

УДК 612.46+572.7:616-003.821.001.6

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И ГИСТОСТРУКТУРНАЯ ОЦЕНКА МОДЕЛИ СИСТЕМНОГО
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АМИЛОИДОЗА

Н.В. СОКОЛОВСКИЙ, В.Б. БРИН, К.М. КОЗЫРЕВ, Т.В. ЗАКС, О.Т. КАБИСОВ, Н.В. ПАНТЕЛЕЕВА

*ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия
Минздравсоцразвития России», 362019, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 40*

Аннотация. Впервые авторами получена экспериментальная модель системного (полиорганного) амилоидоза методом однократного введения старым крысам равнодолевой смеси нативного яичного альбумина и полного адьюванта Фрейнда из расчета по 0,2 мл в 5 точек инъекций внутрибрюшинно и в паховые и подмышечные области подкожно. Этот способ является одним из самых эффективных и простых, так как для достижения положительного результата достаточно одноразового введения амилоидогена.

Установлено, что при применении данного метода развитие экспериментального амилоидоза сопровождается дистрофическими, некробиотическими и гемодинамическими изменениями во всех изучаемых органах: сердце, печени, селезенке, почках, толстой кишке.

Ключевые слова: экспериментальный амилоидоз, морфология.

THE PATHOPHYSIOLOGICAL AND HISTOLOGICAL EVALUATION OF MODEL
OF EXPERIMENTAL SYSTEM AMYLOIDOSIS

N.V. SOKOLOVSKY, V.B. BRIN, K.M. KOZYREV, T.V. ZAKS, O.T. KABYSOV,
N.V. PANTELEEVA

SEI of HPE «North Ossetian State Medical Academy» of Health Care and Social Development Federal Agency

Abstract: For the first time authors have obtained an experimental model system (multi-organ) amyloidosis by a single injection of a mixture of aged rats equal share of native egg albumin and complete Freund's adjuvant at the rate of 0.2 ml intraperitoneal injection of 5 points in the inguinal and axillary regions subcutaneously. This method is one of the most effective and simple, so as to achieve a positive result need only one injection. It was established that the use of this method is accompanied by the development of experimental amyloidosis dystrophic, necrobiotic and hemodynamic changes in all examined organs: heart, liver, spleen, kidneys, and colon.

Key words: experimental amyloidosis, morphology.

В последние два десятилетия амилоидоз, как общепатологический процесс и стромально-сосудистый диспротеиноз вызывает значительный интерес у исследователей. Многообразие висцеральных проявлений и инвалидизация, отсутствие эффективных мер профилактики и лечения и далеко еще не решенные вопросы этиологии и патогенеза, обуславливают актуальность изучения проблемы в целом.

Распространенность амилоидоза, по данным Национального центра медицинской статистики США, составляет 4,5 случая на 100000. Рост заболеваемости, стандартизированный по возрасту, составляет 5,1-12,8 на миллион человеко-лет, что примерно соответствует 3200 новым случаям в год в США [12, 13, 16].

Судить о степени распространенности амилоидоза в России сложно, так как проблеме амилоидоза в целом не уделяется должного внимания. По сведениям научной литературы мало современных фундаментальных исследований по распространенности процесса, имеются лишь статистические сведения советского периода по отдельным регионам [10, 11]. В основном описывается только вторичный амилоидоз, который является осложнением многих хронических заболеваний, таких как туберкулез, бронхоэктатическая болезнь, хроническая абсцедирующая пневмония, ревматические болезни, в частности ревматоидный артрит, системная склеродермия и др.

Вместе с тем, ранее созданные модели экспериментального амилоидоза воспроизводились многократным введением чужеродного белка, а их анализ преимущественно касался генеза амилоидной нефропатии. Амилоидная кардиопатия ранее у крыс не воспроизводилась.

Одним из основных методов изучения патогенеза амилоидоза является его экспериментальное моделирование [7, 8, 9, 15, 16].

Существует множество способов его воспроизведения, большинство из которых основывается на многократном введении животным биологических или химических агентов отдельно и в различных их сочетаниях с целью запуска иммуно-патобиохимических механизмов образования амилоидных фибрилл.

