

### РЕАКЦИЯ ФИБРОБЛАСТОВ, ТУЧНЫХ КЛЕТОК И КОЛЛАГЕНА ПЕЧЕНИ НА ФОРМИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АМИЛОИДОЗА

**Ключевые слова:** амилоидоз, тучные клетки, фибробласты, коллаген, печень, мышцы.

**Целью** исследования была количественная оценка реакции фибробластов, тучных клеток и коллагена печени на формирование экспериментального амилоидоза.

**Материал и методы.** Все мыши содержались на стандартном рационе вивария. Подопытным мышам формировали амилоидоз подкожным введением соевого заменителя сливок. Интактные мыши (ИГ – 3 особи) и группа внутреннего контроля развития амилоидоза (КМ – 3) получали воду в режиме свободного доступа. Мышам второй (ВМ – 3) и третьей групп (ВФМ – 3) воду на фоне формирующегося амилоидоза заменяли на сухое красное виноградное вино «Каберне-Совиньон» (Крым) с содержанием этилового спирта – 10–12°, сахара – 5–10 мг/дм<sup>3</sup>. Кроме того, в вино группы ВФМ добавляли фруктозу 5 г/100 мл вина. Для оценки относительной площади свободных от амилоида коллагеновых волокон депарафинированные срезы печени окрашивали по трехцветной методике В.А. Козлова и др. (2017), для оценки относительной площади амилоидных отложений и подсчета фибробластов (ФБ) – гематоксилином и конго красным, выявления тучных клеток (ТК) и оценки их функциональности – по методу Унна. Функциональное состояние ТК оценивали по индексу дезгрануляции (ИД) и предложенному нами ранее индексу сульфатирования (ИС). Полученные численные данные использовали для расчета новой статистической величины – индекса ТК/ФБ. Данные представлены в виде средних и медианных значений с указанием процентилей 10 и 90. Различия групп определены с помощью z-теста. Различия медианных значений определяли с помощью F-теста.

**Результаты и их обсуждение.** Срезы печени интактных мышей соответствовали гистологической норме. Относительная площадь амилоида в срезах печени группы КМ составила 15,2±2,26%, группы ВМ – 1,9±2,1 и группы ВФМ – 2,5±2,9% ( $p = 0,0000$ ). Относительная площадь свободных от амилоида коллагеновых волокон у ИГ – 0,50±0,18%, КМ – 0,11±0,03 ( $p = 0,0151$ ), ВМ – 0,51±0,16 и ВФМ – 0,69±0,18%. ИД у ИГ – 0,38±0,19, КМ – 0,39±0,2, ВМ – 0,55±0,09, ВФМ – 1,03±0,19 ( $p = 0,0065$  к ИГ). ИС у ИГ – 0,57±0,19, КМ – 0,38±0,2, ВМ – 0,54±0,09, ВФМ – 1,23±0,17 ( $p = 0,0051$  к ИГ). Медианные значения числа ТК в ИГ – 0,8 (0,5÷1,3), КМ – 0,4 (0,3÷0,5), ВМ – 3,0 (2,0÷3,7), ВФМ – 2,0 (1,3÷3,0), к ИГ  $p < 0,05$  во всех случаях. Медианные значения числа ФБ в ИГ – 35,3 (29,9÷39,9), КМ – 40,1 (26,1÷55,4), ВМ – 28,6 (20,3÷33,7), к ИГ  $p < 0,05$  во всех случаях, ВФМ – 51,3 (46,2÷55,4),  $p > 0,5$ . Медианные значения индекса ТК/ФБ в ИГ – 0,022 (0,013÷0,038), КМ – 0,009 (0,007÷0,012),  $p = 0,0000$ , ВМ – 0,11 (0,063÷0,167),  $p = 0,0012$ , ВФМ – 0,037 (0,024÷0,06).

**Выводы.** При формировании экспериментального амилоидоза в печени мышей происходит уменьшение числа ТК с параллельным увеличением числа ФБ в поле зрения. Замещение в рационе мышей воды на сухое красное виноградное вино тормозит развитие изменений, характерных для экспериментального амилоидоза, индуцируемого соевым заменителем сливок. Новая статистическая величина индекс ТК/ФБ отражает как тяжесть амилоидного поражения печени, так и эффективность профилактических мероприятий в виде замещения воды на вино.

