

В.А. КОЗЛОВ, В.Ю. АЛЕКСАНДРОВА, Ю.В. ВАСИЛЬЕВА,
С.П. САПОЖНИКОВ, П.Б. КАРЫШЕВ

**СИСТЕМНЫЙ АМИЛОИДОЗ У МОЛОДЫХ МЫШЕЙ,
ИНДУЦИРОВАННЫЙ ВВЕДЕНИЕМ СЛЮНЫ ЧЕЛОВЕКА**

Ключевые слова: мыши, экспериментальный амилоидоз, слюна человека, конго красный, почка, селезенка, печень, колориметрия, цитологический анализ.

Актуальность исследования заключается в том, что впервые в эксперименте доказано, что внутрибрюшинное введение слюны человека молодым мышам вызывает развитие системного амилоидоза, сопоставимого с наследственным системным амилоидозом людей, индуцируемым мутагенным изменением лизоцима слюны. Цель исследования: апробация слюны человека как амилоидогена в модельном эксперименте на молодых мышах в сравнении с ранее разработанной нами альбуминовой моделью амилоидоза.

Белых мышей-самцов массой 20,0-25,0 г делили на шесть групп:

Интактные мыши (5); 30 дней 1 раз через день внутрибрюшинно вводили группам:

1 (5) соевый заменитель сливок ТУ 9199-004-58706213-10 15 10 г/100 мл воды 0,1 мл/10 г;

2 (3) слюну здорового человека (СЗЧ) 0,5 мл;

3 (3) СЗЧ и ципрофлоксацин (Ц) 0,05 мг/10 г массы;

4 (3) слюну человека с хроническим тонзиллитом (ремиссия, СХТ);

5 (3) СХТ+Ц.

Масса почек менялась от 176,0±21 мг у интактных мышей (ИМ) до 197±43,0, 195,0±18,0, 195,0±18,0, 183,0±44,0, 153,0±25,0 мг, соответственно. Число клеток в поле зрения эпителия канальцев уменьшалось в 1,3, 1,2, 1,6, 1,4, 1,4 раза от числа клеток в поле зрения у ИМ (380,0±84,0, $p = 0,00$), клеток клубочков – в 1,4, 1,1, 1,3, 1,2, 1,2 раза от числа клеток клубочков у ИМ (34,0±11,0, $p = 0,02$), группы 1–5, соответственно. Площадь клубочков уменьшалась в 2,4, 2,7, 2,3, 2,4, 3,0 раза от средней площади клубочков у ИМ (3163,7±832,7 мкм², $p = 0,0000$). Относительная площадь амилоидного поражения при окрашивании конго красным: 18,4±8,2% (группа 1), 26,7±10,6, 35,0±11,9, 45,7±13,2, 63,6±14,0% (группы 1–5).

Масса и длина селезенки увеличивались от 133,0±16,0 мг (ИМ) в 1,7, 1,7, 1,8, 2,1, 1,7 раза и от 17,0±2,0 мм (ИМ) в 1,2, 1,2, 1,3, 1,4, 1,2 раза, число клеток в поле зрения уменьшалось от 1318±205 (ИМ) в 1,7, 2,0, 3,3, 2,1, 2,0 раза, группы 1–5, соответственно ($p < 0,01$). Относительная площадь амилоидного поражения при окрашивании конго красным: 11,4±9,4%, 28,2±16,0, 27,9±20,8, 20,9±12,2, 16,5±8,3% (группы 1–5).

Масса печени менялась от 1,4±0,15 г (ИМ) до 1,57±0,26, 1,45±0,18, 1,53±0,1, 1,71±0,3, 1,36±0,4 г, число клеток в поле зрения уменьшалось от 67,0±15,0 (ИМ) в 1,9, 1,4, 1,8, 2,5, 1,9 раза, площадь ядер гепатоцитов – от 54,0±12,3 мкм (ИМ) в 3,1, 3,6, 4,2, 3,1, 3,3 раза (группы 1–5 соответственно, $p < 0,01$). Относительная площадь амилоидного поражения при окрашивании конго красным: 6,8±4,6%, 15,3±11,0, 24,5±12,8, 9,8±8,5, 12,6±2,3% (группы 1–5).

Выводы: 1) слюна человека при внутрибрюшинном введении вызывает у молодых мышей тяжелый системный амилоидоз с поражением как минимум печени, почек и селезенки, проявляющий себя в большей степени цитотоксическим действием, чем объемом отложения амилоида; 2) слюна человека содержит более активный амилоидоген, чем альбумин в комплексе с наполнителями рецептуры соевого заменителя сливок; 2) слюна человека с хроническим тонзиллитом в стадии ремиссии более амилоидогенна, чем слюна здорового человека; 3) ципрофлоксацин, вводимый в процессе формирования амилоидной модели в терапевтической дозе, умеренно увеличивает тяжесть амилоидного поражения органов; 4) слюна человека может быть использована для моделирования амилоидоза в эксперименте на молодых мышах; 5) печень, возможно, содержит ферментативные системы, осуществляющие функцию амилоидоклазии.

Белок слюны лизоцим, содержащий амилоидную аминокислотную последовательность [5], включен в международную классификацию белков-амилодогенов [11, 12], в которой указан как единственный амилоидогенный белок слюны. Лизоцим изредка является причиной системного наследственного семейного амилоидоза [6]. Амилоидогенность белков-предшественников амилоида, как правило, связывают с предшествующей мутацией в соответствующем гене, приводящей к замене одной из аминокислот, что способствует протеолизу белка по амилоидогенному пути и выделению амилоидной аминокислотной последовательности [5, 16]. Кроме того, причиной спонтанного фолдинга белка-предшественника в амилоидную конформацию является изменение ионной силы среды окружения амилоидогенных белков [2, 9].

Мутации в гене лизоцима, приводящие к заменам Тре56Иле и Гис67Асп, вызывают развитие тяжелого наследственного семейного генерализованного амилоидоза с преимущественным поражением пищеварительных путей и печени [7]. Замена в лизоциме Фен57Иле связана с амилоидозом почек [14], а замена Тгр82Арг сопровождается доминирующим поражением почек с массивными отложениями амилоида в клубочковом мезангии и субэндотелии [15]. Возможное участие собственного лизоцима в формировании локального амилоидоза при хроническом тонзиллите нами было обнаружено ранее в результате выявления амилоида в одиночных слюнных железах, расположенных рядом с эктомированными по поводу хронического тонзиллита миндалинами [8]. В настоящее время лизоцим используется как модельный белок для изучения амилоидного фибриллогенеза в модельных биофизических экспериментах [10, 13]. Тем не менее наиболее часто используемым для формирования амилоидной модели в эксперименте является альбумин – яичный, бычий, реже человека [2–4].

Поскольку ранее нами было обнаружено, что хронический тонзиллит сопровождается амилоидозом миндалин и одиночных слюнных желез у 30% людей с этой патологией [8], нам показалось интересным провести сравнение амилоидогенности альбумина, неоднократно апробированного нами способа формирования амилоидоза [1], с лизоцимом в эксперименте. Сведений о моделировании амилоидоза на животных с помощью лизоцима или слюны человека в доступной литературе мы не нашли.

Цель исследования: изучение влияния слюны человека в модельном эксперименте на молодых мышах на формирование системного амилоидоза в сопоставлении с альбуминовой моделью.

Материал и методы исследования. Дизайн исследования. Эксперимент проведен на 22 молодых беспородных белых мышах-самцах массой 20,0–25,0 г, содержащихся в обычных условиях вивария. Животные были разделены на шесть групп: интактные – 5 мышей, содержались вместе с подопытными мышами без имитации каких-либо воздействий; мышам группы 1 моделировали генерализованный амилоидоз ранее апробированным нами способом – внутрибрюшинным введением соевого заменителя сливок ТУ 9199-004-58706213-10 в концентрации 10 г на 100 мл воды один раз в день через день в объеме 0,1 мл на 10 г массы мыши, позволяющим получить стабильный воспроизводимый результат [1]. Мышам группам 2-5 (по три мыши в каждой) внутрибрюшинно вводили слюну людей в количестве 0,5 мл через день в течение 30 дней: группы 2 – слюну здорового человека; группы 3 – слюну здорового человека, санированную ципрофлоксацином; группы 4 – слюну человека с храни-

ческим тонзиллитом в стадии ремиссии; группы 5 – слюну человека с хроническим тонзиллитом в стадии ремиссии, санированную ципрофлоксацином.

Получение слюны и ее обеззараживание. Слюну получали после предварительного интенсивного полоскания полости рта дистиллированной водой в течение 5 мин для удаления остатков пищи. Ципрофлоксацин в слюну вносили в количестве, обеспечивающем его поступление в суточной дозе 0,05 мг/10 г живой массы мыши.

