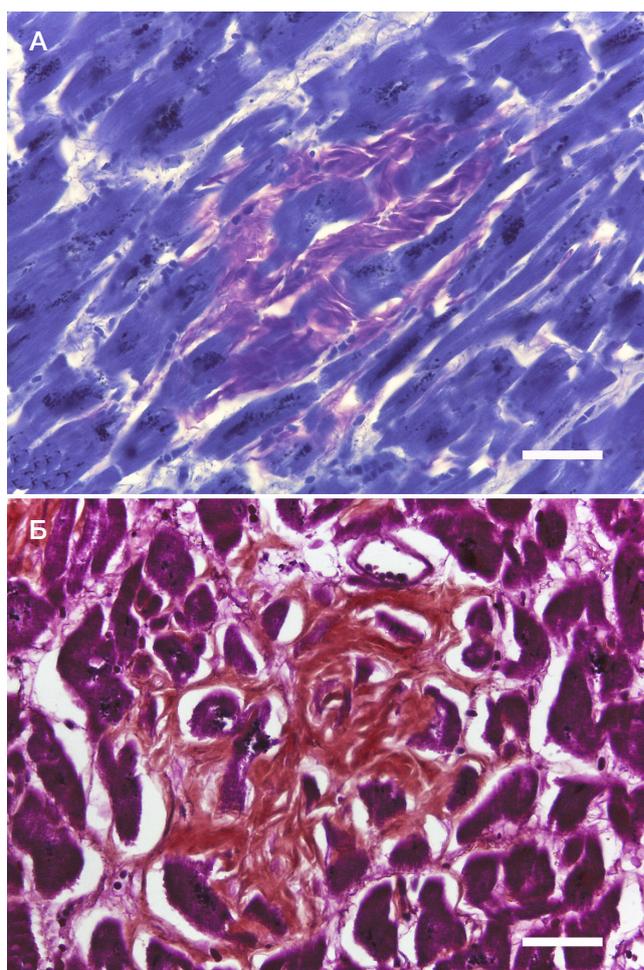


Рис. 2. Метахроматическая окраска транстиретинового амилоида в миокарде человека. А. Окраска метиловым фиолетовым. Б. Окраска основным фуксином. Масштабный отрезок равен 50 мкм

относительно бензотиазольного в молекуле красителя, вследствие чего происходит значительное (в тысячи раз) увеличение квантового выхода его флуоресценции [12]. Согласно литературным данным, при связывании ThT с амилоидными фибриллами имеют место сдвиг максимума его возбуждения с 385 нм до 450 нм и сдвиг максимума эмиссии с 445 нм до 482 нм [13]. В связи с этим флуоресценцию окрашенных ThT амилоидных скоплений принято оценивать в «зеленом» диапазоне спектра (с использованием возбуждающего фильтра «I3» BP=450–490 нм). Наши исследования свидетельствуют о том, что окраска ThT является эффективным методом визуализации β - и транстиретинового амилоидоза у человека. Интересно, что после окраски срезов коры головного мозга и миокарда человека ThT мы наблюдали интенсивную флуоресценцию амилоидных скоплений не только в «зеленой», но и в «синей» части спектра (при использовании возбуждающего фильтра BP=340–380 нм). Причем в этом случае автофлуоресцирующие элементы нервной и мышечной ткани (липофусцин, накапливающийся в нейронах и кардиомиоцитах при старении, NADPH, содержащийся в митохондриях, и др.) имеют цвет, отличный от цвета флуоресценции окрашенных ThT амилоидных фибрилл. Это значительно увеличивает контрастность выявления амилоида.