В этом контексте, запатентованные и опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК, результаты по моделированию [1-7, 9], профилактике и лечению экспериментального амилоидоза (что ранее не

делалось), полученные на кафедрах нормальной физиологии (зав. кафедрой проф. В.Б. Брин) и патологической анатомии (зав. кафедрой проф. К.М. Козырев) Северо-Осетинской государственной медицинской академии, характеризуют некоторые патогенетические звенья экспериментального амилоидоза и возможность их коррекции способами, впервые предложенными коллективами этих кафедр [6,8,9,12].

Цель исследования – создать новую, экономически менее затратную и простую модель экспериментального системного амилоидоза, которая бы отличалась от предшествующих моделей большей эффективностью воспроизведения патологического процесса. Изучить ее функциональные и гистоструктурные органоспецифические характеристики.

Материал и методы исследования

В качестве экспериментальных животных выбраны старые крысы-самцы линии «Вистар» массой 350–400 г. в возрасте 18–24 мес., так как у старых животных на фоне брадитрофии тканей была более обоснованная возможность получения модели системного амилоидоза.

При проведении экспериментов руководствовались статьёй 11-й Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003г.).

Для моделирования амилоидоза экспериментальным животным проводились однократные инъекции равнодолевой смеси нативного яичного альбумина и полного адьюванта Фрейнда из расчета по 0,2 мл в 5 точек: внутрибрюшинно, в паховые и подмышечные области подкожно слева и справа. У контрольных и опытных животных под тиопенталовым наркозом исследовались гемодинамические показатели инвазивным способом.

В условиях внутрибрюшинной наркотизации тиопенталом натрия, в дозе 20 мг/100 г массы тела, во всех группах животных измерялось среднее артериальное давление (САД) инвазивно (кровоизмерителем) электроманометром через пластиковый катетер, наполненный 10% раствором гепарина вводимый в правую бедренную артерию. Регистрация осуществлялась на мониторе МХ-04 с распечаткой данных на принтере Epson LX – 1050+. По специальным формулам рассчитывались сердечный индекс, ударный индекс, удельное периферическое сосудистое сопротивление (УПСС).

Гемодинамические исследования проводились через 60 дней после введения амилоидогена, после чего животные забивались тиопенталом натрия. Образцы тканей фиксировались в 10% нейтральном и кислом формалине с последующим приготовлением парафиновых срезов толщиной 5-6 микрон. Срезы окрашивались гематоксилином и эозином, конго-красным. Изучение срезов проводилось в проходящем свете при помощи микроскопа Микмед-1 под увеличением $\times 80$, $\times 200$, $\times 600$.

Для статистической обработки полученных данных использовались параметрический и непараметрический метод сравнения средних величин с помощью t-критерия Стьюдента. Обработка данных проводилась с помощью компьютерной программы «Statistica 8.0», где M-средняя арифметическая, $m \pm$ – коэффициент ошибки, n- общее число вариантов. Для расчетов и построения диаграмм- программы «Prizm 2.01, Microsoft Excel 2003, Microsoft PowerPoint 2003».

Проведены серии опытов в 2-х группах животных:

1-я группа – (20 старых крыс-самцов линии «Вистар») – контрольная;

2-я группа – (20 старых крыс-самцов линии «Вистар») – опытная – с моделированием амилоидоза.

Морфологическому исследованию на предмет выявления амилоидоза подверглись сердце с крупными сосудами, печень, селезенка, почки, толстая кишка.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований получены морфологические доказательства эффективности однократного применения нативного яичного альбумина в сочетании с полным адьювантом Фрейнда для моделирования экспериментального системного амилоидоза у старых крыс-самцов.

При исследовании основных показателей гемодинамики отмечалась тенденция к снижению артериального давления, что было обусловлено достоверным уменьшением сердечного выброса. Очевидно, что развитие амилоидной кардиопатии вызвало снижение ударного и, соответственно, сердечного индекса (табл.). Удельное периферическое сосудистое сопротивление при этом имело тенденцию к повышению.