Гистологическое исследование материала. Животных из эксперимента выводили путем декапитации. Изъятые почки, селезенки и печень гравиметрировали (г), фиксировали 10%-ным нейтральным формалином, обезжизняли и заливали парафином по обычному протоколу. На всех этапах приготовления препаратов все манипуляции с ними проводили одновременно в одном объеме окрашивающих сред. Депарафинированные срезы (5 мкм) последовательно окрашивали гематоксилином Карацци, а затем – 1%-ным водным раствором конго красного по Н. Bennhold, обезжизняли и заключали в прозрачную среду. Срезы на микроскопе Микмед-5 фотографировали в проходящем белом свете (лампа Feron G4 4000 K). Микрофотографии гистологических препаратов получали с помощью видеоокуляра Levenhuk C800 NG 8M, USB 2.0 при увеличении 400 и разрешении 1280×960 пикселей по 10 микрофотографий с каждого среза. В качестве статистических величин на полученных микрофотографиях в программе LevenhukLite измеряли:

- относительную площадь амилоидного поражения

$$S_{\text{отн. А}} = \frac{\text{Площадь в пикселях, покрашенная в цвета конго красного}}{\text{Площадь всего поля зрения в пикселях}} \times 100\%;$$

- количество клеток почечных канальцев в поле зрения, почечных клубочков, селезенки без дифференцировки по типам, гепатоцитов не менее чем на десяти микрофотографиях, которое усредняли;

- площадь почечных клубочков и ядер гепатоцитов (мкм²).

Колориметрия. Цветоанализ микрофотографий осуществляли в программе Color Analysis (GNU лицензия), запускаемой в среде Windows 10 (X22-13124) в эмуляторе Android Nox Player 6.6.1.0 (GNU лицензия). Программа распознает оттенки цвета (аддитивная цветовая RGB модель) и относительную площадь окрашивания микрофотографий каждым оттенком.

Статистическая обработка материала. Достаточность количества подопытных животных обоснована с помощью расчета в online калькуляторе (<https://fdgroup.ru/poleznaya-informatsiya/stati/vyborka-tipy-vyborok-raschet-oshibki-vyborki/>). Полученные численные данные обработаны методами дескриптивной статистики (<https://www.math10.com/ru/reshenie-zadach-onlain/statisticheskii-kalkulyator.html>). Данные представлены в виде $\bar{M} \pm m$, где $\bar{M}$ – средняя, m – стандартная ошибка. После проверки на тип распределения каждой выборки, отличающийся от нормального, различия между группами определяли с помощью калькулятора z-теста (<https://mathcracker.com/z-test-for-two-means>). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Гистологические препараты были предварительно визуально оценены на морфологическую и цветовую однородность. Гистоморфологический паттерн срезов в пределах группы был однородным.

Почка. Интактная группа. Макро- и микроморфологический паттерн почки интактных мышей соответствовал возрастной норме. Средняя влажная масса почки интактных мышей, число клеток канальцевого эпителия, клеток и площадь клубочков показаны в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Результаты гравиметрии

Группа	M±m	Min	Max	P =
Почка, влажная масса, мг				
Интактная	176,0±21,0	130,0	220,0	
1	197,0±43,0	120,0	320,0	0,0074
2	195,0±19,0	170,0	220,0	0,0426
3	195,0±18,0	168,0	216,0	0,0416
4	183,0±44,0	120,0	230,0	0,5211
5	153,0±25,0	120,0	180,0	0,0186
Селезенка, влажная масса, мг				
Интактная	133,0±16,0	100,0	160,0	
1	223,0±96,0	120,0	372,0	0,0002
2	220,0±30,0	190,0	240,0	0,0015
3	240,0±10,0	150,0	320,0	0,0001
4	280,0±80,0	180,0	320,0	0,0057
5	230,0±10,0	140,0	330,0	0,001
Длина, мм				
Интактная	17,0±2,0	14,0	20,0	
1	21,0±4,0	16,0	33,0	0,0082
2	21,0±1,0	20,0	22,0	0,0027
3	22,0±4,0	18,0	25,0	0,0014
4	23,0±3,0	20,0	26,0	0,0001
5	21,0±3,0	18,0	24,0	0,0052
Печень, влажная масса, г				
Интактная	1,4±0,15	1,1	1,6	
1	1,57±0,26	1,2	1,99	0,0153
2	1,45±0,18	1,27	1,63	0,6053
3	1,53±0,1	1,45	1,6	0,0195
4	1,71±0,3	1,25	2,52	0,085
5	1,36±0,4	1,37	1,75	0,7388

Таблица 2

Результаты цитометрии органов

Группа	M±m	Min	Max	$\rho_{\text{и}} =$	$\rho_{\text{км}} =$	M±m	Min	Max	$\rho_{\text{и}} =$	$\rho_{\text{км}} =$
Почка										
	Число клеток канальцевого эпителия					Площадь клубочков, мкм²				
Интактная	380,0±84,0	170,0	540,0			3163,7±832,7	1518,3	5469,4		
1	292,0±74,0	107,0	410,0	0,000		1319,5±305,6	731,6	2007,6	0,000	
2	312,0±105,0	140,0	553,0	0,002	0,399	1173,5±447,4	496,4	1994,9	0,000	0,116
3	242,0±81,0	24,0	380,0	0,000	0,009	1403,6±303,9	785,0	1925,7	0,000	0,252
4	264,0±45,0	180,0	340,0	0,000	0,060	1324,9±368,3	649,3	2373,3	0,000	0,947
5	277,0±74,0	26,0	430,0	0,000	0,399	1064,0±275,4	5393,0	1543,1	0,000	0,001
	Число клеток клубочков					Относительная площадь амилоидного поражения, %				
Интактная	34,0±11,0	18,0	80,0							
1	25,0±6,0	12,0	35,0	0,000		18,4±8,2	2,1	58,3		
2	31,0±10,0	10,0	56,0	0,188	0,003	26,7±10,6	8,5	45,8	0,000	
3	27,0±7,0	15,0	52,0	0,001	0,204	35,0±11,9	15,0	60,2	0,000	
4	29,0±8,0	15,0	43,0	0,021	0,033	45,7±13,2	23,3	74,2	0,000	
5	28,0±7,0	12,0	45,0	0,005	0,058	63,6±14,0	35,3	88,5	0,000	

Окончание табл. 2

Группа	M±m	Min	Max	$p_i =$	$p_{KM} =$	M±m	Min	Max	$p_i =$	$p_{KM} =$
Селезенка										
	Число клеток в поле зрения					Относительная площадь амилоидного поражения, %				
Интakтная	1318±205	920	1920							
1	793±143	510	1160	0,0000		11,4±9,4	1,1	48,1		
2	674±145	270	970	0,0000	0,0026	28,2±16,0	6,4	61,9	0,0000	
3	403±235	6	800	0,0000	0,0000	27,9±20,8	3,6	89,6	0,0034	
4	640±129	260	860	0,0000	0,0000	20,9±12,2	5,3	62,4	0,0013	
5	661±100	430	830	0,0000	0,0000	16,5±8,3	5,0	36,4	0,0298	
Печень										
	Число гепатоцитов					Площадь ядер гепатоцитов, мкм²				
Интakтная	67,0±15,0	38,0	96,0			54,0±12,3	35,3	85,4		
1	35,0±7,0	24,0	51,0	0,0000		17,5±3,6	9,9	27,5	0,0000	
2	47,0±12,0	24,0	73,0	0,0000	0,0000	15,1±3,1	8,8	20,8	0,0000	0,0076
3	37,0±11,0	7,0	60,0	0,0000	0,4043	12,9±5,9	4,5	22,8	0,0000	0,0006
4	27,0±9,0	13,0	46,0	0,0000	0,0003	17,7±5,7	7,8	30,4	0,0000	0,8715
5	36,0±9,0	21,0	59,0	0,0000	0,6328	16,5±2,8	10,7	22,8	0,0000	0,2346
Относительная площадь амилоидного поражения, %										
					p_p	p_c				
1	6,8±4,6	1,9	18,2		0,0000	0,0193				
2	15,3±11,0	3,4	58,3	0,0235	0,0001	0,0006				
3	24,5±12,8	5,7	44,8	0,0001	0,0017	0,4488				
4	9,8±8,5	0,8	2,7	0,3574	0,0000	0,0001				
5	2,6±2,3	0,1	9,0	0,1422	0,0000	0,0000				

Примечание. p_i – значения p по отношению к интактным животным; p_{KM} – значения p по отношению к животным из группы «контроль модели»; p_p – значения p по отношению к аналогичному значению в печени той же группы; p_c – значения p по отношению к аналогичному значению в селезенке той же группы.