Несмотря на то что ThT способен избирательно взаимодействовать с белками в состоянии амилоидных фибрилл, образуя при этом интенсивно флуоресцирующий

комплекс, для клинической диагностики его применяют значительно реже, чем другой краситель со сходным механизмом действия, конго красный. В настоящее время именно окраска конго красным является «золотым стандартом» выявления амилоида. Ее широко применяют в научных исследованиях и клинико-диагностической практике [14, 5]. Как и ThT, конго красный обладает свойством встраиваться в β -складчатый слой амилоидных фибрилл, при этом приобретая способность поворачивать плоскость поляризации света. Поэтому для подтверждения природы обнаруженных конгофильных скоплений традиционно применяют метод поляризационной микроскопии [14]. Однако цвет свечения конгофильных скоплений в поляризованном свете может сильно варьировать, что значительно усложняет интерпретацию полученных результатов [15].

Нами было показано, что для верификации скоплений амилоида после окраски конго красным вместо микроскопии в поляризованном свете может быть рекомендовано использование флуоресцентной микроскопии. Способность конго красного флуоресцировать при связывании с фибриллами амилоида была описана еще в 1959 г. [16], однако в то время использование флуоресцентных свойств конго красного не нашло широкого применения. Вероятно, это обусловлено тем фактом, что на момент выхода указанной статьи флуоресцентные микроскопы были доступны лишь немногим диагностическим лабораториям. Использование свойства конго красного флуоресцировать при связывании с амилоидом может способствовать снижению количества ложноположительных и ложноотрицательных результатов, связанных с ошибочной интерпретацией результатов из-за непостоянства зеленого оттенка свечения конгофильных скоплений в поляризованном свете. Тем не менее важно подчеркнуть, что, согласно результатам наших исследований, окраска конго красным характеризуется низкой эффективностью в отношении выявления амилоидных бляшек. Об этом свидетельствует тот факт, что при использовании конго красного амилоидные бляшки удается идентифицировать не во всех образцах коры, в которых они присутствуют (согласно данным иммуногистохимического исследования). Кроме того, количество выявленных конгофильных бляшек в образце, взятом для количественного анализа, в четыре раза меньше соответствующего значения, полученного после проведения иммуногистохимического окрашивания.

Первые попытки выявления амилоида с помощью метахроматических красителей, таких как толуидиновый синий, кристаллический фиолетовый и метиловый фиолетовый, относятся к концу прошлого века. Согласно результатам исследований тех лет, эти методики значительно менее эффективны в отношении выявления амилоида по сравнению с окраской конго красным и ThT [17]. Здесь следует отметить, что исследование препаратов, окрашенных с использованием метахроматических красителей, ранее проводили исключительно методом микроскопии в проходящем свете. Нами было отмечено, что окраска метиловым фиолетовым с последующей верификацией амилоида методом флуоресцентной микроскопии является эффективным способом выявления β -амилоидных бляшек. В этом случае идентифицировать амилоидные бляшки в пределах среза значительно легче благодаря полному отсутствию фоновой флуоресценции неамилоидных компонентов ткани. Ранее было показано, что обработка парафиновых

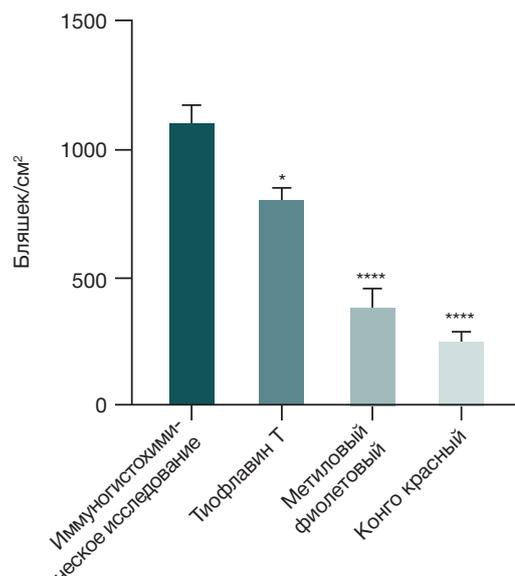


Рис. 3. Количественная оценка амилоидных бляшек, окрашенных разными методами. Различия с группой контроля (иммуногистохимическое исследование) значимы при $p = 0,01$ (*) и $p < 0,0001$ (****)

срезов тканей кристаллическим фиолетовым, который по своей химической структуре близок к метиловому фиолетовому, приводит к значительному уменьшению автофлуоресценции [18]. Вероятно, метиловый фиолетовый обладает сходным свойством. Интересно, что эта методика окраски неэффективна в отношении транстриетинового амилоидоза миокарда. В данном случае амилоид приобретает метахроматическую окраску при наблюдении в проходящем свете, но характеризуется полным отсутствием флуоресценции. Это может указывать на специфику связывания молекул красителя метилового фиолетового с амилоидными фибриллами определенной природы.

