

НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АМИЛОИДА В ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА, ОСНОВАННАЯ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ — АНАЛОГА КОНГО КРАСНОГО

DOI: 10.17691/stm2020.12.1.08

УДК 547.458.8:616.127–003.821:579.253

Поступила 20.12.2018 г.

- © **В.В. Гусельникова**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии¹;
О.И. Антимонова, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека отдела молекулярной генетики¹;
Е.А. Федорова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии¹;
М.М. Шавловский, д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной генетики человека отдела молекулярной генетики¹; ведущий научный сотрудник лаборатории кардиомиопатий НИИ сердечно-сосудистых заболеваний²; профессор кафедры медицинской генетики³;
А.Е. Сафрай, к.м.н., зав. судебно-гистологическим отделением⁴; преподаватель кафедры судебной медицины и правоведения²;
А.А. Рукавишникова, эксперт судебно-гистологического отделения⁴; преподаватель кафедры судебной медицины и правоведения²;
В.В. Ильин, к.х.н., научный сотрудник лаборатории синтеза и нанотехнологии лекарственных веществ отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова¹;
Б.Л. Мильман, д.х.н., зав. лабораторией биомедицинской и фармацевтической масс-спектрометрии¹;
Д.Э. Коржевский, д.м.н., профессор РАН, зав. лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы¹; ведущий научный сотрудник лаборатории кардиомиопатий НИИ сердечно-сосудистых заболеваний²

¹Институт экспериментальной медицины, ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376;²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, ул. Льва Толстого, 6-8, Санкт-Петербург, 197022;³Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, ул. Кирочная, 41, Санкт-Петербург, 191015;⁴Бюро судебно-медицинской экспертизы Ленинградской области, ул. Шкапина, 36-38-40, литер «Б», Санкт-Петербург, 198095

Цель исследования — разработка новой технологии выявления амилоида в тканях человека, основанной на использовании флуоресцентного красителя — динатриевой соли 2,7-(1-амино-4-сульфо-2-нафтилазо)флуорена (ДСНАФ).

Материалы и методы. Синтез ДСНАФ осуществляли путем диазотирования 2,7-диаминофлуорена в токе аргона с последующим азосочетанием с нафтионовой кислотой. Идентификацию ДСНАФ проводили при помощи масс-спектрометрии MALDI. Материалом для гистохимического исследования служили образцы миокарда мужчин и женщин (n=11) в возрасте от 85 до 98 лет. Парафиновые срезы миокарда окрашивали 0,1%-м водным раствором Конго красного или водным раствором (0,1%-й или 0,034%-й) ДСНАФ при одинаковых условиях.

Результаты. Впервые показано, что синтезированный на основе флуорена аналог Конго красного может быть успешно использован для выявления амилоидных скоплений на гистологических срезах миокарда человека. По специфичности и интенсивности окрашивания амилоида ДСНАФ сопоставим с Конго красным, который считается «золотым стандартом» выявления амилоида. Интенсивность флуоресценции ДСНАФ при связывании с амилоидными фибриллами существенно выше интенсивности флуоресценции Конго красного (при меньшей интенсивности фоновой флуоресценции мышечной ткани сердца). Это особенно важно для идентификации малых скоплений амилоида в тканях человека, что актуально при исследовании биопсийного материала.

Заключение. Разработанная технология выявления амилоида может служить новым перспективным методом идентификации амилоидных скоплений в тканях человека.

Для контактов: Гусельникова Валерия Владимировна, e-mail: Guselnicova.Valeriia@yandex.ru

Ключевые слова: амилоид; динатриевая соль 2,7-(1-амино-4-сульфо-2-нафтилазо)флуорена; Конго красный; флуоресцентная микроскопия; амилоидоз; миокард человека.

Как цитировать: Guselnikova V.V., Antimonova O.I., Fedorova E.A., Shavlovsky M.M., Safray A.E., Rukavishnikova A.A., Ilyin V.V., Milman B.L., Korzhevskii D.E. A novel method for amyloid detection in human tissue load using a fluorescent dye — Congo red analogue. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(1): 65–71, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.1.08>

English

A Novel Method for Amyloid Detection in Human Tissue Load Using a Fluorescent Dye — Congo Red Analogue

V.V. Guselnikova, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology¹;

O.I. Antimonova, Junior Researcher, Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Molecular Genetics¹;

E.A. Fedorova, PhD, Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology¹;