Таблица

Изменения основных показателей гемодинамики при формировании экспериментальной кардиопатии

Группа	Показатель	САД	Сердечный индекс	Ударный индекс	УПСС	ЧСС
Интактная	$M \pm m$	112,5 \pm 1,21	45,785 \pm 0,614	0,118 \pm 0,0015	2,015 \pm 0,031	391,75 \pm 5,48
Опытная	$M \pm m$	109,1 \pm 1,45	36,8 \pm 1,36*	0,098 \pm 0,005*	2,4 \pm 0,112	376,8 \pm 11,03

Примечание: * – достоверные изменения ($p < 0,05$)

Гистологически у 2-ой группы животных в миокарде (рис. 1) при окраске срезов гематоксилином и эозином, а также конго-красным отмечалась белковая и жировая дистрофия кардиомиоцитов, их очаговая конгофилия, исчезновение поперечной исчерченности, набухание отдельных групп кардиомиоцитов, гомогенизация. Выявлены фокусные очаги фибриноидного некроза и дегенеративные изменения интерстициальных стромально – сосудистых структур. Имело место мукоидное и фибриноидное набухание, очаговое разрыхление и гомогенизация волокнистых элементов интерстиция.

Кроме того, в миокарде (рис.2) выявлены дистрофические и некробиотические изменения сосудов микроциркуляторного русла: прекапилляров, капилляров, посткапилляров, венул в виде застойной гиперемии, плазматического пропитывания стенок, периваскулярного отека, склероза отдельных участков, гиалиноза просвета терминальных фрагментов микрососудистой сети. Во всех указанных отделах системы микроциркуляции, начиная с артериол, отмечена выраженная конгофилия стенок и периваскулярных пространств микрососудистой системы. Местами атрофичные участки кардиомиоцитов сочетались с пролиферацией лимфогистиоцитарных клеточных элементов .

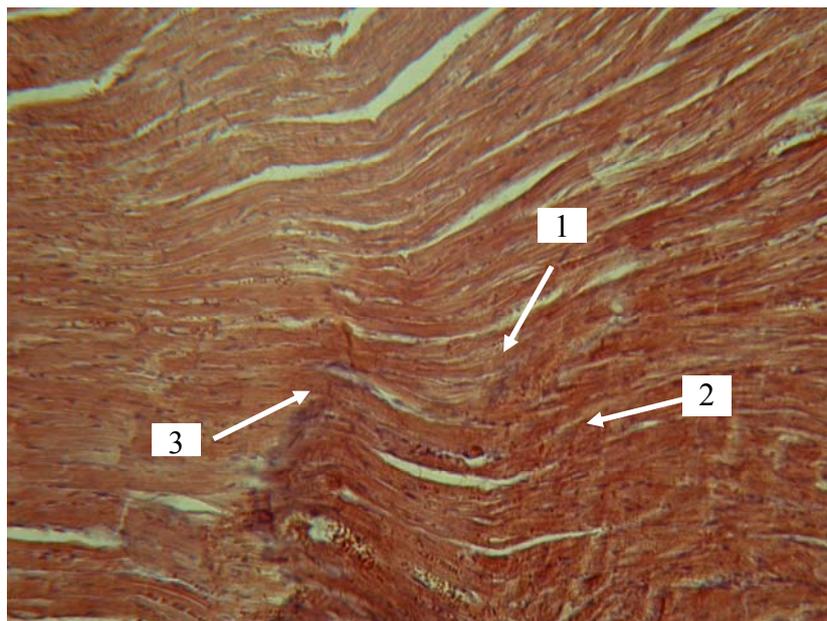


Рис. 1. У 2-ой группы животных в миокарде отмечались дистрофические и некробиотические изменения кардиомиоцитов (1), их очаговая конгофилия (2), исчезновение поперечной исчерченности (3). Окраска конго красным. X 200