Идентификация амилоидных бляшек в коре головного мозга человека является актуальной задачей, так как их наличие служит одним из основных гистопатологических признаков болезни Альцгеймера. В ходе проведенных исследований нами было отмечено, что проанализированные гистохимические красители демонстрируют разную эффективность взаимодействия с амилоидными бляшками с образованием флуоресцирующего комплекса. Наблюдаемые различия в количестве выявляемых разными методами амилоидных бляшек могут быть обусловлены разной специфичностью красителей в отношении связывания β -амилоидных фибрилл. Наличие достоверных различий с результатами, полученными при использовании метода иммунофлуоресценции, указывает на то, что использованные гистохимические красители связываются не со всеми присутствующими на срезе амилоидными бляшками, а лишь с частью амилоидных бляшек. Возможно, это обусловлено существованием структурных различий между разными типами амилоидных бляшек. Так, отмечено, что диффузные (или незрелые) амилоидные бляшки не имеют фибриллярного строения и представляют собой компактные скопления β -амилоидного пептида [19]. Из-за отсутствия в структуре этих бляшек амилоидных фибрилл они не способны взаимодействовать с такими красителями, как Конго красный и ThT, молекулы которых встраиваются в структуру с определенной конформацией. С этой точки зрения, методы гистохимического выявления амилоида не являются полными аналогами методов иммуногистохимии, поскольку применение антител позволяет выявлять

место локализации определенного белка (β -амилоида, транстиретины и т. д.). В данном случае гистохимические методы представляют собой более эффективный способ выявления конформационной патологии.

Несмотря на то что количественные данные свидетельствуют о меньшей эффективности использования любой из гистохимических окрасок для выявления амилоидных бляшек по сравнению с методом иммунофлуоресценции, полученные результаты могут представлять интерес для будущих исследований. Метод иммунофлуоресценции — сложный в реализации и дорогостоящий из-за высокой стоимости необходимых реагентов и расходных материалов. По этой причине его можно применять в качестве рутинного метода далеко не во всех научных, клинико-диагностических и патоморфологических лабораториях. Гистохимические методики, напротив, отличаются простотой и дешевизной, будучи значительно более доступными. Проблему более низкой эффективности этих методик в отношении выявления амилоида отчасти можно решить за счет модификации имеющихся гистохимических красителей и создания их аналогов [12, 20].

ВЫВОДЫ

Применение метода флуоресцентной микроскопии позволяет найти новые подходы для визуализации амилоида в тканях головного мозга человека, что может быть успешно использовано для улучшения эффективности морфологической диагностики амилоидозов. Тиофлавин Т является наиболее эффективным гистохимическим красителем для флуоресцентного выявления β - и транстиретинового амилоидоза в тканях человека. Методика окраски конго красным характеризуется высокой эффективностью в отношении транстиретинового амилоидоза, но плохо подходит для идентификации β -амилоидных бляшек. Способность конго красного флуоресцировать при связывании с амилоидными фибриллами может быть использована для верификации амилоидных скоплений вместо поляризационной микроскопии. Метилловый фиолетовый обладает способностью специфически связываться с β -амилоидными скоплениями с образованием флуоресцирующего комплекса, одновременно подавляя автофлуоресценцию нервной ткани. Это делает методику окраски метилловым фиолетовым перспективной для диагностики патологии альцгеймеровского типа.