M.M. Shavlovsky, MD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Molecular Genetics¹; Leading Researcher, Cardiomyopathy Laboratory, Institute of Cardiovascular Disease²; Professor, Department of Medical Genetics³;

A.E. Safray, MD, PhD, Head of the Forensic Histology Department⁴; Lecturer, Department of Forensic Medicine and Law Science²;

A.A. Rukavishnikova, Expert, Forensic Histology Department⁴; Lecturer, Department of Forensic Medicine and Law Science²;

V.V. Ilyin, PhD, Researcher, Laboratory of Synthesis and Nanotechnology of Drugs, S.V. Anichkov Department of Neuropharmacology¹;

B.L. Milman, DSc, Head of the Laboratory of Biomedical and Pharmaceutical Mass-Spectrometry¹;

D.E. Korzhevskii, MD, DSc, Professor of Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System¹; Leading Researcher, Cardiomyopathy Laboratory, Institute of Cardiovascular Disease²

¹Institute of Experimental Medicine, 12 Akademika Pavlova St., Saint Petersburg, 197376, Russia;

²Pavlov University, 6-8 L'va Tolstogo St., Saint Petersburg, 197022, Russia;

³North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, 41 Kirochnaya St., Saint Petersburg, 191015, Russia;

⁴The Leningrad Region Bureau of Forensic Medical Expertise, 36-38-40 "B" Shkapina St., 198095, Saint Petersburg, Russia

The aim of the study was to develop a new technology for the detection of amyloid in human tissues based on the fluorescent dye, disodium salt of 2,7-(1-amino-4-sulfo-2-naphthylazo)fluorene (DSNAF).

Materials and Methods. Synthesis of DSNAF was performed by diazotization of 2,7-diaminofluorene in a stream of argon followed by azo coupling with naphthionic acid. Identification of DSNAF was performed using MALDI mass spectrometry. Human myocardial samples from males and females aged from 85 to 98 years (n=11) were the material for the histochemical study. Myocardial paraffin sections were stained with a 0.1% aqueous solution of Congo red or with an aqueous solution (0.1 or 0.034%) of DSNAF under the same conditions.

Results. It has been demonstrated for the first time that a new fluorene-based analogue of Congo red, DSNAF, can be successfully used to identify amyloid deposits in histological sections of human myocardium. In terms of the specificity and intensity of amyloid staining, DSNAF is comparable to Congo red, which is the gold standard for detecting amyloid deposits. The fluorescence intensity of DSNAF when binding to amyloid fibrils is significantly higher than the intensity of Congo red fluorescence (with a lower intensity of background fluorescence of heart muscle tissue). This is especially useful for identifying small deposits of amyloid in the human tissues which is important when using small biopsies.

Conclusion. The advantages of using DSNAF allow us to consider the developed technology for the detection of amyloid as a new promising method of identifying amyloid deposits in human tissues.

Key words: amyloid; disodium salt of 2,7-(1-amino-4-sulfo-2-naphthylazo)fluorene; Congo red; fluorescence microscopy; amyloidosis; human myocardium.

Введение

Амилоидозы — группа конформационных заболеваний, общий признак которых — отложение в органах и тканях особого вещества, получившего название «амилоид» [1]. Амилоид представляет собой сложное образование. Его главным компонентом являются агрегированные в виде фибрилл белки. В настоящее время известно 36 белков человека, формирующих амилоид и, соответственно, 36 амилоидозов [2]. Некоторые амилоидозы сопровождаются поражением сердца — амилоидной кардиомиопатией [3–6]. В этом случае интерстициальные отложения амилоида могут находиться в миокарде предсердий и желудочков сердца, синусном и атриовентрикулярном узлах, ножках пучка Гиса, средней и наружной оболочках интрамуральных коронарных артерий и вен [7, 8]. Отсутствие строго специфичных симптомов затрудняет диагностику амилоидоза сердца, поэтому в случае подозрений на наличие амилоидной кардиомиопатии по данным неинвазивных методов диагностики рекомендовано проведение эндомикардиальной биопсии с последующим гистохимическим анализом образцов [4, 8]. Широко используемыми гистохимическими методами идентификации амилоида являются окраска Конго красным и тиофлавином Т [9–11]. Однако данные методы имеют ряд недостатков, наличие которых усложняет верификацию амилоидных скоплений в биоптатах и секционном материале [12]. В связи с этим поиск новых красителей для эффективной идентификации амилоида в тканях человека остается актуальной задачей.

