

14. Emes Y., Bilici I. S., Aybar B., Sancakli E., Issever H., Yalcin S. Evaluation of occlusion types, pain severity, and onset of complaints in 127 patients with temporomandibular disorders: A retrospective study. *Cranio*. 2020;38(3):168-173. <https://doi.org/10.1080/08869634.2018.1509824>
15. Гуров В. А. Хронобиология. Возрастная периодизация. *Universum: химия и биология*. 2018;4(46):7-12. [Gurov V. A. Chronobiology. Age periodization. *Universum: ximiya i biologiya*. – *Universum: chemistry and biology*. 2018;4(46):7-12. (In Russ.)].

Поступила 17.06.2024

Сведения об авторах:

Григоренко Марк Павлович, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры ортопедической стоматологии; тел.: +79624541018; e-mail: mark115@yandex.ru; <https://orcid.org/0009-0005-2073-6562>

Вакушина Елена Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры; тел.: +79624036031; e-mail: mark115@yandex.ru; <https://orcid.org/0009-0006-3118-6559>

Брагин Евгений Александрович, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры; тел.: +79280095097; e-mail: professor_bragin@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0271-1503>

Лежнина Оксана Юрьевна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры анатомии им. В. Ю. Первушина; тел.: 8652353229; e-mail: okliz26@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0348-0447>

Лапина Наталья Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой ортопедической стоматологии; тел.: +79180303003; e-mail: kgma74@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1835-8898>

Григоренко Павел Анатольевич, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры организации стоматологической помощи, менеджмента и профилактики стоматологических заболеваний; тел.: +79624034533; e-mail: mark115@yandex.ru; <https://orcid.org/0009-0006-3430-6341>

Лежнина Елизавета Константиновна, соискатель кафедры анатомии им. В. Ю. Первушина; тел.: 8652353229; e-mail: okliz26@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0000-1582-7869>

Арзуманян Лолита Витальевна, ассистент кафедры стоматологии детского возраста; тел.: +79064666222; e-mail: geox225553@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0006-0259-326X>

© Э. Т. Аблякимов, М. А. Кривенцов, 2024
УДК 616-002.182:57.023
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2024.19070>
ISSN – 2073-8137

Экспериментальная модель супероксиддисмутаза А-индуцированного саркоидоз-подобного иммунного воспаления

Э. Т. Аблякимов, М. А. Кривенцов

Медицинский институт им. С. И. Георгиевского Крымского федерального
университета им. В. И. Вернадского, Симферополь, Российская Федерация

An experimental model of superoxide dismutase A-induced sarcoidosis-like immune inflammation

Ablyakimov E. T., Kriventsov M. A.

S. I. Georgievsky Medical Institute of V. I. Vernadsky Crimean Federal University,
Simferopol, Russian Federation

Изучено влияние искусственно синтезированной супероксиддисмутаза А на морфогенез иммунного гранулематозного воспаления у крыс с оценкой распределения субпопуляций антиген-представляющих и лимфоидных клеток в гранулематозном инфильтрате и определением иммуногистохимической экспрессии некоторых «таргетных» генов/сигнальных путей (PD-L1, PPAR-γ, NF-κB). Проведен описательный гистологический и иммуногистохимический анализ с применением маркеров CD1a, CD3, CD68 (SCARD1), CD80, CD83, CD163, TBX21, GATA3, Foxp3, IL-17, PPAR-γ, NF-κB и PD-L1 в образцах ткани. Во всех случаях выявлены характерные морфологические признаки саркоидоз-подобного гранулематозного воспаления с преобладанием Т-клеточного звена, сдвигом в сторону Т-хелперов 1 типа на фоне незначительного количества регуляторных Т-клеток. В составе гранулематозного инфильтрата определяется значительная доля клеток моноцитарно-макрофагального ряда (преимущественно, за счёт M2 субпопуляции макрофагов). Выявлены особенности экспрессии PD-L1 на фоне иммунного воспаления.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, иммунная гранулема, саркоидоз, крыса, гранулематозное воспаление, PD-L1