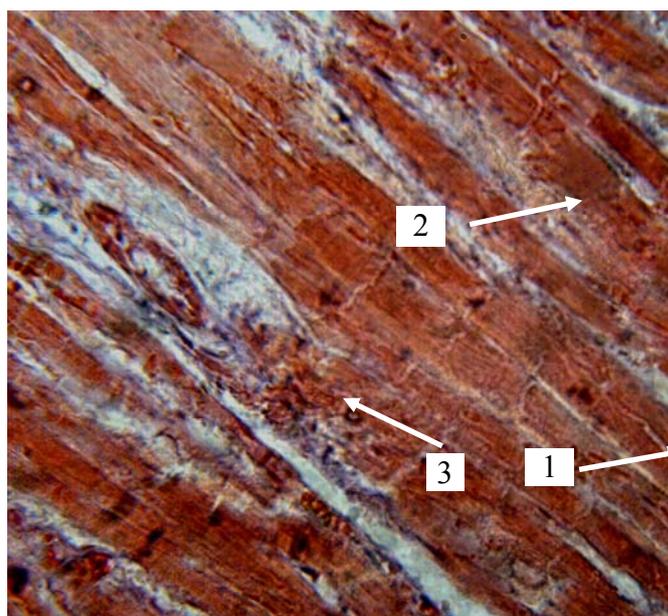


Рис. 2. В миокарде отмечены дистрофические изменения кардиомиоцитов (1), застойная гиперемия, гиперперфузия, плазматическое пропитывание стенок сосудов микроциркуляторного русла (2), периваскулярный отек (3). Окраска гематоксилином и эозином. X600

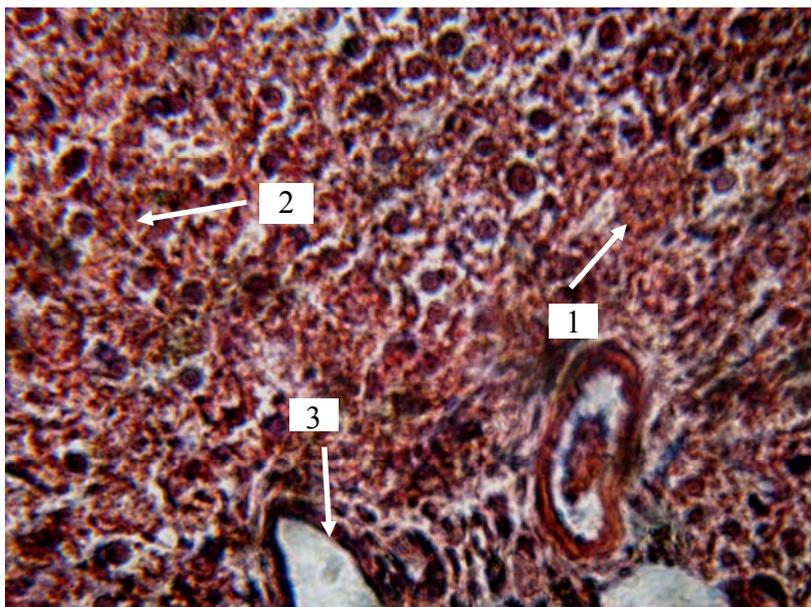


Рис. 3. В печени жировая дистрофия гепатоцитов, очаговые нарушения citoархитектоники долек, резкое расширение пространств Диссе (1). Холестазы (2). Плазматическое пропитывание и расширение просвета центральной вены (3). Окраска гематоксилином и эозином. X600

В печени (рис. 3) отмечались жировая дистрофия гепатоцитов, очаговые нарушения citoархитектоники долек, резкое расширение пространств Диссе. Доказательством дегенеративных изменений органоспецифических структур печени служили кариопикноз, кариорексис, кариолизис отдельных гепатоцитов (признаки некроза). Наблюдались редкие очаговые межбалочные лимфогистиоцитарные скопления, гиперемия, плазматическое пропитывание и перифлебический отек центральных вен. Отек, гиперемия, плазматическое пропитывание артерий и вен порталных междольковых триад, сочетались с выраженной конгофилией стенок указанного комплекса сосудов и системы микроциркуляции. Отмечался коллапс стромы вокруг центральных вен отдельных печеночных долек с некрозом и атрофией гепатоцитов. Выявлялись лимфогистиоцитарные инфильтраты, в особенности, выраженные в зонах повышенной гиперемии, плазматического пропитывания, отека и лимфостазов порталных трактов.