Одним из подходов к повышению эффективности детекции амилоида является использование аналогов Конго красного и тиофлавина Т [13]. Нами было показано, что один из аналогов Конго красного, синтезированный на основе флуорена — динатриевая соль 2,7-(1-амино-4-сульфо-2-нафтилазо)флуорена (ДСНАФ), — может успешно применяться для идентификации амилоидных депозитов в тканях лабораторных млекопитающих [14–16]. Открытым остается вопрос о возможности применения данного красителя для идентификации амилоида в тканях человека.

Цель исследования — разработка новой технологии выявления амилоида в тканях человека, основанной на использовании флуоресцентного красителя — 2,7-(1-амино-4-сульфо-2-нафтилазо)флуорена.

Материалы и методы

Синтез и идентификация ДСНАФ. Синтез ДСНАФ осуществляли путем diazotирования 2,7-диаминофлуорена (1 молярный эквивалент) в токе аргона с последующим азосочетанием с нафтионовой кислотой (2 молярных эквивалента). Продукт реакции осаждали в кислой среде хлоридом натрия. Очистку выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенно-фазовой колонке в гра-

диенте ацетонитрила на приборе BioLogic Duo Flow (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Продукт подвергали лиофилизации.

Идентификацию ДСНАФ проводили при помощи масс-спектрометрии MALDI на приборе UltrafleXtreme MALDI TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия) с применением HCCA-матрицы. Спектры получали при воздействии ультрафиолетового лазера с частотой 1000 Гц и мощностью 30–40%, при 1500–2500 лазерных импульсах, в рефлекторном режиме, в диапазоне m/z (отношение массы иона к его заряду) от 400 до 1000 Да. Точность измерения масс ионов в диапазоне m/z 650–750 Да (область протонированных и катионированных молекул) — не хуже 3–5 ppm.

На рис. 1 приведены структурные формулы молекул Конго красного и ДСНАФ.

Гистохимическое исследование. Материалом для гистохимического исследования служили образцы миокарда мужчин и женщин ($n=11$) в возрасте от 85 до 98 лет из архива лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Института экспериментальной медицины и архива судебно-гистологического отделения Бюро судебно-медицинской экспертизы Ленинградской области. Исследование проведено в полном соответствии с этическими нормами (заключение Этического комитета Института экспериментальной медицины). Образцы были фиксированы в 10% забуференном формалине, который применяется как стандарт при проведении патологоанатомического исследования [17], и залиты в парафин по стандартной методике. С парафиновых блоков делали срезы толщиной 5 мкм. Срезы депарафинировали в ксилолах и регидратировали в спиртах нисходящей концентрации, наносили на них раствор гематоксилина Эрлиха и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 мин. После окончания инкубации краситель удаляли со срезов, споласкивали препараты в дистиллированной воде, а затем — в аммиачной воде

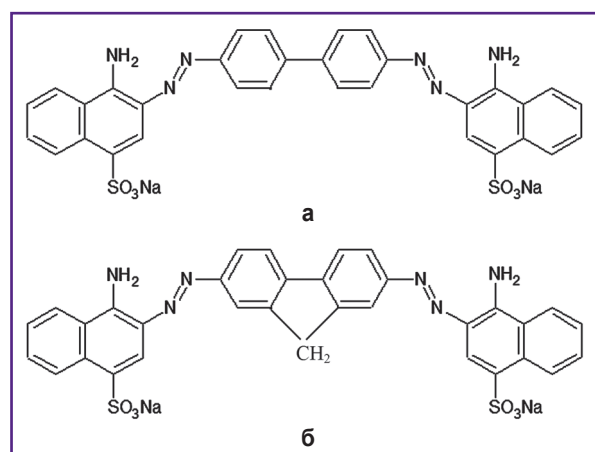


Рис. 1. Структура молекулы Конго красного (а) и 2,7-(1-амино-4-сульфо-2-нафтилазо)флуорена — ДСНАФ (б)

(для «отсинения» гематоксилина), далее промывали в дистиллированной воде в течение 5 мин при постоянном помешивании. Потом на срезы наносили необходимое количество красителя, в качестве которого применяли 0,1% водный раствор Конго красного (Sigma-Aldrich, США) либо водный раствор 0,1% или 0,034% ДСНАФ, помещали препараты во влажные камеры и инкубировали 30 мин при температуре 27°C. Затем краситель удаляли со срезов и промывали препараты в двух сменах дистиллированной воды (по 10 мин каждая). После отмывки в воде срезы заключали в водорастворимую среду Ultramount или Fluorescence Mounting Medium (Dako, Дания).