**Введение.** Согласно данным литературы, при системном амилоидозе печень вовлекается в патологический процесс в 17–98% случаев [10, 12], тогда как изолированный амилоидоз печени встречается редко [8]. Исходя из локализации амилоида в печени принято выделять четыре гистологических типа

поражения печени: интралобулярный, перипортальный, периваскулярный и диффузный. При первом типе амилоид сдавливает и деформирует печеночные балки, что приводит к их атрофии; отдельные группы гепатоцитов замуровываются амилоидом и разрушаются. При втором и третьем типах печеночные дольки сохранены, амилоид откладывается в сосудах, протоках и стромах портальных трактов [18]. Амилоидные отложения могут обнаруживаться в портальном тракте в виде сосудистых и интерстициальных отложений в обеих долях, что приводит к атрофии гепатоцитов. В редких случаях отмечается глобулярный амилоидоз, при котором в печени обнаруживаются амилоидные отложения в виде овальных и круглых клубочков [18]. При изучении амилоидоза печени особый интерес представляет реакция клеточных популяций органа. Так, А.И. Фуфаева и др. при изучении экспериментального амилоидогенеза в печени у подопытных мышей зафиксировали статистически значимое уменьшение количества гепатоцитов в поле зрения по сравнению с аналогичным показателем у интактных мышей [9].

В наших предыдущих работах мы показали, что при амилоидогенезе в печени мышей происходят изменения как числа, так и функциональности тучных клеток (ТК) [16], а также повышение пролиферативной активности гепатоцитов белых мышей при экспериментальном амилоидозе [2].

За синтез фибриллярных белков амилоида отвечают амилоидобласты, функцию которых выполняют макрофаги [17], фибробласты [13,20], ретикулоэндотелиальные клетки [21]. Коллаген, продуцируемый фибробластами, как и амилоид, является двулучепреломляющим объектом [14]. Амилоид в растворе при нейтральных значениях pH в результате взаимодействия с гепарином образуется быстрее, если в среде присутствуют коллагеновые волокна [19]. Поэтому В.А. Козлов и др. [6] предполагают, что коллаген может быть матрицей для осаждения амилоидных одноосевых нанокристаллов.

Цель настоящего исследования – количественная оценка реакции фибробластов, тучных клеток и коллагена печени на формирование экспериментального амилоидоза.

**Материал и методы.** Материалом исследования была печень 12 белых мышей, разделенных на интактную (ИГ) и три подопытные группы (по три мыши в каждой группе). Мышам подопытных групп при помощи ранее описанного метода моделировали амилоидоз [5]. Первая подопытная группа служила внутренним контролем развития амилоидоза (КМ). Мышам второй (ВМ) и третьей (ВФМ) групп вода была заменена на сухое красное вино «Каберне-Совиньон» (Крым) с содержанием этилового спирта – 10-12°, сахара – 5-10 мг/дм<sup>3</sup>, кроме того, в вино группы ВФМ добавляли фруктозу 5 г/100 мл вина. Животные групп ИГ и КМ имели свободный доступ к воде, а групп ВМ и ВФМ к вину, которым полностью заменяли воду, и пище – все группы. Животных из эксперимента выводили путем декапитации на 30-й день от начала эксперимента. Печень фиксировали в 10% нейтральном формалине с последующей заливкой в парафин по стандартному протоколу. Из полученных парафиновых блоков изготавливали последовательные срезы толщиной 4 мкм, которые монтировали на предметные стекла. Для оценки относительной площади ( $S_{отн.}$ ) свободных от амилоида коллагеновых волокон срезы окрашивали по авторской трехцветной методике [6], для оценки  $S_{отн.}$  амилоидных отложений на срезе – гематоксилином и конго красным, для выявления тучных клеток и оценки их функциональности – полихромным метиленовым синим по методу Унна [1].  $S_{отн.}$  вычисляли по формуле

$$S_{отн.} = \frac{\text{Площадь закрашивания поля зрения целевым красителем}}{\text{Площадь поля зрения}} \times 100\%.$$