На гистологических срезах, окрашенных в оттенки гематоксилина, клубочки обычной формы и размера, париетальный и висцеральный листки капсулы Шумлянско-Боудена, как правило, плотно прилегают друг к другу. Эпителий канальцев также плотно прилегает друг к другу. При цветоанализе препаратов большая часть препаратов окрашена в оттенки гематоксилина (рис. 1, а). На пустые пространства (серые цвета – просвет канальцев и капсул Шумлянско-Боудена) суммарно приходится 13,4±1,5% площади. На остаточное окрашивание конго красным, по-видимому, приходится 1,8±0,4%. Коричневый и пурпурно-розовые цвета, по-видимому, являются результатом смешивания естественного цвета среза почки и гематоксилина.

Группа 1. Средняя влажная масса почки мышей, подвергшихся моделированию амилоидоза с помощью введения соевого заменителя сливок, статистически значимо увеличена на 12% по сравнению с влажной массой почки у интактных животных (табл. 1). Срезы интенсивно окрашены в оттенки красно-коричневого цвета. Просвет капсул Шумлянско-Боудена и канальцев расширен. Срез похож на ткань, изъеденную молью. Стенки сосудов мышечного типа утолщены, окрашены в цвета конго. Наблюдается выраженная цитопения: клеток эпителия канальцев меньше в 1,3 раза, клеток клубочков – в 1,36 раза, чем у интактных животных. В 2,4 раза уменьшена площадь клубочков, площадь амилоидного поражения срезов составляет пятую часть (табл. 2). Данные цветоанализа представлены на диаграмме под рис. 1, б. Заметно появление новых оттенков красного и пурпурного цвета, последние, видимо, являются результатом смешивания цветов конго, окрасившего диффузно распределенный амилоид, и гематоксилина. Собственно, на чистые цвета гематоксилина приходится 4,8±0,8% площади. Площадь пустого пространства составляет 41,0±1,0%, что в 3,1 раза больше, чем в интактной группе ($p = 0,0000$).

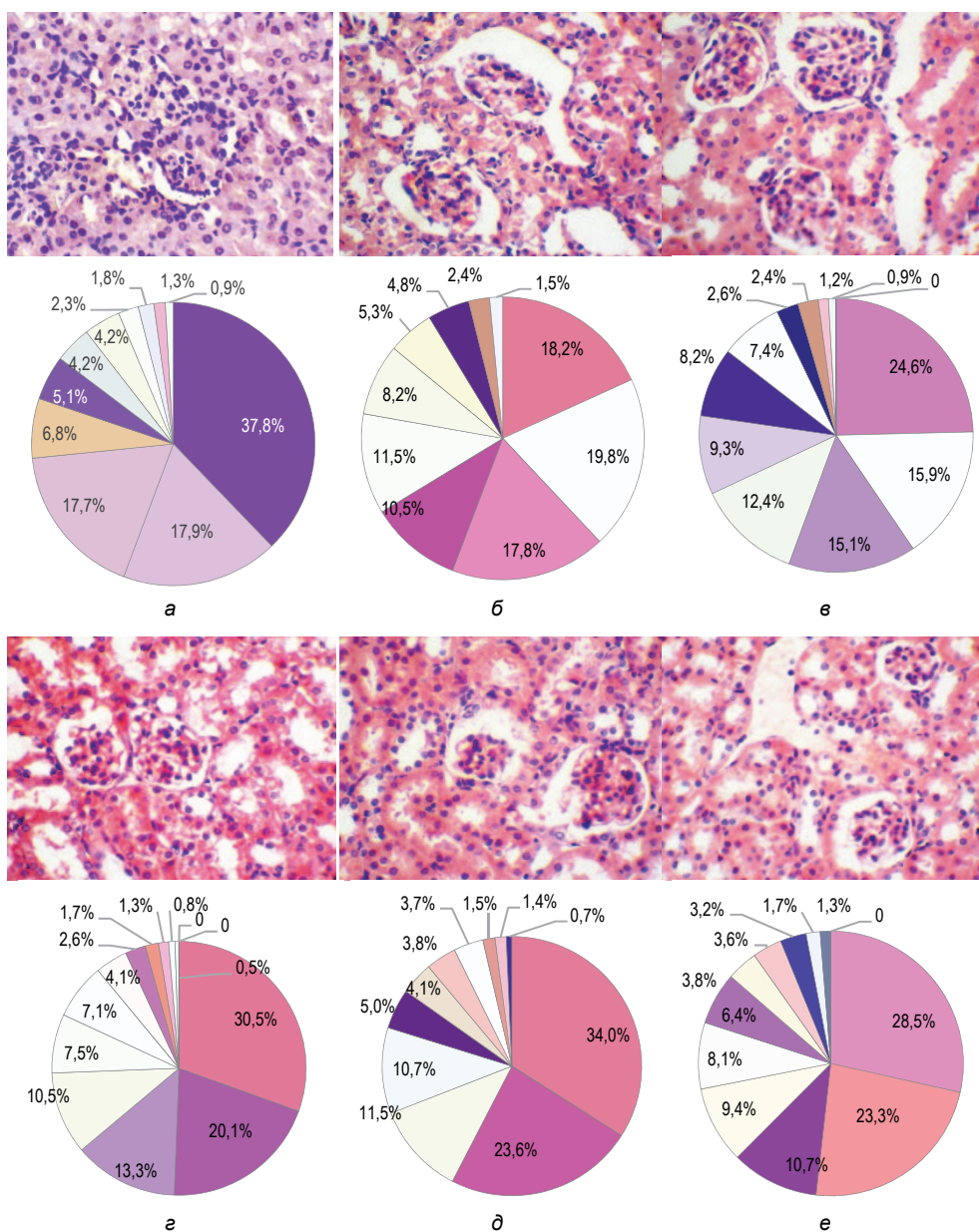


Рис. 1. Различия визуального паттерна амилоидного поражения почек мышей в зависимости от условий эксперимента:
 а – интактная почка здоровых мышей; б – амилоидоз почки, вызванный введением соевого заменителя сливок; в – амилоидоз, вызванный слюной относительно здорового человека; г – амилоидоз, вызванный слюной относительно здорового человека, обеззараженной ципрофлоксацином; д – амилоидоз, вызванный слюной человека с хроническим тонзиллитом; е – патоморфологический статус почки мыши после внутрибрюшинного введения слюны человека с хроническим тонзиллитом, обеззараженной ципрофлоксацином.
 Окраска – гематоксилин, конго красный. Ув. $\times 400$.

Группа 2. Средняя влажная масса почки у интактных животных этой группы аналогична средней влажной массе почки в группе 1 (табл. 1). Число клеток эпителия канальцев и клеток клубочков статистически значимо меньше, чем у интактных животных, но сопоставимо с числом клеток эпителия канальцев и клеток клубочков в группе 2. Площадь клубочков меньше в 2,7 раза. Просветы капсул Шумлянского – Боудена и канальцев расширены. Стенки канальцев утолщены. Междольковые артерии окрашены в цвета конго (рис. 1, в). Вены полнокровны. По данным цветоанализа на окрашивание конго приходится 24,6±3,0% площади срезов, что совпадает с результатами замеров в программе LevenhukLite. Пустое пространство суммарно занимает 36,9±3,6% ($p = 0,0000$ по сравнению с пустым пространством у интактных мышей).

Группа 3. Средняя влажная масса почек этой группы статистически значимо увеличилась в тех же пределах, что и в группах 1 и 2 (табл. 1). При этом число клеток почечного эпителия самое минимальное во всей экспериментальной группе и статистически значимо меньше, чем у интактных животных и в группе 1 (табл. 2). Площадь клубочков сопоставима с площадью клубочков в группе 1 и сильно меньше, чем у интактных животных. Гистологические срезы почек животных этой группы интенсивно окрашены в цвета конго, просвет капсул Шумлянского – Боудена и канальцев увеличен – препараты похожи на изъеденную молью ткань. Сосуды артериального типа окрашены в цвета конго (рис. 1, в). При цветоанализе суммарная площадь закрашивания в цвета конго совпадает с данными, полученными при анализе в программе LevenhukLite. Площадь пустых пространств – 29,7±2,8%, сопоставима с площадью пустых пространств в группах 1 и 2, но больше, чем в интактной группе ($p = 0,0000$).

Группа 4. Средняя влажная масса почки сопоставима с аналогичным показателем интактных животных (табл. 1). Как и в предыдущих случаях, формирование амилоидной модели сопровождается выраженной цитопенией и уменьшением площади клубочков (табл. 2). Площадь амилоидного поражения в 2,5 раза больше, чем в эталонном варианте (группа 1).