На способ окраски парафиновых срезов тканей раствором ДСНАФ для визуализации амилоида с применением флуоресцентной микроскопии получен патент [18].

Результаты

Результаты масс-спектрометрического анализа. Структуру молекул подтверждали методом масс-спектрометрии MALDI. В случае Конго красного масс-спектр содержал четыре сигнала, соответствующих различным ионным формам этого соединения (рис. 2, верхний спектр). Точные измерения масс

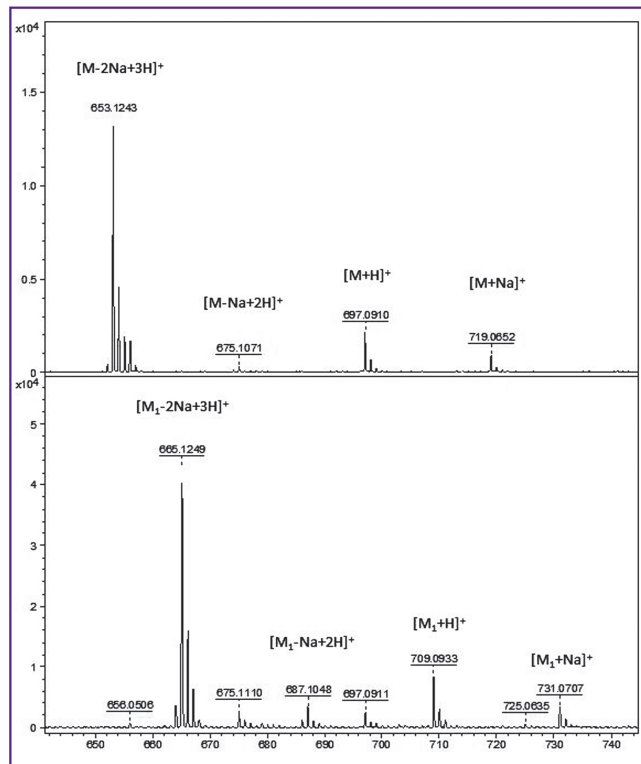


Рис. 2. Масс-спектры (область протонированных и катионированных молекул) Конго красного (верхний спектр) и ДСНАФ (нижний спектр)

По оси абсцисс — отношение массы к заряду ионов (m/z , Да), по оси ординат — интенсивность пиков (усл. ед.). Указан состав основных ионов

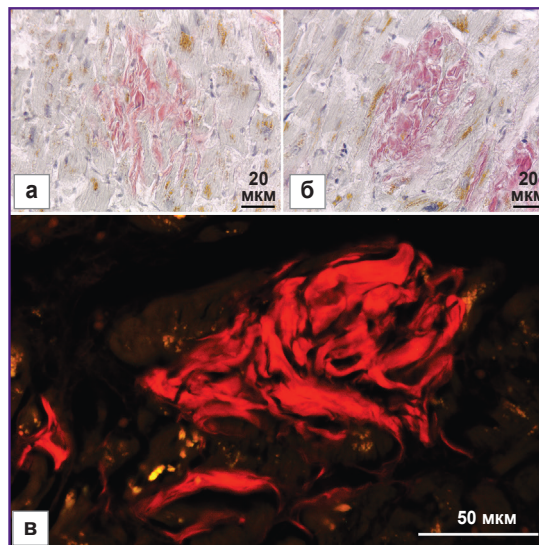


Рис. 3. Скопления амилоида в миокарде человека: а — окраска 0,1% раствором Конго красного; б, в — окраска 0,1% раствором ДСНАФ. Ядра клеток окрашены гематоксилином Эрлиха; а, б — микроскопия в проходящем свете ($\times 10$); в — флуоресцентная микроскопия ($\times 40$). Красный цвет — флуоресценция амилоидных депозитов, окрашенных ДСНАФ; желтый цвет — автофлуоресценция липофусцина в кардиомиоцитах