Срезы микроскопировали в проходящем светодиодном белом свете на микроскопе «Люам-4». Микрофотографии получали с помощью цифровой камеры Levenhuk C800 NG 8M, USB 2.0 и исследовали морфометрическими методами в приложении LevenhukLite, с помощью которого измеряли  $S_{отн.}$  амилоидного поражения (%) и коллагеновых волокон (%) на срезах. Фибробласты и тучные клетки подсчитывали в паренхиме печени при увеличении в 400 раз в каждом препарате в десяти полях зрения. Дегрануляцию и сульфатирование тучных клеток оценивали при масляной иммерсии. Для оценки функционального состояния тучных клеток использовали предложенный Д.П. Линднером с соавт. [7] индекс дегрануляции (ИД) тучных клеток, позволяющий оценить секреторную активность популяции тучных клеток, и предложенный нами в предыдущих работах индекс сульфатирования (ИС) тучных клеток, позволяющий оценить степень зрелости гепарина тучных клеток [3]. Кроме того, полученные численные данные использовали для расчета новой статистической величины:

$$\text{Индекс ТК/ФБ} = \frac{\text{Число тучных клеток в поле зрения}}{\text{Число фибробластов в поле зрения}}$$

Численный материал обработан методами вариативной и дескриптивной статистики. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – средняя арифметическая,  $m$  – ошибка средней и медианных значений с вычислением 10 и 90 перцентилей. Различия средних значений определены с помощью z-теста. Различия медианных значений определяли с помощью F-теста.

**Результаты исследования и их обсуждение.** В срезах печени интактных мышей амилоидных отложений не обнаружено. Строение органа соответствовало гистологической норме. В печени мышей группы КМ  $S_{отн.}$  амилоидных отложений находилась в пределах значений, полученных нами в предыдущих экспериментах [16] (табл. 1). В группах ВМ и ВМФ, где водный баланс поддерживался заменой воды на красное сухое вино,  $S_{отн.}$  была очень вариабельна и значительно меньше, чем у мышей с амилоидозом, где эта коррекция не проводилась (табл. 1).

Относительная площадь коллагеновых волокон в срезах печени интактных мышей была в 4,6 раза больше, чем в группе КМ (табл. 1). Этот факт можно объяснить тем, что окраска была направлена на выявление только не связанного с амилоидом коллагена, при этом значительная часть коллагена оказалась связанной с амилоидом и поэтому при трехцветном окрашивании связалась с конго (оттенки красного цвета), а не с индиго (оттенки зеленого цвета). В срезах печени мышей групп ВМ и ВФ  $S_{отн.}$  свободного от амилоида коллагена сопоставима с таковой в группе интактных мышей (табл. 1). Наряду с уменьшением  $S_{отн.}$  амилоидных отложений в этих группах полученный результат свидетельствует о защитном эффекте красного сухого виноградного вина, что описано ранее в отношении болезни Альцгеймера [11, 15].

Моделирование амилоидоза у мышей меняло число и функциональное состояние ТК. Индекс дегрануляции ТК в группе КМ сопоставим с этим показателем в группе интактных мышей, но индекс сульфатирования уменьшается в 1,5 раза (табл. 1). Из чего следует, что в условиях формирования экспериментального амилоидоза сульфатирование гепарина ТК тормозится. В группе КМ число ТК уменьшалось в 2 раза, что сопровождалось незначительным увеличением числа фибробластов (табл. 2). Но при вычислении частных от деления числа ТК на число фибробластов в одном и том же поле зрения позволило

получить новую, ранее никем не использовавшуюся статистическую величину – индекс ТК/ФБ, который в группе КМ статистически значимо уменьшался в 2,6 раза по сравнению с аналогом в группе интактных мышей.

Таблица 1

**Морфоцитологическая характеристика срезов печени  
экспериментальных групп животных**

Группа мышей	Интактные	КМ	ВМ	ВМФ
Относительная площадь амилоидного поражения, %	0	15,2±2,26 $p = 0,0000^И$	1,9±2,1 $p = 0,1666^И$ $p = 0,0005^{KM}$	2,5±2,9 $p = 0,1611^И$ $p = 0,0012^{KM}$
Относительная площадь коллагеновых волокон, свободных от амилоида, %	0,50±0,18	0,11±0,03 $p = 0,0151^И$	0,51±0,16 $p = 0,9242^И$ $p = 0,0040^{KM}$	0,69±0,18 $p = 0,2255^И$ $p = 0,0013^{KM}$
Индекс дегрануляции тучных клеток	0,38±0,19	0,39±0,20 $p = 0,9488^И$	0,55±0,09 $p = 0,2179^И$ $p = 0,2602^{KM}$	1,03±0,19 $p = 0,0065^И$ $p = 0,0079^{KM}$
Индекс сульфатирования тучных клеток	0,57±0,19	0,38±0,20 $p = 0,2561^И$	0,54±0,09 $p = 0,8133^И$ $p = 0,0164^{KM}$	1,23±0,17 $p = 0,0051^И$ $p = 0,0002^{KM}$

Примечание. <sup>И</sup> – значения  $p$  по отношению к таковому у интактных животных; <sup>KM</sup> – значения  $p$  по отношению к аналогу у мышей группы контроль модели.