The effect of artificially synthesized superoxide dismutase A on the morphogenesis of immune granulomatous inflammation in rats was studied with an assessment of the distribution of subpopulations of antigen-presenting and lymphoid cells in granulomatous infiltrate and determination of immunohistochemical expression of some «targeted» genes/signaling pathways (PD-L1, PPAR- γ , NF- κ B). Descriptive histological and immunohistochemical analysis was performed using CD1a, CD3, CD68 (SCARD1), CD80, CD83, CD163, TBX21, GATA3, Foxp3, IL-17, PD-L1, PPAR- γ and NF- κ B markers in the obtained rat tissue samples. In all cases, characteristic morphological signs of sarcoidosis-like granulomatous inflammation with a predominance of the T-cell link, a shift towards type 1 T helper cells against the background of an insignificant number of regulatory T cells were revealed. A significant proportion of monocyte-macrophage cells is determined in the granulomatous infiltrate (mainly due to the M2 subpopulation of macrophages). Features of PD-L1 expression against the background of immune inflammation have been revealed.

Keywords: superoxide dismutase, immune granuloma, sarcoidosis, rat model, granulomatous inflammation, PD-L1

Для цитирования: Аблякимов Э. Т., Кривенцов М. А. Экспериментальная модель супероксиддисмутазы А-индуцированного саркоидоз-подобного иммунного воспаления. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2024;19(4):316-324. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2024.19070>

For citation: Abylakimov E. T., Kriventsov M. A. An experimental model of superoxide dismutase A-induced sarcoidosis-like immune inflammation. *Medical News of North Caucasus*. 2024;19(4):316-324. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2024.19070> (In Russ.)

АГЗ – аутоиммунные гранулематозные заболевания
ДК – дендритные клетки
ИГХ – иммуногистохимический анализ
ПА – поликлональные антитела
CD – cluster of differentiation (кластер дифференциации)
Foxp3 – forkhead box P3 (скурфин – белок, участвующий в реакциях иммунной системы)
GATA3 – GATA binding protein 3 (GATA3-связывающий белок)
NF- κ B – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (ядерный фактор κ B, универсальный фактор транскрипции В клеток)

PD-L1 – programmed death ligand-1 (лиганд запрограммированной гибели)
PPAR- γ – peroxisome proliferator-activated receptor gamma (рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом гамма)
Sod A – superoxide dismutase A (супероксиддисмутазы А)
TBX21 – t-box transcription factor 21 (фактор транскрипции T-box21)

Аутоиммунные гранулематозные заболевания (АГЗ) представляют собой обширную группу патологических состояний, этиология которых остается неизвестной, а патогенез до конца не изученным. Все АГЗ (саркоидоз, гранулематоз Вегенера, болезнь Крона, первичный билиарный холангит и др.) гистологически характеризуются образованием гранул и неспецифичностью симптомов в начале заболевания, что затрудняет постановку диагноза на раннем этапе [1–4]. Лечение большинства АГЗ является неспецифичным и включает высокие дозы глюкокортикостероидов и/или цитостатиков, что обусловлено недостаточным пониманием патогенеза, взаимодействия основных субпопуляций иммунокомпетентных клеток в очаге. Все это повышает актуальность экспериментального изучения гранулематозного воспалительного процесса (в том числе саркоидоз-подобного).

В основу изучения АГЗ был взят саркоидоз, так как многие гранулематозные заболевания могут имитировать саркоидоз гистологически и клинически [5], что делает его морфологическим «эталоном» для изучения гранул [6, 7]. Несмотря на то что этиология и патогенез саркоидоза остаются недостаточно изученными, системный обзор литературы и мета-анализ выявили потенциальную роль бактерий рода *Mycobacterium*, продуцирующих супероксиддисмутазу А (sod A), в качестве начального звена патогенеза [8].

Интересно, что саркоидоз-специфичный металлофермент sod A, использованный в эксперименте с мышами, показал гистологический и иммунофенотипический профили саркоидоза, которые хорошо коррелировали с профилями при саркоидозе у человека [9]. На основании этого данная патофизиологическая модель является отличной основой для исследования

патоморфоза иммунных гранул, в том числе саркоидоза.