Срезы почек интенсивно окрашены в оттенки конго (рис. 1, д). Капсулы Шумлянского – Боудена и просветы канальцев расширены. Стенки сосудов мышечного типа утолщены, содержат конго-положительное вещество. По данным цветоанализа площадь закрашивания в оттенки конго не менее 64%, что в 1,4 раза больше, чем при анализе в программе LevenhukLite. На пустые пространства приходится 25,9±0,9% площади (суммарно).

Группа 5. Средняя влажная масса почек в этой группе оказалась минимальной и даже меньше, чем у интактных мышей (табл. 1). Возможно, это обусловлено тем, что интенсивность процесса сморщивания клубочков в этой группе была максимальной, а их площадь в 3 раза меньше у интактных мышей и животных групп 1, 3 и 4 ($p = 0,001$, 0,0029 и 0,0000, соответственно). Стенки сосудов как мышечного, так и венозного типа утолщены, полнокровны. В отдельных препаратах встречаются кровоизлияния. Если суммировать все длинноволновые тона, полученные при цветоанализе, то площадь закрашивания оттенками красного цвета составляет 55,4±1,4% (рис. 1, е), что сопоставимо с результатом, полученным при анализе в LevenhukLite (табл. 2). Площадь пустого пространства – 23,0±1,2%.

Селезенка. Интактная группа. Морфологический паттерн интактных селезенек соответствует гистологической норме. Все поле зрения плотно заполнено зрелыми клетками и их предшественниками, наблюдается от одного до трех мегакариоцитов в поле зрения. Белая пульпа хорошо выражена, отделена от красной пульпы мелкими трабекулами (рис. 2, а). Результаты макроморфометрии представлены в табл. 1, количество клеток в поле зрения – табл. 2. Результат цветоанализа серии 30 микрофотографий – на диаграмме.

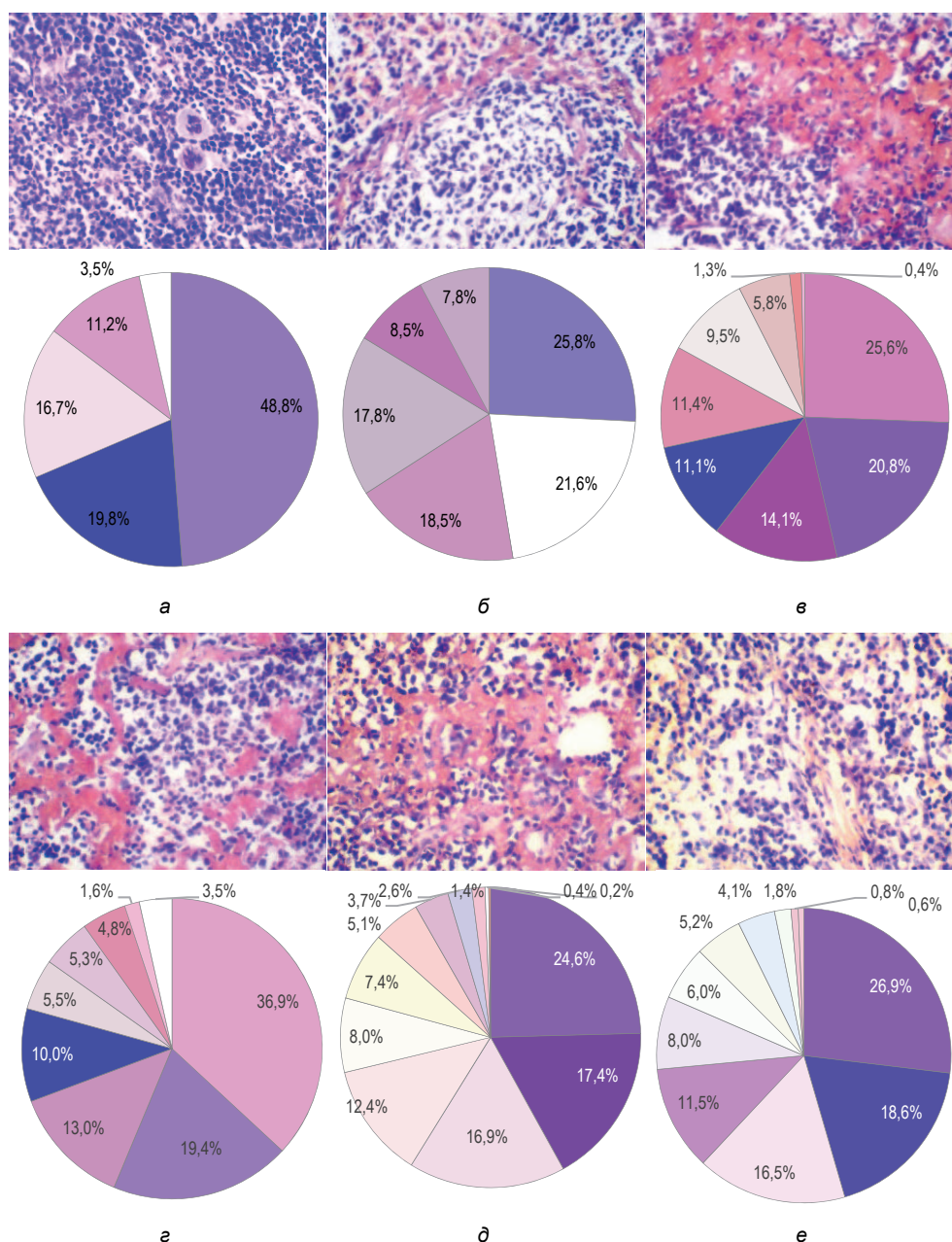


Рис. 2. Различия визуального паттерна амилоидного поражения селезенки мышей в зависимости от условий эксперимента и усредненные колориметрические паттерны соответствующей серии микрофотографий:
 а – интактная селезенка здоровых мышей; б – амилоидоз селезенки, вызванный введением соевого заменителя сливок; в – амилоидоз, вызванный слюной относительно здорового человека; г – амилоидоз, вызванный слюной относительно здорового человека, обеззараженной ципрофлоксацином; д – амилоидоз, вызванный слюной человека с хроническим тонзиллитом; е – амилоидоз, вызванный слюной человека с хроническим тонзиллитом, обеззараженной ципрофлоксацином.
 Окраска – гематоксилин, конго красный. Ув. $\times 400$.

На всех диаграммах цвета сегментов соответствуют полученным при цветоанализе в программе Color Analysis, выдающей результат в виде относительной площади окрашивания (%) каждым цветом, обозначаемым в нотациях аддитивной RGB теории цвета. Преобладают оттенки цвета, свойственные гематоксилину ($68,6 \pm 5,4\%$ суммарно). Белый цвет ($3,5 \pm 0,28\%$) соответствует незакрашенным (пустым) участкам микропрепаратов.

Группа 1. Моделирование амилоидоза [1] сопровождалось статистически значимым увеличением влажной массы селезенки на $67,7\%$ и ее длины – на $16,7\%$ (табл. 1). На микропрепаратах визуально уменьшено количество характерных для селезенки клеток на $39,8\%$, более выраженное в зоне белой пульпы, которая отделена от красной пульпы конго-положительным веществом (табл. 2, рис. 2, б). Относительная площадь амилоидного поражения на препаратах варьирует более чем в 40 раз (табл. 2). При цветоанализе представительство окрашивания гематоксилином уменьшено в 2,7 раза ($p = 0,0000$), а площадь пустых пространств увеличена в 6,2 раза ($p = 0,0000$). Если сопоставить данные табл. 2 и цветовой диаграммы, оттенков, предположительно соответствующих окрашиванию конго красным, объективно больше, чем при визуальной оценке. Расхождения замеров, возможно, обусловлены тем, что отложения конго положительно-го вещества диффузны и мелкие или менее плотные участки окрашивания визуально не воспринимаются, но доступны для цифрового анализа.

Группа 2. Введение слюны относительно здорового человека сопровождалось амилоидным поражением селезенки, более выраженным, чем в группе 1 (рис. 2, в). Тем не менее средняя влажная масса и длина селезенки сопоставимы (табл. 1). Заселенность селезенки типичными клетками резко снизилась на $48,9\%$ от интактного уровня и на 15% по отношению к заселенности селезенки типичными клетками в группе 1 (табл. 2) при сопоставимой относительной площади амилоидного поражения (табл. 2). Суммарная представленность оттенков гематоксилина (пурпурно-синий и синий цвета) – $31,9 \pm 4,6\%$. Площадь пустых пространств (серый цвет – $9,5\%$) меньше в 2,3 раза, чем в группе 1 ($p = 0,0000$). Возможно, это обусловлено тем, что в данной серии препаратов незакрашенные пространства прижизненно были заполнены амилоидными массами, окрасившимися в цвета конго.