Литература

- Picken MM. The pathology of amyloidosis in classification: A review. *Acta Haematol.* 2020; 143 (4): 322–34. DOI: 10.1159/000506696.
- Cuddy SAM, Falk RH. Amyloidosis as a systemic disease in context. *Can J Cardiol.* 2020; 36 (3): 396–407. DOI: 10.1016/j.cjca.2019.12.033.
- DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2019; 14 (1): 32. DOI: 10.1186/s13024-019-0333-5.
- Dickson DW. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2017; 46 (Suppl 1): S30–S33. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2017.07.033.
- Dapson RW. Amyloid from a histochemical perspective. A review of the structure, properties and types of amyloid, and a proposed staining mechanism for Congo red staining. *Biotech Histochem.* 2018; 93 (8): 543–56. DOI: 10.1080/10520295.2018.1528385.
- Yakupova EI, Bobyleva LG, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG. Congo Red and amyloids: history and relationship. *Bioscience Reports.* 2019; 39 (1): BSR20181415. DOI: 10.1042/BSR20181415.
- De Carvalho HF, Taboga SR. The applicability of hematoxylin-eosin staining plus fluorescence or confocal laser scanning microscopy to the study of collagen fibers in cartilages. *Coll R Acad Sci III.* 1996; 319: 991–6. PMID: 9064122.
- Hamid A, Safdar A, Maryam M, Amjad A, Azra J, Abid A. Eosin fluorescence: A diagnostic tool for quantification of liver injury. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017; 19: 37–44. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2017.03.016.
- Jakubovsky J, Guller L, Cerna M et al. Fluorescence of hematoxylin and eosin-stained histological sections of the human spleen. *Acta Histochem.* 2002; 104 (4): 353–6. DOI: 10.1078/0065-1281-00684.
- De Rossi A, Rocha LB., Rossi MA. Application of fluorescence microscopy on hematoxylin and eosin-stained sections of healthy and diseased teeth and supporting structures. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36 (6): 377–81. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2007.00542.x.
- Pihlman K, Linder E. Fluorescence microscopical visualization of elastic fibres using basic fuchsin. *Histochemistry.* 1983; 79 (2):157–65. DOI: 10.1007/BF00489778.
- Sapozhnikov SP, Karyshev PB, Sheptukhina AI, Nikolayeva OV, Avruyskaya AA, Mitrasov YN, Kozlov VA. Novel fluorescent probes for amyloid detection. *CTM.* 2017; 9 (2): 91–8. DOI: 10.17691/stm2017.9.2.11.
- Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1804 (7): 1405–12. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.04.001.
- Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN., Ikeda S-I, Merlini G, Saraiva MJM, Westermark P. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid.* 2016; 23 (4): 209–13. DOI: 10.1080/13506129.2016.1257986.
- Howie AJ, Mared P O-C. 'Apple-green birefringence' of amyloid stained by Congo red. *Kidney Int.* 2012; 82 (1): 114. DOI: 10.1038/ki.2012.89.
- Cohen AS, Calkins E, Levene CI. Studies on experimental amyloidosis. Analysis of histology and staining reactions of casein-induced amyloidosis in the rabbit. *Am J Pathol.* 1959; 35: 971–89. PMID: 13810917.
- Elghetany MT, Saleem A. Methods for staining amyloid in tissues: a review. *Stain Technol.* 1988; 63 (4): 201–12. DOI: 10.3109/10520298809107185.
- Buchynska L, Kashuba E, Szekely L. Immunofluorescence staining of paraffin sections: creating DAB staining like virtual digital images using CMYK color conversion. *Exp Oncol.* 2008; 30 (4): 327–9. PMID: 19112433.
- Mott RT, Hulette CM. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am.* 2005; 15: 755–65. DOI: 10.1016/j.nic.2005.09.003.
- Styren SD, Hamilton RL, Styren GC, Klunk WE. X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology. *J Histochem Cytochem.* 2000; 48 (9): 1223–32. DOI: 10.1177/002215540004800906.