Таблица 2

**Медианные значения количества тучных клеток в печени мышей и индекса ТК/ФБ**

Группа	Тучные клетки	Фибробласты	Индекс ТК/ФБ	Значения $p =$		
				тучные клетки	фибробласты	индекс ТК/ФБ
Интактные	0,8 (0,5÷1,3)	35,3 (29,9÷39,9)	0,022 (0,013÷0,038)	–	–	–
КМ	0,4 (0,3÷0,5)	40,1 (26,1 ÷55,4)	0,009 (0,007÷0,012)	0,06 <sup>И</sup>	0,0000 <sup>И</sup>	0,00002 <sup>И</sup>
ВМ	3,0 (2,0÷3,7)	28,6 (20,3÷33,7)	0,110 (0,063÷0,167)	0,0000 <sup>И</sup> 0,0005 <sup>KM</sup>	0,0000 <sup>И</sup> 0,0005 <sup>KM</sup>	0,0012 <sup>И</sup> 0,0000 <sup>KM</sup>
ВМФ	2,0 (1,3÷3,0)	51,3 (46,2÷55,4)	0,037 (0,024÷0,06)	0,034 <sup>И</sup> 0,0003 <sup>KM</sup> 0,8018 <sup>B</sup>	0,4790 <sup>И</sup> 0,0015 <sup>KM</sup> 0,1971 <sup>B</sup>	0,2979 <sup>И</sup> 0,0000 <sup>KM</sup> 0,0167 <sup>B</sup>

Примечание. В скобках указаны значения 10 и 90 перцентилей; <sup>И</sup> – значения  $p$  по отношению к таковому в группе интактных животных; <sup>KM</sup> – значения  $p$  по отношению к таковому в группе контроль модели; <sup>B</sup> – значения  $p$  по отношению к таковому в группе, получавшей вино без добавления фруктозы.

В группе ВМ наблюдалась тенденция к увеличению дегрануляции ТК в 1,5 раза, что говорит об их нестабильности, а индекс сульфатирования сопоставим с аналогом в группе интактных мышей (табл. 1). Замещение воды в рационе на красное сухое виноградное вино в группе ВМ увеличивало число ТК в 3,8 раза по сравнению с таковым у интактных мышей и 7,5 раз по сравнению с таковым в группе КМ (табл. 2). Число фибробластов уменьшалось более чем 1,2 раза по сравнению с аналогом у мышей интактной группы и в 1,4 раз по сравнению с таковым в группе КМ. Индекс ТК/ФБ в этой группе увеличился в 5 раз!

Употребление красного сухого виноградного вина на фоне формирования экспериментального амилоидоза (группа ВМФ) вызывало статистически значимое увеличение индекса дегрануляции ТК в 2,7 раза (табл. 1). Индекс сульфатирования увеличивался в 2,2 раза по сравнению с таковым в группе интактных

мышей, в 3,2 раза – в группе КМ и в 2,3 раз – в группе ВМ (табл. 1). С одной стороны, это является свидетельством роста нестабильности ТК и их склонности к распаду, с другой – об увеличении эффективности связывания биоаминов вследствие увеличения степени сульфатирования гепарина ТК. Количественные изменения числа ТК и фибробластов по сравнению с аналогичными показателями в группах ВМ и ВМФ более умеренны (табл. 2). Число ТК в поле зрения увеличивалось в 2,5 раза, фибробластов – в 2,5, по сравнению с аналогичными показателями интактных мышей (табл. 2). Индекс ТК/ФБ сопоставим с таковым в группе интактных мышей.

Из полученных данных следует, что при формировании экспериментального амилоидоза в печени мышей происходит уменьшение числа ТК с параллельным увеличением числа фибробластов в поле зрения. Эту реакцию можно расценивать как проявление воспалительного процесса, индуцируемого амилоидогенезом. Как оказалось, замещение в рационе мышей воды на сухое красное виноградное вино хорошо тормозит развитие изменений, характерных для экспериментального амилоидоза, индуцируемого соевым заменителем сливок по В.А. Козлову и др., что было сообщено нами ранее [4]. Применённая нами новая статистическая величина индекс ТК/ФБ хорошо отражает как тяжесть амилоидного поражения печени, так и эффективность профилактических мероприятий в виде замещения воды на вино. Таким образом, этот индекс можно использовать для оценки тяжести воспалительной реакции.