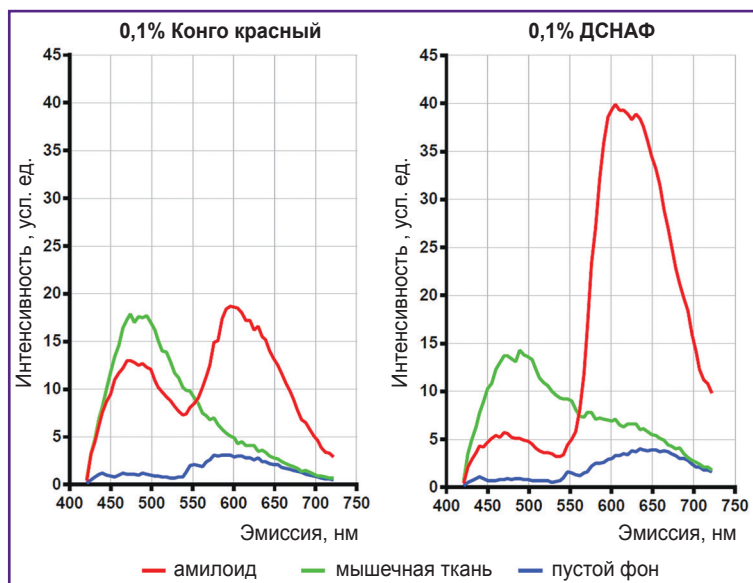
ионов согласуются с молекулярной формулой Конго красного — $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ (M). В случае ДСНАФ в спектре присутствовали четыре аналогичных пика (рис. 2, нижний спектр), массовые числа которых больше на 12 Да. Точные измерения масс ионов подтверждают молекулярную формулу ДСНАФ — $C_{33}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ (M_1), которая содержит на один атом углерода больше по сравнению с молекулой Конго красного. При этом основные сигналы Конго красного не проявляются или малы, что свидетельствует об отсутствии заметной примеси Конго красного в растворе ДСНАФ.

Результаты гистохимического анализа. При анализе в проходящем свете препаратов, окрашенных Конго красным, обнаружено, что у людей с диагностированным амилоидозом сердца скопления амилоида в миокарде присутствуют в интерстиции между мышечными волокнами, в межмышечных прослойках соединительной ткани, а также в стенках кровеносных сосудов. При использовании в качестве красителя Конго красного (0,1% раствор) данные скопления приобретают розовый цвет (рис. 3, а). Мышечная ткань сердца в данном случае окрашена голубовато-серым цветом.

При анализе в проходящем свете препаратов, окрашенных ДСНАФ, показано, что данный краситель позволяет также эффективно идентифицировать амилоид в миокарде человека (рис. 3, б), причем его скопления хорошо идентифицируются уже при малом увеличении микроскопа ($\times 10$). В случае использования ДСНАФ амилоид приобретает более красноватый (малиновый) цвет. Интенсивность окрашивания

Рис. 4. Спектральные характеристики Конго красного и ДСНАФ

Графики отражают интенсивность флуоресценции красителя (Конго красного или ДСНАФ) при связывании с амилоидными фибриллами (*красные линии*), интенсивность фоновой флуоресценции мышечной ткани (*зеленые линии*) и интенсивность флуоресценции фона на участках препарата, не содержащих ткани (флуоресценция среды для заключения, *синие линии*). Графики построены на основании количественных данных интенсивности флуоресценции, полученных с применением конфокального лазерного микроскопа в программном модуле ZEN2011 (Zeiss, Германия) при идентичных настройках микроскопа



амилоида ДСНАФ сопоставима с интенсивностью окрашивания Конго красным. Мышечная ткань сердца, как и в случае использования Конго красного, имеет голубовато-серый цвет (см. рис. 3, б). В ходе сравнительного анализа серийных срезов не обнаружено различий в количестве и распределении амилоидных скоплений в случае применения ДСНАФ и окрашивания Конго красным.

Исследование препаратов методом флуоресцентной микроскопии показало, что ДСНАФ при связывании с амилоидными фибриллами в миокарде человека флуоресцирует в красном диапазоне спектра (рис. 3, в). При этом наблюдается лишь небольшая фоновая флуоресценция мышечной ткани, которая не затрудняет идентификацию амилоидных скоплений даже при малом увеличении микроскопа ($\times 10$). Значительное снижение фоновой флуоресценции мышечной ткани возникает при использовании низких концентраций ДСНАФ (0,034% раствор). Вместе с тем высокий уровень флуоресценции амилоида сохраняется. Это упрощает идентификацию амилоидных скоплений в миокарде при использовании флуоресцентной микроскопии.