Группа 3. Как ни странно, санация слюны относительно здоровых людей циплофлосацином в дозе, аутентичной применяемой у людей в клинике, ухудшала ситуацию. В этой группе влажная масса и длина селезенки увеличивались еще больше – на 81% и $29,4\%$, соответственно (табл. 1). Клеточная заселенность уменьшилась в 3,3 раза по отношению к клеточной заселенности у интактных животных и в 2 раза к клеточной заселенности в группе 1 (табл. 2, рис. 2, в). Относительная площадь амилоидного поражения сопоставима с относительной площадью амилоидного поражения в группе 2, но 2,5 раза больше, чем в эталонной группе 1. В цвета гематоксилина окрашено $29,4 \pm 2,3\%$ (суммарно). Площадь пустых пространств аналогична площади пустых пространств в интактной группе.

Группа 4. Судя по результатам макроморфометрии, в этой группе наблюдалось наиболее тяжелое поражение селезенки. Ее масса в 2,1 раза больше, чем средняя масса селезенки у интактных животных, и статистично больше на $26,5\%$, чем в группе 1. Средняя длина селезенки максимальная по сравнению со средней длиной селезенки во всех группах (табл. 1). Тем не менее клеточная заселенность выше, чем в группе 3, и сопоставима с клеточной заселенностью в группе 2, но все-таки более чем в 2 раза меньше, чем у интактных животных, и на $23,9\%$ меньше, чем в группе 1 (табл. 2, рис. 2, д). Относительная площадь амилоидного поражения меньше, чем в группах 2 и 3, но статистично больше, чем в эталонной группе 1. Площадь окрашивания гематоксилином аналогична площади окрашивания гематоксилином в предыдущих группах. Представительство

оттенков конго можно оценить в $54,9 \pm 6,7\%$ суммарно, что, как и в группе 1, больше, чем при анализе в программе LevenhukLite.

Группа 5. Судя по результатам макроморфометрии, эта группа не отличается от групп 1 и 3, но средняя влажная масса и средняя длина селезенки в ней статистически значимо больше, чем у интактных животных (табл. 1). Клеточная заселенность в 2 раза меньше по сравнению с клеточной заселенностью у интактных животных и на 19,9% меньше, чем в группе 1 (табл. 2, рис. 2, е). Но относительная площадь амилоидного поражения лишь в 1,5 раза превышает аналогичный показатель группы 1 и на 26,7% меньше, чем в группе 4 (различия нестатистичны). Закрашиванию гематоксилином подверглась площадь, несколько большая, чем в группах 1-3, а закрашивание оттенками конго – меньше. Что в целом соответствует анализу, проведенному с помощью программы LevenhukLite.

Печень. Интактная группа. Гистоморфологический паттерн печени интактных мышей соответствовал норме. Дольки гексагональной формы выражены хорошо. Желчные протоки умеренно заполнены гранулами желтоватого цвета. В стенках протоков и печеночных балках наблюдается умеренное количество фибробластов. Гепатоциты содержат одно-два ядра, окрашены в оттенки гематоксилина (рис. 3, а). Количество гепатоцитов и их усредненная площадь показаны в табл. 2. При колориметрии получены характерные для печени коричневые тона и оттенки пурпурной пастели, по-видимому получающиеся в результате взаимодействия естественных пигментов среза с гематоксилином (рис. 3, а). На пустые участки ткани приходится $7,1 \pm 0,46\%$, остаточное неспецифическое окрашивание конго – $2,0 \pm 0,1\%$.

Группа 1. Средняя влажная масса печени мышей, подвергшихся моделированию амилоидоза с помощью введения солевого заменителя сливок, статистически значимо увеличена на 12% по сравнению с аналогом у интактных животных (табл. 1). На гистологических срезах заметно, что печеночные дольки теряют гексагональную структуру. Печеночные протоки расширены, их стенки утолщены, содержат конго-положительное вещество. Гепатоциты отделены друг от друга пустыми пространствами, их количество уменьшалось на 47,7% (табл. 2). Ядра гепатоцитов нередко содержат вакуоли (рис. 3, б), по сравнению с площадью ядер гепатоцитов у интактных животных площадь ядер уменьшалась в 3 раза (табл. 2). В оттенки конго окрашено $14,6 \pm 7,2\%$ пространства микрофотографий, что почти в 2 раза больше, чем при анализе в LevenhukLite (рис. 3, б). Различия, вероятно, обусловлены тем, что амилоид в срезах распределен диффузно, и поэтому очень мелкие участки при выделении вручную в программе LevenhukLite не обнаружены. Значительная часть ($25,1 \pm 2,1$ суммарно) приходится на серозеленые цвета – пустые участки, не содержащие клеток (расширенные печеночные протоки). На оттенки конго приходится $20,3 \pm 4,1\%$ (суммарно), что на 25% больше, чем при анализе в LevenhukLite. В оттенки гематоксилина окрашена четверть пространства микрофотографий.

Группа 2. Средняя влажная масса печени статистически не различается с таковой у интактных животных (табл. 1). Но срезы отчетливо окрашены в краснорозовые цвета. Печеночные протоки расширены. Стенки сосудов мышечного типа резко утолщены, окрашены в цвета конго. Периаартериальное пространство и стенки протоков содержат значительное количество фибробластов (рис. 3, в). Количество гепатоцитов уменьшено по сравнению с количеством гепатоцитов у интактных мышей на 30%, но статистично больше в группе 1 (табл. 2). Их площадь в 3,4 раза меньше у интактных животных (табл. 2). Площадь амилоидного поражения в 2,3 раза больше, чем в группе 1 (табл. 2). В оттенки конго окрашено не менее 58,0% площади микрофотографий (рис. 3, в), что более чем в 2 раза больше, чем при анализе в LevenhukLite. На пустые пространства суммарно приходится $6,9 \pm 2,2\%$. Окрашивание ядер гематоксилином интенсивное.

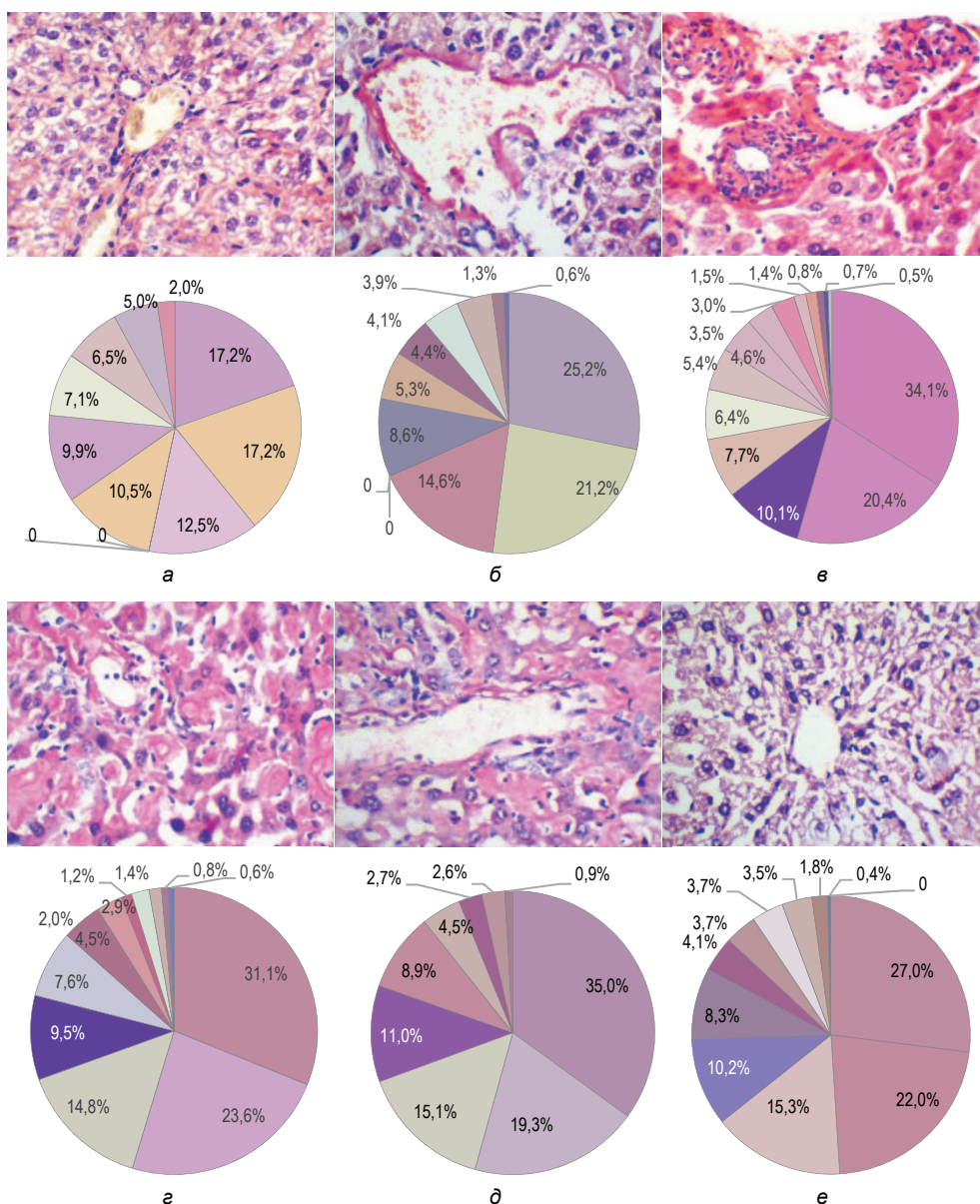


Рис. 3. Различия визуального паттерна амилоидного поражения печени мышей в зависимости от условий эксперимента.