References

- Picken MM. The pathology of amyloidosis in classification: A review. *Acta Haematol.* 2020; 143 (4): 322–34. DOI: 10.1159/000506696.
- Cuddy SAM, Falk RH. Amyloidosis as a systemic disease in context. *Can J Cardiol.* 2020; 36 (3): 396–407. DOI: 10.1016/j.cjca.2019.12.033.

3. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2019; 14 (1): 32. DOI: 10.1186/s13024-019-0333-5.
4. Dickson DW. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2017; 46 (Suppl 1): S30–S33. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2017.07.033.
5. Dapson RW. Amyloid from a histochemical perspective. A review of the structure, properties and types of amyloid, and a proposed staining mechanism for Congo red staining. *Biotech Histochem.* 2018; 93 (8): 543–56. DOI: 10.1080/10520295.2018.1528385.
6. Yakupova EI, Bobyleva LG, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG. Congo Red and amyloids: history and relationship. *Bioscience Reports.* 2019; 39 (1): BSR20181415. DOI: 10.1042/BSR20181415.
7. De Carvalho HF, Taboga SR. The applicability of hematoxylin-eosin staining plus fluorescence or confocal laser scanning microscopy to the study of collagen fibers in cartilages. *Coll R Acad Sci III.* 1996; 319: 991–6. PMID: 9064122.
8. Hamid A, Safdar A, Maryam M, Amjad A, Azra J, Abid A. Eosin fluorescence: A diagnostic tool for quantification of liver injury. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017; 19: 37–44. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2017.03.016.
9. Jakubovsky J, Guller L, Cerna M et al. Fluorescence of hematoxylin and eosin-stained histological sections of the human spleen. *Acta Histochem.* 2002; 104 (4): 353–6. DOI: 10.1078/0065-1281-00684.
10. De Rossi A, Rocha LB., Rossi MA. Application of fluorescence microscopy on hematoxylin and eosin-stained sections of healthy and diseased teeth and supporting structures. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36 (6): 377–81. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2007.00542.x.
11. Pihlman K, Linder E. Fluorescence microscopical visualization of elastic fibres using basic fuchsin. *Histochemistry.* 1983; 79 (2): 157–65. DOI: 10.1007/BF00489778.
12. Sapozhnikov SP, Karyshev PB, Sheptukhina AI, Nikolayeva OV, Avruyskaya AA, Mitrasov YN, Kozlov VA. Novel fluorescent probes for amyloid detection. *CTM.* 2017; 9 (2): 91–8. DOI: 10.17691/stm2017.9.2.11.
13. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1804 (7): 1405–12. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.04.001.
14. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN., Ikeda S-I, Merlini G, Saraiva MJM, Westermarck P. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid.* 2016; 23 (4): 209–13. DOI: 10.1080/13506129.2016.1257986.
15. Howie AJ, Mared P O-C. 'Apple-green birefringence' of amyloid stained by Congo red. *Kidney Int.* 2012; 82 (1): 114. DOI: 10.1038/ki.2012.89.
16. Cohen AS, Calkins E, Levene CI. Studies on experimental amyloidosis. Analysis of histology and staining reactions of casein-induced amyloidosis in the rabbit. *Am J Pathol.* 1959; 35: 971–89. PMID: 13810917.
17. Elghetany MT, Saleem A. Methods for staining amyloid in tissues: a review. *Stain Technol.* 1988; 63 (4): 201–12. DOI: 10.3109/10520298809107185.
18. Buchynska L, Kashuba E, Szekely L. Immunofluorescence staining of paraffin sections: creating DAB staining like virtual digital images using CMYK color conversion. *Exp Oncol.* 2008; 30 (4): 327–9. PMID: 19112433.
19. Mott RT, Hulette CM. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am.* 2005; 15: 755–65. DOI: 10.1016/j.nic.2005.09.003.
20. Styren SD, Hamilton RL, Styren GC, Klunk WE. X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology. *J Histochem Cytochem.* 2000; 48 (9): 1223–32. DOI: 10.1177/002215540004800906.