Методом конфокальной лазерной микроскопии установлены различия в интенсивности флуоресценции Конго красного и ДСНАФ. Получены количественные значения интенсивности флуоресценции Конго красного и ДСНАФ, связанных с амилоидом (рис. 4, *красные линии*), а также значения фоновой флуоресценции мышечной ткани сердца (рис. 4, *зеленые линии*). Флуоресценция в местах отсутствия ткани (флуоресценция среды для заключения) на препарате была измерена в качестве контроля (рис. 4, *синие линии*).

Показано, что максимум интенсивности флуоресценции амилоидных скоплений, окрашенных ДСНАФ, более чем в два раза выше такового, наблюдаемого при использовании Конго красного (см. рис. 4, *красные линии*). При этом, в отличие от Конго красного, при

применении которого отмечается наличие двух пиков флуоресценции (460 и 600 нм), пик флуоресценции ДСНАФ один и характеризуется присутствием небольшого плато (600–640 нм). Интенсивность фоновой флуоресценции мышечной ткани в случае окрашивания ДСНАФ ниже, чем в случае применения Конго красного (см. рис. 4, *зеленые линии*). Флуоресценция фона в местах отсутствия ткани на препарате характеризуется низкими значениями интенсивности, немного возрастающая в области 550–650 нм при окрашивании Конго красным и в области 550–700 нм — в случае ДСНАФ (см. рис. 4, *синие линии*).

Обсуждение

В настоящее время окраска Конго красным считается «золотым стандартом» идентификации амилоида [2, 19]. В основе диагностики амилоидоза лежит обнаружение в образцах тканей конгофильных отложений, которые визуализируются в виде яблочно-зеленых светящихся структур на темном фоне при наблюдении в поляризованном свете [1, 12]. При этом способность Конго красного флуоресцировать при связывании с амилоидными фибриллами, отмеченная A.S. Cohen и соавт. еще в 1959 г. [20], в практике диагностических исследований не используется. Однако данное свойство Конго красного может применяться для обнаружения малых скоплений амилоида в тканях [12, 20]. Сохранив положительные свойства Конго красного, мы синтезировали его аналог на основе флуорена — ДСНАФ. Данный аналог, в отличие от Конго красного, лишен конформационной подвижности по связи между бензольными кольцами. Уменьшение числа возможных конформационных состояний молекулы ДСНАФ и ее планарная структура позволили существенно повысить флуоресценцию комплексов этого красителя с фибриллами амилоидогенных белков. Так, в предварительных исследованиях *in vitro* [21]

нами показано, что при образовании комплексов этого соединения с фибриллами лизоцима, бета2-микроглобулина и инсулина происходит значительное возрастание интенсивности флуоресценции красителя по сравнению с флуоресценцией в присутствии мономеров указанных белков [21]. На основании структурного сходства ДСНАФ с Конго красным и его способности взаимодействовать с фибриллами амилоидогенных белков было сделано предположение о возможности применения разработанного красителя для идентификации амилоида в тканях человека.

В рамках настоящего исследования впервые показано, что ДСНАФ может быть успешно использован для выявления амилоида в миокарде человека. Полученные результаты свидетельствуют о том, что по интенсивности окрашивания амилоида в случае световой микроскопии ДСНАФ сопоставим с Конго красным. Отсутствие различий в количестве и распределении амилоидных депозитов при анализе серийных срезов свидетельствует о том, что специфичность ДСНАФ аналогична специфичности Конго красного. Отмечены различия в цвете амилоидных фибрилл: при связывании с Конго красным скопления окрашиваются в розовый цвет, в то время как при ДСНАФ они приобретают малиновый оттенок. Вероятно, это обусловлено различиями в спектрах поглощения и эмиссии этих красителей (в случае ДСНАФ максимумы поглощения и эмиссии смещены в длинноволновую область спектра).

Интересно, что, в отличие от амилоидных скоплений, окрашенных Конго красным, которые при наблюдении в поляризованном свете имеют зеленую окраску из-за феномена двойного лучепреломления [22], амилоид, окрашенный ДСНАФ, подобным свойством не обладает. Этот недостаток ДСНАФ отчасти компенсируется его способностью интенсивно флуоресцировать в красном диапазоне спектра. Согласно полученным нами с применением метода конфокальной микроскопии данным, интенсивность флуоресценции ДСНАФ при связывании с амилоидными фибриллами в миокарде человека более чем в 2 раза выше интенсивности флуоресценции Конго красного. Кроме того, при использовании Конго красного наблюдается интенсивное фоновое окрашивание мышечной ткани. В случае ДСНАФ оно выражено в меньшей степени и может быть элиминировано при использовании менее концентрированного (0,034%) раствора красителя.