а – интактная печень здоровых мышей; б – амилоидоз печени, вызванный введением соевого заменителя сливок; в – амилоидоз, вызванный слюной относительно здорового человека; г – амилоидоз, вызванный слюной относительно здорового человека, обеззараженной ципрофлоксацином; д – амилоидоз, вызванный слюной человека с хроническим тонзиллитом; е – патоморфологический статус печени мыши после внутрибрюшинного введения слюны человека с хроническим тонзиллитом, обеззараженной ципрофлоксацином.

Окраска – гематоксилин, конго красный. Ув. ×400.

Группа 3. По сравнению со средней влажной массой печени у интактных мышей средняя влажная масса печени мышей этой группы статистично увеличена (табл. 1). Гистоморфологический паттерн на срезах печени резко отличается от нормального – гексагональная структура долек не прослеживается. Форма гепатоцитов изменена, между ними наблюдаются значительные промежутки пустого пространства. Хроматин в ядрах сконденсирован в отдельные глыбки. Обнаруживаются овальной формы конго-положительные депозиты, размер которых сопоставим с размером гепатоцитов. В стенках сосудов мышечного типа и желчных протоков обнаруживаются отложения конго-положительного вещества (рис. 3, е). Количество гепатоцитов по сравнению с количеством гепатоцитов у интактных мышей уменьшено на 44,8%, площадь ядер гепатоцитов снижена в 4,2 раза (табл. 2). В этой группе наблюдалась максимальная площадь амилоидного поражения печени (табл. 3). Видимо, поэтому при цветоанализе площадь окрашивания в оттенки конго составляет $64,1 \pm 2,8\%$ (суммарно). На пустые пространства приходится $23,8 \pm 0,7\%$ (рис. 3, е). Окрашивание ядер гематоксилином интенсивное.

Группа 4. Средняя влажная масса печени (табл. 1), как и площадь амилоидного поражения (табл. 3), сопоставима со средней влажной массой печени у интактных мышей. Но число гепатоцитов в этой группе мышей минимально по сравнению с числом гепатоцитов в остальных группах и в 2,5 раза меньше, чем у интактных мышей (табл. 2). Площадь ядер гепатоцитов в 3 раза меньше, чем в интактной группе, и сопоставима с площадью ядер гепатоцитов в группе 1 (табл. 2). Хроматин ядер гепатоцитов сконденсирован в глыбки, наблюдаются вакуоли. Печеночные протоки расширены, наблюдаются пустые пространства между гепатоцитами (рис. 3, д). В стенках протоков и между гепатоцитами обнаруживаются скопления конго-положительного вещества. На оттенки конго приходится не менее 66,0%. На пустые пространства – $15,1 \pm 3,0\%$ (рис. 3, д).

Группа 5. Средняя влажная масса печени мышей этой группы сопоставима со средней влажной массой печени в группе интактных мышей (табл. 1). Структура печеночных долек прослеживается. Тем не менее печеночные протоки расширены, а между балками наблюдаются большие пустые пространства. Хроматин ядер сконденсирован в глыбки, в ядрах встречаются вакуоли (рис. 3, е). Но относительная площадь амилоидного поражения в 2,6 раза меньше в группе 1 (табл. 2). Несмотря на это, количество гепатоцитов в 1,9 раза меньше, чем у интактных животных, а площадь ядер гепатоцитов меньше в 3,3 раза (табл. 2). Судя по результатам цветоанализа, оттенками конго окрашено не менее 70% площади микрофотографий, но визуально они выглядят как окрашенные в большей степени гематоксилином, что при объективном анализе не соответствует действительности (рис. 3, д). Визуально от интактных данные препараты отличаются только меньшим количеством ядер. Поскольку полученный нами в программе Color Analysis результат замеров был неожиданным, он был повторен при нескольких замерах всей серии из 30 микрофотографий и был устойчив к замене компьютера.

Таким образом, из наших данных следует, что парентеральное введение слюны человека молодым мышам сопровождается формированием системного амилоидоза с поражением печени, почек и селезенки, что совпадает с известными сведениями об индуцированном мутантной формой лизоцима слюны семейно-наследственном амилоидозе [16]. Парентеральное введение слюны человека вызывало у молодых мышей амилоидное поражение органов

более интенсивное, чем введение альбумина в виде соевого заменителя сливок. Судя по полученным результатам, слюна относительно здорового человека более амилоидогенна, чем слюна человека с хроническим тонзиллитом в стадии ремиссии в отношении печени и селезенки, но не почек. Возможно, это связано с тем, что у людей с хроническим тонзиллитом, при котором не менее чем у 30% больных развивается амилоидоз миндалин и одончных слюнных желез [8], наблюдается активация амилодоклазии с выделением соответствующих ферментов в слюну. Второй гипотезой может являться уменьшение выделения в слюну лизоцима, являющегося в данном случае основным претендентом на роль амилоидогена [5, 12]. Наименее поврежденным органом, судя по величинам относительной площади поражения их срезов, оказалась печень, несмотря на то, что белки, всасывающиеся из брюшины после инъекционного введения, в первую очередь поступают в портальный кровоток (табл. 2). Возможно, в нашем эксперименте печень повреждалась меньше потому, что этот орган содержит ферментативные системы, осуществляющие функцию амилодоклазии. Тем не менее в печени животных всех опытных групп отмечены достоверное снижение числа гепатоцитов и более чем трехкратное уменьшение площади их ядер.

В почках тип амилоидного отложения диффузный с поражением как клубочкового, так и канальцевого отделов нефронов и артериальных сосудов, что согласуется с картиной наследственного амилоидоза человека, вызванного мутациями гена лизоцима [15]. Цитотоксический эффект амилоидогенеза был более выражен в отношении клеток селезенки, где наблюдалось двукратное уменьшение числа клеток (табл. 2). Интересно, что ципрофлоксацин усугублял цитотоксичность амилоидогенеза, что сопровождалось значительными повреждениями клеточных ядер, особенно гепатоцитов. Наблюдались уменьшение их средней площади, конденсация и фрагментация хроматина с образованием вакуолей в ядре.

Вопреки ожиданиям ципрофлоксацин не оказывал защитного эффекта. Более того, введение ципрофлоксацина со слюной человека с хроническим тонзиллитом в стадии ремиссии усиливало патологический процесс в виде цитопении, сморщивания клубочков и увеличения площади амилоидных отложений. Поскольку ципрофлоксацин не уменьшал амилоидогенность слюны здорового человека, можно предположить, что ее амилоидная активность не связана с присутствием сапрофитных бактерий в слюне. Тем не менее слюна, взятая от человека с хроническим тонзиллитом в стадии ремиссии, видимо, менее амилоидогенна, чем слюна здорового человека. Настораживающим результатом нашего исследования является обнаружение факта умеренной активации амилоидогенеза в печени ципрофлоксацином, что требует дальнейшего изучения.

Судя по полученным нами данным, программный цветовой анализ позволяет получить более объективное и полноценное представление о тинкториальных свойствах окрашиваемых препаратов. Особенно в том случае, если окрашивающийся объект в тканях распределен диффузно. Следует заметить, что объективные методы количественной оценки тяжести амилоидного поражения при изучении микропрепаратов до настоящего времени не разработаны. Данное обстоятельство, по-видимому, является одной из причин отсутствия интереса исследователей к разработке амилоидных моделей на животных и их апробации при разработке антиамилоидных средств.