**Выводы.** 1. При формировании экспериментального амилоидоза в печени мышей происходит уменьшение числа ТК с параллельным увеличением числа ФБ в поле зрения.

2. Замещение в рационе мышей воды на сухое красное виноградное вино тормозит развитие изменений, характерных для экспериментального амилоидоза, индуцируемого соевым заменителем сливок.

3. Новая статистическая величина индекс ТК/ФБ отражает как тяжесть амилоидного поражения печени, так и эффективность профилактических мероприятий в виде замещения воды на вино.

#### Литература

1. *Артишевский А.А., Леонтьев А.С., Слука Б.А.* Гистология с техникой гистологических исследований. Минск: Высш. шк., 1999. 236 с.
2. *Ильина Л.Ю., Кириллов А.А., Максимов А.Г.* Морфологические изменения печени белых мышей с экспериментальным амилоидозом // Сб. науч. тр. молодых учен. и спец.: в 2 ч / отв. ред. А.Н. Захарова. Чебоксары, 2019. С. 219–224.
3. *Ильина Л.Ю., Сапожников С.П., Козлов В.А., Дьячкова И.М., Гордова В.С.* Количественная оценка сульфатирования тучных клеток // Acta Medica Eurasica. 2020. № 2. С. 4–53.
4. *Ильина Л.Ю., Козлов В.А., Сапожников С.П.* Мегакариоциты селезёнки при экспериментальном амилоидозе и воздействии красного вина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Т. 172, № 11. С. 639–642.
5. *Козлов В.А., Сапожников С.П., Карышев П.Б.* Модель системного амилоидоза у молодых мышей // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2016. Т. 162, № 10. С. 523–527. DOI: 10.1007/s10517-017-3652-y.
6. *Козлов В.А., Сапожников С.П., Карышев П.Б.* Трехцветная окраска на амилоид // Цитология. 2017. Т. 59, № 9. С. 623–627. DOI: 10.1134/S1990519X18010121.
7. *Линднер Д.П., Поберин И.А., Розкин М.Я., Ефимов В.С.* Морфометрический анализ популяции тучных клеток // Арх. патол. 1980. № 6. С. 60–64.
8. *Прокопчик Н.И.* Характеристика амилоидоза печени и других органов по данным аутопсий // Гепатология и гастроэнтерология. 2017. № 1. С. 80–84.
9. *Фуфаева А.И., Козлов В.А., Сапожников С.П.* Клеточная реакция на алкоголь в условиях формирования модели амилоидоза // Acta Medica Eurasica. 2020. №1. С. 29–36.