Отмечено увеличение интенсивности флуоресценции пустого фона (фона в местах отсутствия ткани на препарате) в области пика флуоресценции Конго красного и ДСНАФ. Это может быть следствием частичного перехода красителя из ткани в среду для заключения препаратов, которая, как и сам краситель, имеет водную основу. В таком случае мы наблюдаем флуоресценцию не связавшегося с амилоидными фибриллами красителя. Важно, что данная флуоресценция очень низкая.

Заключение

Синтезированный на основе флуорена новый аналог Конго красного может быть успешно использован для выявления амилоидных скоплений на гистологических срезах миокарда человека. По специфичности и интенсивности окрашивания амилоида ДСНАФ сопоставим с Конго красным. Интенсивность флуоресценции ДСНАФ при связывании с амилоидными фибриллами существенно выше (при меньшей интенсивности фоновой флуоресценции мышечной ткани сердца). Это особенно важно для идентификации малых скоплений амилоида в тканях человека, что актуально при исследовании биопсийного материала. Разработанную нами технологию выявления амилоида, основанную на применении аналога Конго красного, можно рассматривать в качестве нового перспективного метода идентификации амилоидных скоплений в тканях человека.

Финансирование исследования. Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук (МК-560.2020.7).

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

1. Шавловский М.М. Молекулярные и генетические основы этиопатогенеза амилоидозов. *Медицинский академический журнал* 2010; 10(4): 63–81.
2. Schavlovsky M.M. Etiology and pathogenesis of amyloidoses: the molecular and genetic basis. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal* 2010; 10(4): 63–81.
3. Sipe J.D., Benson M.D., Buxbaum J.N., Ikeda S.I., Merlini G., Saraiva M.J., Westermarck P. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid* 2016; 23(4): 209–213, <https://doi.org/10.1080/13506129.2016.1257986>.
4. Hassan W., Al-Sergani H., Mourad W., Tabbaa R. Amyloid heart disease. New frontiers and insights in pathophysiology, diagnosis, and management. *Tex Heart Inst* 2005; 32(2): 178–184.
5. Morais G.C.P., Arruda M.M., Bonadia J.C.A., Pozzan G. Cardiac amyloidosis: a challenging diagnosis. *Autops Case Rep* 2014; 4(4): 9–17, <https://doi.org/10.4322/acr.2014.034>.
6. Жданова Е.А., Рамеев В.В., Моисеев С.В., Козловская Л.В., Сафарова А.Ф. Амилоидоз сердца. *Клиническая фармакология и терапия* 2011; 5: 44–50.
7. Zhdanova E.A., Rameev V.V., Moiseev S.V., Kozlovskaya L.V., Safarova A.F. Cardiac amyloidosis. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya* 2011; 5: 44–50.
8. Ухолкина Г.Б., Кучин Г.А., Бычкова О.П., Чихирев О.А. Амилоидоз сердца в клинической практике. *Журнал сердечная недостаточность* 2016; 17(1): 57–68.
9. Ukholkina G.B., Kuchin G.A., Bychkova O.P., Chikhirev O.A. Cardiac amyloidosis in clinical practice. *Zhurnal serdechnaya nedostatochnost'* 2016; 17(1): 57–68, <https://doi.org/10.18087/rhfj.2016.1.2201>.
10. Овчаренко С.И., Сон Е.А., Окишева Е.А., Се-

дов В.П., Маколкин В.И. Амилоидоз сердца. *Клиницист* 2007; 6: 32–38.

Ovcharenko S.I., Son E.A., Okisheva E.A., Sedov V.P., Makolkin V.I. Cardiac amyloidosis. *Klinitsist* 2007; 6: 32–38.

8. Нонка Т.Г., Репин А.Н. Возможности диагностики и лечения амилоидоза сердца. *Клиническая медицина* 2015; 93(4): 66–73.

Nonka T.G., Repin A.N. Cardiac amyloidosis. Diagnostics and treatment of amyloid cardiomyopathy. Case report. *Klinicheskaa medicina* 2015; 93(4): 66–73.