В селезенке повышенная конгофилия отдельных лимфоидных фолликулов (саговая селезенка), перифолликулярный циркулярный амилоидоз групп фолликулов сочетались с исчезновением лимфоидной ткани, при некоторой сохранности волокнистых структур. Амилоидоз (конгофилия) центральных артериол фолликулов и стромально-сосудистых структур органа был четко выражен. Отмечались крупные макрофаги с конгофильной цитоплазмой и светлым перицитарным ореолом, свободным от признаков конгофилии. Возможно, имел место феномен амилоидоклазии клетками макрофагально-эндотелиальной системы. Кроме того, выявлялось очаговое скопление клеточных элементов со светлой цитоплазмой, конгофильными гранулами и ярко выраженной перицитарной конгофилией – феномен секреции амилоида амилоидобластами (клетки В.В. Серова). По литературным сведениям и результатам нашего исследования, амилоидоз селезенки является доказательством генерализации процесса.

В почках ярко выраженная очаговая конгофилия стромально-сосудистых структур органа: базальных мембран, капилляров клубочков, клубочковых капсул, эпителия, преимущественно проксимальных и дистальных канальцев, фиброзной капсулы почки и отходящих от неё в корковый слой соединительнотканых тяжей. Кроме того, выявлялась метахроматическая реакция стенок органоспецифической сосудистой системы почки, указывающая на накопление и перераспределение гликозаминогликанов в межклеточном веществе. Имеет место амилоидная атрофия отдельных клубочков, характеризующаяся повышенной конгофилией, амилоидоз приносящих и выносящих артериол и последующих сосудов системы микроциркуляторного русла. Тромбоз и гиалиноз отдельных групп капилляров. Выявились редкие перигломерулярные и периваскулярные лимфогистиоцитарные инфильтраты, состоящие в основном из Т-и В- лимфоцитов, плазматиков, гистиоцитов, ретикулярных клеток, лимфоидных элементов.

Подтверждением генерализации процесса служит обнаружение в эпителиальных и стромально-сосудистых структурах толстой кишки выраженных конгофильных участков (у 80% животных), что соответствует литературным сведениям. Несколько меньший процент фибриллярных белков амилоида (54–50%) выявлен в деснах, что также соответствует среднестатистическим литературным показателям.

Выводы:

1. Однократное подкожное введение старым крысам равнодолевой смеси нативного яичного альбумина и полного адьюванта Фрейнда из расчета по 0,2 мл в 5 точек инъекций (внутрибрюшинно, в паховые и подмышечные области слева и справа подкожно), способствует формированию системного амилоидоза с преимущественным поражением сердца, печени, селезенки, почек, толстой кишки
2. Развитие экспериментального амилоидоза сопровождается тенденцией к снижению у животных артериального давления, что, вызвано уменьшением сердечного выброса в результате развития амилоидной кардиопатии.
3. Предложенный способ моделирования амилоидоза является одним из самых эффективных, экономически менее затратных и простых, так как для достижения положительного результата, достаточно однократного введения предложенного амилоидогена.