Цель исследования – изучить влияние искусственно синтезированной sod A на морфогенез неспецифического иммунного гранулематозного воспаления у крыс с оценкой распределения субпопуляций антиген-представляющих и лимфоидных клеток в гранулематозном инфильтрате и определением экспрессии некоторых «таргетных» генов / сигнальных путей (PD-L1, PPAR- γ , NF- κ B).

Материал и методы. Микробная sod A с последовательностью AAALAGAFGSFDKFR была синтезирована в компании AtaGenix Laboratories (Ухань, КНР) в 2023 году. Каждый микробный пептид sod A имеет чистоту более 80 %. Идентичность подтверждена методом масс-спектрометрии, а чистота оценена по данным жидкостной хроматографии высокого давления.

Исследование проведено на 18 крысах-самцах (массой 180–200 г) линии Wistar. В соответствии с поставленной целью изучалось влияние sod A на развитие и патоморфоз иммунного воспаления. В первый день эксперимента все крысы были парентерально (внутримышечно, в область правой наружной поверхности бедра нижней конечности) сенсибилизированы искусственно синтезированной sod A (пептид AAALAGAFGSFDKFR) – из расчета 50 мкг sod A, растворенной в 0,25 мл полного адьюванта Фрейнда. На 10-й день эксперимента всем животным вводили разрешающую дозу sod A из расчета 50 мкг в 0,25 мл физиологического раствора на каждого. Животных выводили из эксперимента на 25-е сутки после сенсибилизации путем декапитации на фоне парентеральной седации (0,1 % раствор медетомидина гидрохлорида объемом 0,2 мл внутрибрюшинно). Контрольные группы крыс включали животных несенсибилизированных и сенсибилизированных только полным адьювантом Фрейнда.

После декапитации выделяли плотный патологический инфильтрат, который фиксировали в 10 % нейтральной забуференном формалине с последующей гистологической проводкой по стандартной методике с использованием гибридного гистологического процессора Logos (Milestone Medical, Италия) и модуля Leica EG1150 (Leica Biosystems, Германия). Из залитых в парафин блоков с образцами готовили гистологические срезы толщиной 4–5 мкм с использованием автоматического ротационного микротом Leica RM2255 (Leica Biosystems, Германия). Стандартную гистологическую окраску гематоксилином и эозином (H&E) использовали для проведения описательного анализа морфологических преобразований с последующей морфологической оценкой иммунного воспаления с помощью гистоморфометрического комплекса на базе микроскопа Olympus CX-33.

Для проведения иммуногистохимического анализа использовали гистологические срезы (~4 мкм) из блоков, залитых в парафин. Окрашивание проводили с использованием полуавтоматического иммуногистостейнера BondMax (Leica Biosystems, Германия). Протокол окрашивания проводился в соответствии со стандартными методами и включал депарафинизацию, термическую демаскировку антигенов с использованием раствора Bond Epitope Retrieval 2 (Leica Biosystems, Германия) при pH=9 в течение 20 минут при температуре 96 °C, блокирование активности пероксидазы, инкубацию с антителом в течение 15 минут при комнатной температуре и визуализацию с использованием системы детектирования Bond Polymer Refine (Leica Biosystems, Германия). Для лучшей визуализации ядер проводили докрасивание гистологических препаратов гематоксилином. Для идентификации различных клеточных субпопуляций иммунной гранулемы использовали следующие первичные антитела – поликлональные антитела (ПА): против CD1a IgG (кат. #DF13391; Affinity Biosciences ®); против CD3 IgG (кат. #DF6594; Affinity Biosciences ®); против CD68 (SCARD1) IgG (кат. #DF7518; Affinity Biosciences ®); против CD80 IgG (кат. #AF5233; Affinity Biosciences ®); против CD83 IgG (кат. #DF6774; Affinity Biosciences ®); против CD163 IgG (кат. #PAB726Ra01; Cloud-Clone ®); ПА IgG против TBX21 (T-bet) (кат. #PAP605Ra01; Cloud-Clone ®); против GATA3 IgG (кат. #AF6233; Affinity Biosciences ®); против Foxp3 IgG (кат. #AF6544; Affinity Biosciences ®); против IL-17 IgG (кат. #DF6127; Cloud-Clone ®); против PPARγ IgG (кат. #AF6284; Cloud-Clone ®); против NF-κB IgG (кат. #AF6217; Cloud-Clone ®); против PD-L1 IgG (кат. DF6526; Cloud-Clone ®).