Исходя из полученных данных, можно сделать ряд выводов:

- 1) слюна человека при внутрибрюшинном введении вызывает у молодых мышей тяжелый системный амилоидоз с поражением как минимум печени, почек и селезенки, сопровождающийся цитотоксическим действием разной степени выраженности;
- 2) слюна человека с хроническим тонзиллитом в стадии ремиссии более амилоидогенна, чем слюна здорового человека;
- 3) ципрофлоксацин, вводимый в терапевтической дозе совместно со слюной, умеренно увеличивает площадь амилоидного поражения почек, но не селезенки и печени;
- 4) слюна человека может быть использована для моделирования амилоидоза в эксперименте на молодых мышах;
- 5) печень, возможно, содержит ферментативные системы, осуществляющие функцию амилоидоклазии.

Литература

1. Козлов В.А., Сапожников С.П., Карышев П.Б. Модель системного амилоидоза у молодых мышей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016. Т. 162, № 10. С. 523–527. DOI: 10.1007/s10517-017-3652-y.
2. Козлов В.А., Сапожников С.П., Шептухина А.И., Голенков А.В. Сравнительный анализ различных моделей амилоидоза // Вестник Российской академии медицинских наук. 2015. Т. 70. № 1. С. 5–11.
3. Пат. РФ 2373581(51) МПК G09B23/28. Способ моделирования экспериментального амилоидоза у животных / Габуева А.А., Козырев К.М., Брин В.Б. заявители, патентообладатель Северо-Осетинская государственная медицинская академия. Заявка 2008128201/14, Заявл. 10.07.2008; опубл. 20.11.2009. Бюл. № 32. 8 стр.
4. Пат. РФ 2446482(51) МПК G09B23 / 28. Способ моделирования экспериментального амилоидоза у животных / Брин В.Б., Беликова А.Т., Козырев К.М. заявители, патентообладатель Северо-Осетинская государственная медицинская академия. Заявка 2010146365/14, Заявл. 13.11.2010; опубл. 27.03.2012. Бюл. № 9. 9 стр.
5. Frare E., Mossuto M.F., de Laureto P.P., Dumoulin M., Dobson C.M., Fontana A. Identification of the core structure of lysozyme amyloid fibrils by proteolysis. *J. Mol. Biol.*, 2006, vol. 361, no. 3, pp. 551–561. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.06.055.
6. Granel B., Serratrice J., Valleix S., Grateau G., Droz D., Lafon J., Sault M.C., Chaudier B., Disdier P., Laugier R., Delpech M., Weiller P.J. A family with gastrointestinal amyloidosis associated with variant lysozyme. *Gastroenterology*, 2002, vol. 123, no. 4, pp. 1346–1349. DOI: 10.1053/gast.2002.36022.
7. Granel B., Valleix S., Serratrice J., Chérin P., Texeira A., Disdier P., Weiller P.J., Grateau G. Lysozyme amyloidosis: report of 4 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)*, 2006, vol. 85, no. 1, pp. 66–73. DOI: 10.1097/01.md.0000200467.51816.6d.
8. Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P., Fufayeva A.I. Chronic tonsillitis as an inducer of the tonsils amyloidosis. In: Proc. of Int. Conf. «Scientific research of the SCO countries: synergy and integration», 2019, pp. 118–127.
9. Mari E., Ricci C., Pieraccini S., Spinozzi F., Mariani P., Ortore M.G. Trehalose Effect on the Aggregation of Model Proteins into Amyloid Fibrils. *Life (Basel)*, 2020, vol. 10, no. 5, pp. 60. DOI: 10.3390/life10050060.
10. Merlini G., Bellotti V. Lysozyme: a paradigmatic molecule for the investigation of protein structure, function and misfolding. *Clin. Chim. Acta*, 2005, vol. 357, no. 2, pp. 168–172. DOI: 10.1016/j.cccn.2005.03.022.
11. Pepys M.B., Hawkins P.N., Booth D.R., Vigushin D.M., Tennent G.A., Soutar A.K., Totty N., Nguyen O., Blake C.C., Terry C.J., Feast T.G., Zalin A.M., Hsuan J.J. Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature*, 1993, vol. 362(6420), pp. 553–557. DOI: 10.1038/362553a0.
12. Sipe J., Benson M., Buxbaum J., Ikeda S., Merlini G., Saraiva M., Westermark P. Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*, 2012, vol. 19, no. 4, pp. 167–170. DOI: 10.3109/13506129.2012.734345.
13. Swaminathan R., Ravi V.K., Kumar S., Kumar M.V., Chandra N. Lysozyme: a model protein for amyloid research. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, 2011. V. 84. P. 63–111. doi: 10.1016/B978-0-12-386483-3.00003-3.

14. Yazaki M., Farrell S.A., Benson M.D. A novel lysozyme mutation Phe57Ile associated with hereditary renal amyloidosis. *Kidney Int.*, 2003, vol. 63, no. 5, pp. 1652–1657. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00904.x.

15. Zhenyu Li, Hui Xu, Dan Liu, Danyang Li, Gang Liu, Su-Xia Wang. Hereditary renal amyloidosis with a variant lysozyme p.Trp82Arg in a Chinese family: case report and literature review. *BMC Nephrol.*, 2019, vol. 20, no. 1, p. 310. DOI: 10.1186/s12882-019-1496-6.

16. Zhou L., Brouwers N., Benilova I., Vandersteen A., Mercken M., Van Laere K., Van Damme P., Demedts D., Van Leuven F., Sleegers K., Broersen K., Van Broeckhoven C., Vandenbergh R., De Strooper B. Amyloid precursor protein mutation E682K at the alternative β -secretase cleavage β '-site increases A β generation. *EMBO Mol Med.*, 2011, vol. 3, no. 5, pp. 291–302. DOI: 10.1002/emmm.201100138.

КОЗЛОВ ВАДИМ АВЕНИРОВИЧ – доктор биологических наук, кандидат медицинских наук, профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, Чувашский государственный университет имени, Россия, Чебоксары (rooh12@yandex.ru).

АЛЕКСАНДРОВА ВЕРА ЮРЬЕВНА – студентка VI курса медицинского факультета, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (verochka789@mail.ru).

ВАСИЛЬЕВА ЮЛИЯ ВАЛЕРЬЕВНА – студентка VI медицинского факультета, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (yulya-cbx@mail.ru).

САПОЖНИКОВ СЕРГЕЙ ПАВЛОВИЧ – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (adaptagon@mail.ru).

КАРЫШЕВ ПАВЕЛ БОРИСОВИЧ – лаборант кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (pkarmol@mail.ru).

Vadim A. KOZLOV, Vera YU. ALEKSANDROVA, Yulia V. VASILYEVA,
Sergey P. SAPOZHNIKOV, Pavel B. KARYSHEV

SYSTEMIC AMYLOIDOSIS IN YOUNG MICE INDUCED BY HUMAN SALIVA ADMINISTRATION

Key words: mice, experimental amyloidosis, human saliva, Congo red, kidney, spleen, liver, colorimetry, cytological analysis.

The urgency of the study lies in the fact that for the first time it was proved in the experiment that intraperitoneal administration of human saliva to young mice causes the development of systemic amyloidosis, comparable to hereditary systemic amyloidosis in humans, induced by mutagenic changes in saliva lysozyme.

The aim of the research: to test human saliva as an amyloidogen in a model experiment on young mice in comparison with the albumin model of amyloidosis that we developed earlier.

White male mice weighing 20.0–25.0 g were divided into six groups:

Intact mice (5); 30 days 1 time every other day were intraperitoneally administered to groups:

1 (5) soy cream substitute TU 9199-004-58706213-10 15 10 g/100 ml water 0.1 ml/10 g;

2 (3) saliva of a healthy person (SHP) 0.5 ml;

3 (3) SHP and Ciprofloxacin (C) 0.05 mg/10 g of weight;

4 (3) saliva of a person with chronic tonsillitis (remission, SCT);

5 (3) SCT+C.

Kidney weight changed from 176.0±21 mg in intact mice (IM) to 197±43.0, 195.0±18.0, 195.0±18.0, 183.0±44.0, 153.0±25.0 mg, respectively. The number of cells per visual field of the tubular epithelium decreased by 1.3, 1.2, 1.6, 1.4, 1.4 times from the number of cells per visual field in IM 380.0±84.0 ($p = 0.00$), glomerular cells – by 1.4, 1.1, 1.3, 1.2, 1.2 times from the number of glomerular cells in IM 34.0±11.0 ($p = 0.02$), in groups 1-5, respectively. The glomerular area decreased by 2.4, 2.7, 2.3, 2.4, 3.0 times from the average glomerular area in IM (3163.7±832.7 mm², $p = 0.0000$). The relative area of amyloid lesion when stained with Congo red: 18.4±8.2% (group 1), 26.7±10.6, 35.0±11.9, 45.7±13.2, 63.6±14.0% (groups 1-5).