Литература

1. *Беликова, А.Т.* Новая модель экспериментального амилоидоза / А.Т. Беликова, В.Б. Брин, К.М. Козырев // Кубанский научный медицинский вестник.–2011.– №2.– С.12–15.
2. *Брин, В. Б.* Функционально-морфологическая характеристика новой модели экспериментального амилоидоза / В.Б. Брин, К.М. Козырев, А.А. Габуева [и др.] // Журнал теоретич. и практич. медицины.– Воронеж (ВГМА), 2010.–Т.8.– С.80–82.
3. *Брин, В.Б.* Функционально- морфологическая характеристика экспериментальной амилоидной нефропатии / В.Б. Брин, К.М. Козырев, И.У. Пухова //Вестник новых медицинских технологий.– Тула, 2008.–Т.ХV, №2.– С.33–34.
4. *Брин, В.Б.* Функционально-морфологическая характеристика новой модели амилоидной нефропатии у экспериментальных животных. //Вестник новых медицинских технологий.– Тула, 2009. – Т. XVI, № 4. – С. 29–30.
5. *Габуева, А.А.* Функционально-морфологическая характеристика новой модели амилоидной нефропатии у крыс / А.А. Габуева, В.Б. Брин, К.М. Козырев // Вестник МАНЕБ.– 2010.– Т.15, №2.– С.77– 80.
6. *Габуева, А.А.* Влияние сульфидной минеральной воды «Редант-4Р» на функцию, состояние почек при нефропатическом типе генерализованного амилоидоза / А.А. Габуева, В.Б. Брин, К.М. Козырев // Владикавказский медико-биологический вестник. –2009-2010. – Т.IX.– С.101–104.
7. *Гюева, З.В.* Функциональная и морфологическая характеристика новой модели экспериментального амилоидоза / З.В. Гюева, В.Б. Брин, К.М. Козырев, О.Т. Кабисов, Т.В. Заалишвили //Вестник новых медицинских технологий. – Тула, 2007. – Т.XIV, № 1.– С.96–98.
8. *Закс, Т.В.* Влияние мелатонина на патогистологические изменения внутренних органов при экспериментальном амилоидозе / Т.В. Закс, В.Б. Брин, К.М. Козырев // Владикавказский медико-биологический вестник. – 2010. – Т.X.– С.66–70.
9. *Заалишвили, Т.В.* Функционально-морфологический анализ экспериментальной модели амилоидоза почек у мышей. Влияние монотерапии милдронатом / Т.В. Заалишвили // Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Владикавказ, 2005. – 21 с.
10. *Козырев, К.М.* Морфобиохимические особенности β - амилоидозов мозга у долгожителей / К.М. Козырев, С.П.Сяткин, Т.Т. Березов // Вестник РАМН. – 2002.–№ 7.– С.3 – 9.
11. *Козырев, К.М.* Патогенез и клинко-морфологические особенности нейродегенеративных заболеваний у долгожителей различных климатических районов Северного Кавказа / К.М. Козырев, З.Р. Тутаева //Вестник новых медицинских технологий. – 2005. – Т.XII, №3–4.– С.120 – 124.
12. *Пухова, И.У.* Влияние янтарной кислоты на функциональное состояние почек при нефропатическом типе генерализованного амилоидоза / И.У. Пухова, В.Б. Брин, К.М. Козырев //Вестник МАНЕБ.– 2008.– Т.14, №3.– С.34–37.
13. *Bohne, S.* Cleavage of AL amyloid proteins and AL amyloid deposits by cathepsin B, K, and L./ S. Bohne, K. Sletten, R. Menard [et al.] // J Pathol. – 2004; 203:528–537.
14. *Bolle, G.* Presentation and outcome of patients with systemic amyloidosis undergoing dialysis / G. Bolle, B. Guery, D. Joly [et al.] // Clin J Am Soc Nephrol 2008; 3: 375–381.
15. *Kezlya, E.* Plaque beta amyloid contributes to synaptic dysfunction in aged mice overexpressing non-mutated human. 14th Congress of the European Federation of Neurological Societies, EFNS 2010 / E. Kezlya, K. Kozirev, N. Koudinova, A.R. Koudinov, T. Berezov. – Zeneva, Abstract: A-256-0005-02012.
16. *Koudinov, A.R.* Compensatory Mechanisms to Heal Neuroplasticity Impairment under Alzheimer’s Disease Neurodegeneration I: The Role of Amyloid Beta and its’ Precursor Protein / A.R. Koudinov, N.V. Koudinova, E.V. Kezlia, K.M. Kozirev, A.E. Medvedev, T.T. Berezov // J. Biomedical Chemistry, 2012.–Vol. 6.– № 1. – PP. 1–10.