9. Linke R.P. Congo red staining of amyloid: improvements and practical guide for a more precise diagnosis of amyloid and the different amyloidoses. In: *Protein misfolding, aggregation, and conformational diseases*. Springer US; 2006; p. 239–276, https://doi.org/10.1007/0-387-25919-8_12.

10. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. *Основы гистологической техники*. СПб: СпецЛит; 2010.

Korzhevskii D.E., Gilyarov A.V. *Osnovy gistologicheskoy tekhniki* [Basics of histological techniques]. Saint Petersburg: SpetsLit; 2010.

11. Picken M.M. Amyloidosis — where are we now and where are we heading? *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134(4): 545–551.

12. Clement C.G., Truong L.D. An evaluation of Congo red fluorescence for the diagnosis of amyloidosis. *Hum Pathol* 2014; 45(8): 1766–1772, <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.04.016>.

13. Sapozhnikov S.P., Karyshev P.B., Sheptukhina A.I., Nikolayeva O.V., Avruyskaya A.A., Mitrasov Y.N., Kozlov V.A. Novel fluorescent probes for amyloid detection. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(2): 91–98, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.2.11>.

14. Gusel'nikova V.V., Gudkova A.Ya., Semernin E.N., Grudinina N.A., Krutikov A.N., Shavloskii M.M., Mil'man B.L., Korzhevskii D.E., Mikhailova E.V., Kaminskaya E.V., Mikhailov V.M. Characterization of amyloid deposits found in internal organs of MDX mice. *Cell Tiss Biol* 2017; 11(1): 27–34, <https://doi.org/10.1134/s1990519x17010047>.

15. Gusel'nikova V., Antimonova O., Fedorova E., Shavlovsky M., Krutikov A., Mikhailova E., Gudkova A., Mikhailov V., Korzhevskii D. Fluorescent characterization of amyloid deposits in the kidneys of mdx mice. *Eur J Histochem* 2018; 62(2): 2870, <https://doi.org/10.4081/ejh.2018.2870>.

16. Gusel'nikova V.V., Antimonova O.I., Fedorova E.A., Shavlovskii M.M., Krutikov A.N., Mikhailova E.V.,

Kaminskaya E.V., Gudkova A.Ya., Korzhevskii D.E., Mikhailov V.M. Fluorene derivative disodium salt as a new fluorescent dye for identification of amyloid deposits in the myocardium of mdx mice. *Cell Tiss Biol* 2018; 12(3): 213–216, <https://doi.org/10.1134/s1990519x18030057>.

17. Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(2): 156–165, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.19>.

18. Антимоннова О.И., Коржевский Д.Э., Шавловский М.М. *Способ флуоресцентной идентификации амилоида*. Патент РФ 2673815. 2018.

Antimonova O.I., Korzhevskii D.E., Shavlovsky M.M. *Method of fluorescent identification of amyloid*. Patent RU 2673815. 2018.

19. Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г. Гистохимические методы окрашивания гистологических препаратов. В кн.: *Морфологическая диагностика: подготовка материала для морфологического исследования и электронной микроскопии*. Под ред. Коржевского Д.Э. СПб; 2013; с. 85–97.

Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G. Gistokhimicheskie metody okrashivaniya gistologicheskikh preparatov. V kn.: *Morfologicheskaya diagnostika: podgotovka materiala dlya morfologicheskogo issledovaniya i elektronnoy mikroskopii* [Histochemical staining methods for histological preparations. In: Morphological diagnostics: preparing material for morphological research and electron microscopy]. Pod red. Korzhevskogo D.E. [Korzhevskii D.E. (editor)]. Saint Petersburg; 2013; p. 85–97.

20. Cohen A.S., Calkins E., Levene C.I. Studies on experimental amyloidosis. I. Analysis of histology and staining reactions of casein-induced amyloidosis in the rabbit. *Am J Pathol* 1959; 35: 971–989.

21. Antimonova O.I., Grudinina N.A., Egorova V.V., Ilyina V.V., Zabrodskaya Y.A., Ramsay E.S., Shabalin K.A., Protasov A.V., Yakimov A.P., Polukeev V.A., Shavlovsky M.M. Time machine: can a dye from 1928 be re-purposed for modern, fluorescence-based detection of amyloid-like fibrils? *Dyes and Pigments* 2020; 172: 107863, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107863>.

22. Dapson R.W. Amyloid from a histochemical perspective. A review of the structure, properties and types of amyloid, and a proposed staining mechanism for Congo red staining. *Biotech Histochem* 2018; 93(8): 543–556, <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1528385>.