The spleen mass and length increased from 133.0±16.0 mg (IM) by 1.7, 1.7, 1.8, 2.1, 1.7 times and from 17.0±2.0 mm (IM) by 1.2, 1.2, 1.3, 1.4, 1.2 times, the number of cells per visual field decreased from 1318±205 (IM) by 1.7, 2.0, 3.3, 2.1, 2.0 times, groups 1-5, respectively

($p < 0.01$). The relative area of amyloid lesion in Congo red staining: $11.4 \pm 9.4\%$, 28.2 ± 16.0 , 27.9 ± 20.8 , 20.9 ± 12.2 , $16.5 \pm 8.3\%$ (groups 1-5).

The liver mass changed from 1.4 ± 0.15 g (IM) to 1.57 ± 0.26 , 1.45 ± 0.18 , 1.53 ± 0.1 , 1.71 ± 0.3 , 1.36 ± 0.4 g, the number of cells per visual field decreased from 67.0 ± 15.0 (IM) by 1.9, 1.4, 1.8, 2.5, 1.9 times, the area of hepatocyte nuclei – from 54.0 ± 12.3 μm (IM) by 3.1, 3.6, 4.2, 3.1, 3.3 times (groups 1-5, respectively, $p < 0.01$). The relative area of amyloid lesion in Congo red staining: $6.8 \pm 4.6\%$, 15.3 ± 11.0 , 24.5 ± 12.8 , 9.8 ± 8.5 , $12.6 \pm 2.3\%$ (groups 1-5).

Conclusions: 1) human saliva when administered intraperitoneally causes severe systemic amyloidosis in young mice with damage to the liver, kidneys and the spleen, which manifests more by cytotoxic effect than the volume of amyloid deposition; 2) human saliva contains a more active amyloidogen than albumin in combination with fillers of the soy cream substitute formulation; 2) human saliva of a person with chronic tonsillitis in remission is more amyloidogenic than the saliva of a healthy person; 3) Ciprofloxacin, administered in a therapeutic dose during the amyloid model formation, moderately increases the severity of amyloid organ damage; 4) human saliva can be used to simulate amyloidosis in an experiment on young mice; 5) the liver may contain enzymatic systems that perform the function of amyloidoclasia.

References

1. Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P., Karyshev P.B. Model sistemnogo amiloidoza u molodykh myshyey [Model of systemic amyloidosis in young mice]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*, 2016, vol. 162, no. 10, pp. 523–527. doi: 10.1007/s10517-017-3652-y. Russian.
2. Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P., Sheptukhina A.I., Golenkov A.V. Sravnitelnyi analiz razlichnykh modelei amiloidoza [The Comparative Analysis of Various Amyloid Models]. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk*, 2015, vol. 70, no. 1, pp. 5–11.
3. Пат. РФ 2373581(51) МПК G09B23/28. Способ моделирования экспериментального амилоидоза у животных / Габеева А.А., Козырев К.М., Брин В.Б. заявители, патентообладатель Северо-Осетинская государственная медицинская академия. Заявка 2008128201/14, Заявл. 10.07.2008; опубл. 20.11.2009. Бюл. № 32. 8 стр. Gabueva A.A., Kozyrev K.M., Brin V.B. *Sposob modelirovaniya eksperimental'nogo amiloidoza u zhivotnykh* [How to model experimental amyloidosis in animals] Patent RF, no 2373581(51), 2008.
4. Пат. РФ 2446482(51) МПК G09B23 / 28. Способ моделирования экспериментального амилоидоза у животных / Брин В.Б., Беликова А.Т., Козырев К.М. заявители, патентообладатель Северо-Осетинская государственная медицинская академия. Заявка 2010146365/14, Заявл. 13.11.2010; опубл. 27.03.2012. Бюл. № 9. 9 стр. Brin V.B., Belikova A.T., Kozyrev K.M. *Sposob modelirovaniya eksperimental'nogo amiloidoza u zhivotnykh* [How to model experimental amyloidosis in animals] Patent RF, no 2446482(51).
5. Frare E., Mossuto M.F., de Laureto P.P., Dumoulin M., Dobson C.M., Fontana A. Identification of the core structure of lysozyme amyloid fibrils by proteolysis. *J. Mol. Biol.*, 2006, vol. 361, no. 3, pp. 551–561. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.06.055.
6. Granel B., Serratrice J., Valleix S., Grateau G., Droz D., Lafon J., Sault M.C., Chaudier B., Disdier P., Laugier R., Delpech M., Weiller P.J. A family with gastrointestinal amyloidosis associated with variant lysozyme. *Gastroenterology*, 2002, vol. 123, no. 4, pp. 1346–1349. DOI: 10.1053/gast.2002.36022.
7. Granel B., Valleix S., Serratrice J., Chérin P., Texeira A., Disdier P., Weiller P.J., Grateau G. Lysozyme amyloidosis: report of 4 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)*, 2006, vol. 85, no. 1, pp. 66–73. DOI: 10.1097/01.md.0000200467.51816.6d.
8. Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P., Fufayeva A.I. Chronic tonsillitis as an inducer of the tonsils amyloidosis. In: Proc. of Int. Conf. «Scientific research of the SCO countries: synergy and integration», 2019, pp. 118–127.
9. Mari E., Ricci C., Pieraccini S., Spinozzi F., Mariani P., Ortore M.G. Trehalose Effect on the Aggregation of Model Proteins into Amyloid Fibrils. *Life (Basel)*, 2020, vol. 10, no. 5, pp. 60. DOI: 10.3390/life10050060.
10. Merlini G., Bellotti V. Lysozyme: a paradigmatic molecule for the investigation of protein structure, function and misfolding. *Clin. Chim. Acta*, 2005, vol. 357, no. 2, pp. 168–172. DOI: 10.1016/j.cccn.2005.03.022.
11. Pepys M.B., Hawkins P.N., Booth D.R., Vigushin D.M., Tennent G.A., Soutar A.K., Totty N., Nguyen O., Blake C.C., Terry C.J., Feest T.G., Zalin A.M., Hsuan J.J. Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature*, 1993, vol. 362(6420), pp. 553–557. DOI: 10.1038/362553a0.
12. Sipe J., Benson M., Buxbaum J., Ikeda S., Merlini G., Saraiva M., Westermark P. Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*, 2012, vol. 19, no. 4, pp. 167–170. DOI: 10.3109/13506129.2012. 734345.
13. Swaminathan R., Ravi V.K., Kumar S., Kumar M.V., Chandra N. Lysozyme: a model protein for amyloid research. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, 2011. V. 84. P. 63–111. doi: 10.1016/B978-0-12-386483-3.00003-3.

14. Yazaki M., Farrell S.A., Benson M.D. A novel lysozyme mutation Phe57Ile associated with hereditary renal amyloidosis. *Kidney Int.*, 2003, vol. 63, no. 5, pp. 1652–1657. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00904.x.

15. Zhenyu Li, Hui Xu, Dan Liu, Danyang Li, Gang Liu, Su-Xia Wang. Hereditary renal amyloidosis with a variant lysozyme p.Trp82Arg in a Chinese family: case report and literature review. *BMC Nephrol.*, 2019, vol. 20, no. 1, p. 310. DOI: 10.1186/s12882-019-1496-6.

16. Zhou L., Brouwers N., Benilova I., Vandersteen A., Mercken M., Van Laere K., Van Damme P., Demedts D., Van Leuven F., Slegers K., Broersen K., Van Broeckhoven C., Vandenberghe R., De Strooper B. Amyloid precursor protein mutation E682K at the alternative β -secretase cleavage β' -site increases A β generation. *EMBO Mol Med.*, 2011, vol. 3, no. 5, pp. 291–302. DOI: 10.1002/emmm.201100138.

VADIM A. KOZLOV – Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Medical Biology with a Course in Microbiology and Virology, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (pooh12@yandex.ru).

VERA Yu. ALEKSANDROVA – 6th Year Student, Medical Faculty, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (verochka789@mail.ru).

YULIA V. VASILYEVA – medical faculty sixth-year student, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (yulya-cbx@mail.ru).

SERGEY P. SAPOZHNIKOV – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Medical Biology with a Course in Microbiology and Virology, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (adaptogon@mail.ru).

PAVEL B. KARYSHEV – Laboratory Assistant, Department of Medical Biology with the Course of Microbiology and Virology, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (pkarmol@mail.ru).

Формат цитирования: Козлов В.А., Александрова В.Ю., Васильева Ю.В., Сапожников С.П., Карышев П.Б. Системный амилоидоз у молодых мышей, индуцированный введением слюны человека [Электронный ресурс] // Acta medica Eurasica. – 2021. – № 1. – С. 40–56. – URL: <http://acta-medica-eurasica.ru/single/2021/1/5>. DOI: 10.47026/2413-4864-2021-1-40-56.