10. Шептулина А.Ф., Некрасова Т.П., Ивашкин В.Т. Пациентка 54 лет с кожным зудом и геморагической сыпью // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2015. № 6. С. 110–117.
11. Anekonda T.S. Resveratrol – a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res. Rev.*, 2006, vol. 52, no. 2, pp. 316–326.
12. Baker K.R., Rice L. The amyloidosis: clinical features, diagnosis and treatment. *Methodist DeBakey Cardiovasc. J.*, 2012, vol. 8, no 3, pp. 3–7. DOI: 10.14797/mdcj-8-3-3.
13. Bathon J.M., Martin R.W., Fleischmann R.M., Tesser J.R., Schiff M.H., Keystone E.C., Genovese M.C., Wasko M.C., Moreland L.W., Weaver A.L., Markenson J., Finck B.K. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.*, 2000, vol. 343, no. 22, pp. 1586–1593. Doi: 10.1056/NEJM200011303432201.
14. Bely M., Makovitzky J. Sensitivity and specificity of Congo red staining according to Romhanyi. Comparison with Puchtler's or Bannhold's methods. *Acta Histochem.*, 2006, no 108, pp. 175–180. DOI: 10.1016/j.acthis.2006.03.017.
15. Caruana M., Cauchi R., Vassallo N. Putative Role of Red Wine Polyphenols against Brain Pathology in Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Front Nutr.*, 2016, no. 3, 31 p. DOI: 10.3389/fnut.2016.00031.
16. Ilyina L.Y., Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P. Hepatic Mast Cells in Mice with Experimental Amyloidosis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.*, 2019, vol. 168, no. 1, pp. 14–17. DOI 10.1007/s10517-019-04635-5.
17. Kuroiwa M., Aoki K., Izumiyama N. Histological study of experimental murine AA amyloidosis. *J. Electron. Microsc. [Tokyo]*, 2003, vol. 52, no. 4, pp. 407–413.
18. Makhlof H.R., Goodman Z.D. Globular hepatic amyloid: an early stage in the pathway of amyloid formation: a study of 20 new cases. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2007, vol. 31, no 10, pp. 1615–1621. DOI: 10.1097/PAS.0b013e318054e6b6.
19. Relini A., DeStefano S., Torrassa S., Cavalleri O., Rolandi R., Gliossi A., Giorgetti S., Raimondi S., Marchese L., Verga L., Rossi A., Stoppini M., Bellotti V. Heparin strongly enhances the formation of beta2-microglobulin amyloid fibrils in the presence of type I collagen. *J. Biol. Chem.*, 2008, no. 283, pp. 4912–4920. DOI: 10.1074/jbc.M702712200.
20. Shirahama T., Miura K., Ju S.T., Kisilevsky R., Gruys E., Cohen A.S. Amyloid enhancing factor-loaded macrophages in amyloid fibril formation. *Lab Invest.*, 1990, vol. 62, no. 1, pp. 61–68.
21. Tao Du, Ali-Khan Z. Pathogenesis of secondary amyloidosis in an alveolar hydatid cyst-mouse model: histopathology and immuno/enzyme-histochemical analysis of splenic marginal zone cells during amyloidogenesis. *J. Exp. Path.*, 1990, vol. 71, pp. 313–335.

**ИЛЬИНА ЛИЛИЯ ЮРЬЕВНА** – старший преподаватель кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (lileaseae@rambler.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1257-2220>).

**КОЗЛОВ ВАДИМ АВЕНИРОВИЧ** – доктор биологических наук, кандидат медицинских наук, профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (pooh12@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7488-1240>).

**САПОЖНИКОВ СЕРГЕЙ ПАВЛОВИЧ** – доктор медицинских наук, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (adaptagon@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0967-7192>).

Liliya Y. ILYINA, Vadim A. KOZLOV, **Sergey P. SAPOZHNIKOV**

#### RESPONSE OF FIBROBLASTS, MAST CELLS AND LIVER COLLAGEN ON FORMATION OF EXPERIMENTAL AMYLOIDOSIS

**Keywords:** amyloidosis, mast cells, fibroblasts, collagen, liver, mice.

**The aim** of the study was to quantify the response of fibroblasts, mast cells and liver collagen to formation of experimental amyloidosis.

**Material and methods.** All mice were kept on a standard vivarium diet. Experimental mice underwent formation of amyloidosis by subcutaneous administration of soy cream substitute. Intact mice (IG – 3 specimen) and the internal control group for amyloidosis development (KM – 3 specimen) received water in a free access mode. For mice of the second (VM – 3)

and third groups (VFM – 3), water was replaced with dry red grape wine "Cabernet Sauvignon" (Crimea) with an ethyl alcohol content of 10–12°, sugar – 5–10 mg/dm<sup>3</sup> against the background of amyloidosis. In addition, fructose 5 g/100 ml of wine was added to the wine of VFM group. To assess the relative area of amyloid-free collagen fibers, dewaxed liver sections were stained using the tricolor technique developed by V.A. Kozlov et al. (2017), to assess the relative area of amyloid deposits and to count fibroblasts (FB) – staining with hematoxylin and Congo red, to identify mast cells (TC) and to assess their functionality – Unna's method. The functional state of mast cells was assessed by the degranulation index (ID) and the sulfation index (IC) which we proposed earlier. The obtained numerical data were used to calculate a new statistical value – the TC/FB index. The data are presented in the form of mean values and median values indicating the percentiles 10 and 90. Differences of the groups were determined using z-test. Differences in median values were determined using F-test.

**Results and their discussion.** Liver sections of intact mice corresponded to the histological norm. The relative area of amyloid in the liver sections in CM group was 15.2±2.26%, VM group – 1.9±2.1 and VMF group – 2.5±2.9% (p = 0.0000). The relative area of amyloid-free collagen fibers in IG was 0.50±0.18%, in KM is 0.11±0.03 (p = 0.0151), in VM is 0.51±0.16 and in VMF – 0.69±0.18%. ID in IG – 0.38±0.19, KM – 0.39±0.2, VM – 0.55±0.09, VMF – 1.03±0.19 (p = 0.0065 to IG). IS in IG – 0.57±0.19, KM – 0.38±0.2, VM – 0.54±0.09, VMF – 1.23±0.17 (p = 0.0051 to IG). The median values of TC number in IG were 0.8 (0.5÷1.3), KM – 0.4 (0.3÷0.5), VM – 3.0 (2.0÷3.7), VMF – 2.0 (1.3÷3.0), to IG p < 0.05 in all cases. The median values of the FB number in IG were 35.3 (29.9÷39.9), KM – 40.1 (26.1÷55.4), VM – 28.6 (20.3÷33.7), to IG p < 0.05 in all cases, VMF – 51.3 (46.2÷55.4), p > 0.5. The median values of the TC/FB index in IG were 0.022 (0.013÷0.038), KM – 0.009 (0.007÷0.012), p = 0.0000, VM – 0.11 (0.063÷0.167), p = 0.0012, VMF – 0.037 (0.024÷0.06).

**Conclusions.** When forming experimental amyloidosis in the liver of mice, there is a decrease in the number of TC with a parallel increase in the number of FB per field of vision. Substitution of water in the diet of mice by dry red grape wine inhibits the development of changes characteristic of experimental amyloidosis induced by soy cream substitute. A new statistical value – the TC/FB index reflects both the severity of amyloid liver damage and the effectiveness of preventive measures in the form of substituting water by wine.

## References

1. Artishevskii A.A., Leontyuk A.S., Sluka B.A. *Gistologiya s tekhnikoi gistologicheskikh issledovaniy* [Histology with the technique of histological studies]. Minsk, Vysshaya shkola Publ., 1999, 236 p.
2. Il'ina L.Yu., Kirillov A.A., Maksimov A.G. *Morfologicheskie izmeneniya pecheni belykh myshei s eksperimental'nym amiloidozom* [Morphological changes in the liver of white mice with experimental amyloidosis]. In: *Sbornik nauchnykh trudov molodykh uchenykh i spetsialistov v 2 chastyakh. otv. redaktor A.N. Zakharova* [Collection of scientific works of young scientists and specialists in 2 parts. executive editor A.N. Zakharova]. Cheboksary, 2019, pp. 219–224.
3. Il'ina L.Yu., Sapozhnikov S.P., Kozlov V.A., D'yachkova I.M., Gordova V.S. *Kolichestvennaya otsenka sulfatirovaniya tuchnykh kletok* [Quantification of mast cell sulfation]. *Acta Medica Eurasica*, 2020, no. 2, pp. 4–53.
4. Il'ina L.Yu., Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P. *Megakariotsity selezenki pri eksperimental'nom amiloidoze i vozdeistvii krasnogo vina* [Spleen megakaryocytes in experimental amyloidosis and exposure to red wine]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*, 2021, vol. 172, no. 11, pp. 639–642.
5. Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P., Karyshev P.B. *Model' sistemnogo amiloidoza u molodykh myshei* [Model of systemic amyloidosis in young mice]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*, 2016, vol. 162, no. 10, pp. 523–527. DOI: 10.1007/s10517-017-3652-y.
6. Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P., Karyshev P.B. *Trekhtsvetnaya okraska na amyloid* [Tricolor stain for amyloid]. *Tsitologiya*, 2017, vol. 59, no. 9, pp. 623–627. DOI: 10.1134/S1990519X18010121.
7. Lindner D. P., Poberin I. A., Rozkin M. Ya., Efimov V.S. *Morfometricheskii analiz populyatsii tuchnykh kletok* [Morphometric analysis of mast cell population]. *Arkhiv patologii*, 1980, no 6, pp. 60–64.
8. Prokopchik N.I. *Kharakteristika amiloidoza pecheni i drugikh organov po dannym autopsii* [Characteristics of amyloidosis of the liver and other organs according to autopsy data]. *Gepatologiya i gastroenterologiya*, 2017, no. 1, pp. 80–84.
9. Fufaeva A.I., Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P. *Kletochnaya reaktsiya na alkohol' v usloviyakh formirovaniya modeli amiloidoza* [Cellular reaction to alcohol in the conditions of formation of the model of amyloidosis]. *Acta Medica Eurasica*, 2020, no. 1, pp. 29–36.
10. Sheptulina A.F., Nekrasova T.P., Ivashkin V.T. *Patsientka 54 let s kozhnym zudom i gemorragicheskoi syp'yu* [A 54-year-old patient with pruritus and hemorrhagic rash]. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*, 2015, no. 6, pp. 110–117.

11. Anekonda T.S. Resveratrol – a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res. Rev.*, 2006, vol. 52, no. 2, pp. 316–326.
12. Baker K.R., Rice L. *The amyloidosis: clinical features, diagnosis and treatment. Methodist DeBakey Cardiovasc. J.*, 2012, vol. 8, no. 3, pp. 3–7. DOI: 10.14797/mdcj-8-3-3.
13. Bathon J.M., Martin R.W., Fleischmann R.M., Tesser J.R., Schiff M.H., Keystone E.C., Genovese M.C., Wasko M.C., Moreland L.W., Weaver A.L., Markenson J., Finck B.K. *A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. N. Engl. J. Med.*, 2000, vol. 343, no 22, pp. 1586–1593. DOI: 10.1056/NEJM200011303432201.
14. Bely M., Makovitzky J. *Sensitivity and specificity of Congo red staining according to Romhanyi. Comparison with Puchtler's or Bennhold's methods. Acta Histochem.*, 2006, no. 108, pp. 175–180. DOI: 10.1016/j.acthis.2006.03.017.
15. Caruana M., Cauchi R., Vassallo N. *Putative Role of Red Wine Polyphenols against Brain Pathology in Alzheimer's and Parkinson's Disease. Front Nutr.*, 2016, no. 3, 31 p. DOI: 10.3389/fnut.2016.00031.
16. Ilyina L.Y., Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P. *Hepatic Mast Cells in Mice with Experimental Amyloidosis. Bulletin of Experimental Biology and Medicine.*, 2019, vol. 168, no. 1, pp. 14–17. DOI: 10.1007/s10517-019-04635-5.
17. Kuroiwa M., Aoki K., Izumiyama N. *Histological study of experimental murine AA amyloidosis. J. Electron. Microsc.*, 2003, vol. 52, no. 4, pp. 407–413.
18. Makhlof H.R., Goodman Z.D. *Globular hepatic amyloid: an early stage in the pathway of amyloid formation: a study of 20 new cases. Am. J. Surg. Pathol.*, 2007, vol. 31, no. 10, pp. 1615–1621. DOI: 10.1097/PAS.0b013e318054e6b6.
19. Relini A., DeStefano S., Torrassa S., Cavalleri O., Rolandi R., Gliossi A., Giorgetti S., Raimondi S., Marchese L., Verga L., Rossi A., Stoppini M., Bellotti V. *Heparin strongly enhances the formation of beta2-microglobulin amyloid fibrils in the presens of type I collagen. J. Biol. Chem.*, 2008, no 283, pp. 4912–4920. DOI: 10.1074/jbc.M702712200.
20. Shirahama T., Miura K., Ju S.T., Kisilevsky R., Gruys E., Cohen A.S. *Amyloid enhancing factor-loaded macrophages in amyloid fibril formation. Lab Invest.*, 1990, vol. 62, no. 1, pp. 61–68.
21. Tao Du, Ali-Khan Z. *Pathogenesis of secondary amyloidosis in an alveolar hydatid cyst-mouse model: histopathology and immuno/enzyme-histochemical analysis of splenic marginal zone cells during amyloidogenesis. J. Exp. Path.*, 1990, vol. 71, pp. 313–335.

---

**LILIYA Yu. ILINA – Senior Lecturer, Department of Medical Biology with a course in Microbiology and Virology, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (lileaceae@rambler.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1257-2220>).**

**VADIM A. KOZLOV – Doctor of Biological Sciences, Candidate of Medical Sciences, Professor, Department of Medical Biology with course of Microbiology and Virology, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (pooh12@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7488-1240>).**

**SERGEY P. SAPOZHNIKOV – Doctor of Medical Sciences, Chuvash state University, Cheboksary (adaptagon@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0967-7192>).**

---

**Формат цитирования:** Ильина Л.И., Козлов В.А., Сапожников С.П. Реакция фибробластов, тучных клеток и коллагена печени на формирование экспериментального амилоидоза [Электронный ресурс] // Acta medica Eurasica. – 2022. – № 2. – С. 15–22. – URL: <http://acta-medica-eurasica.ru/single/2022/2/3>. DOI: 10.47026/2413-4864-2022-2-15-22.