Все гистологические срезы сканировали с помощью гистосканера Aperio CS2 (Leica Biosystems, Германия) с последующим анализом цифровых изображений с использованием программного обеспечения Aperio ImageScope и ImageJ.14. Интенсивность иммунопозитивного окрашивания (для ядерной, цитоплазматической или мембранной иммуногистохимической экспрессии маркера, если таковая имела) оценивали с использованием диаминобензидиновой метки по интенсивности коричневатого окрашивания (минимальная реакция или ее отсутствие, слабоположительная, умеренно положительная или сильно положительная). Образцы небных миндалин человека использовали в качестве положительного контроля, тогда как образцы, обработанные с отсутствием первичных антител, использовали в качестве отрицательного контроля.

Результаты и обсуждение. Опыты показали, что введение sod A в суммарной дозе 0,1 мг вызывает нарушения в иммунной системе у экспериментальных животных через 3 недели по типу аутоиммунного продуктивного воспаления. Через 24 дня достоверно определялось диффузное гранулематозное воспаление, а также периферическая лимфаденопатия в виде увеличения паховых лимфатических узлов.

При микроскопии экспериментальных образцов были обнаружены саркоидоз-подобные изменения в области сенсibilизации sod A, сопровождающиеся увеличением количества различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток с образованием гигантских клеток в составе неказеозного гранулематозного воспаления. У крыс контрольных групп (не сенсibilизированных супероксиддисмутазой A или сенсibilизированных только полным адъювантом Фрейнда) признаки саркоидоз-подобного воспаления отсутствовали.

При гистологическом исследовании препаратов, содержащих фрагменты фиброзно-жировой и поперечнополосатой мышечной ткани, окрашенных гематоксилином и эозином, у экспериментальных животных определялся диффузный гранулематозный воспалительный инфильтрат, состоящий из множественных кистозных поражений, не имеющих эпителиальной выстилки (псевдокисты) (рис. 1А). Строма и стенки псевдокист были обильно инфильтрированы макрофагами и лимфоцитами, единичными гигантскими клетками по типу Пирогова – Лангханса и гранулярными лейкоцитами в виде нейтрофилов и эозинофилов. В тканях также определялся слабовыраженный фиброз и интерстициальный отек (рис. 1В).

Основная часть гранулематозного инфильтрата была представлена типичными иммунными гранулемами без центральной вакуоли и казеозного некроза на разных стадиях развития (рис. 1С). Центральная часть гранулемы была представлена макрофагами и эпителиоидными клетками со слабо-эозинофильной цитоплазмой и центрально расположенными ядрами (овоидной или удлинённой формы). Перифокально определялись лимфоциты, моноциты, единичные эозинофилы и фибробласты (рис. 1D).

Кроме классических иммунных гранул, в воспалительном инфильтрате определялись структуры по типу кольцевидной гранулемы с центральной липидной вакуолью, которая была окружена макрофагальным валом с примесью эпителиоидных и гигантских клеток, а также перифокальной лимфоцитарной инфильтрацией (рис. 1Е).

В эндомиозии, между пучками поперечнополосатой мышечной ткани отмечалась диффузная инфильтрация, клеточный компонент которой представлен воспалительными клетками: лимфоцитами, гистиоцитами, гигантскими клетками и единичными плазматическими. Гигантские клетки имеют широкую эозинофильную цитоплазму и множество овальных хаотично расположенных ядер по периферии клетки (рис. 1F).

Во всех исследуемых образцах, вне зависимости от характера и выраженности воспалительной реакции в интерстициальной ткани, клеточная популяция была представлена преимущественно CD3+ лимфоцитами с выраженной мембранной и цитоплазматической иммунопозитивной реакцией, образующими обильные очаговые или диффузные скопления. Во всех случаях CD3+ клеточной инфильтрации отмечалась активная миграция CD3+ лимфоцитов на периферию иммунной гранулемы со скудной инфильтрацией CD3+ клеток отдаленных межгранулемных участков (рис. 2А).

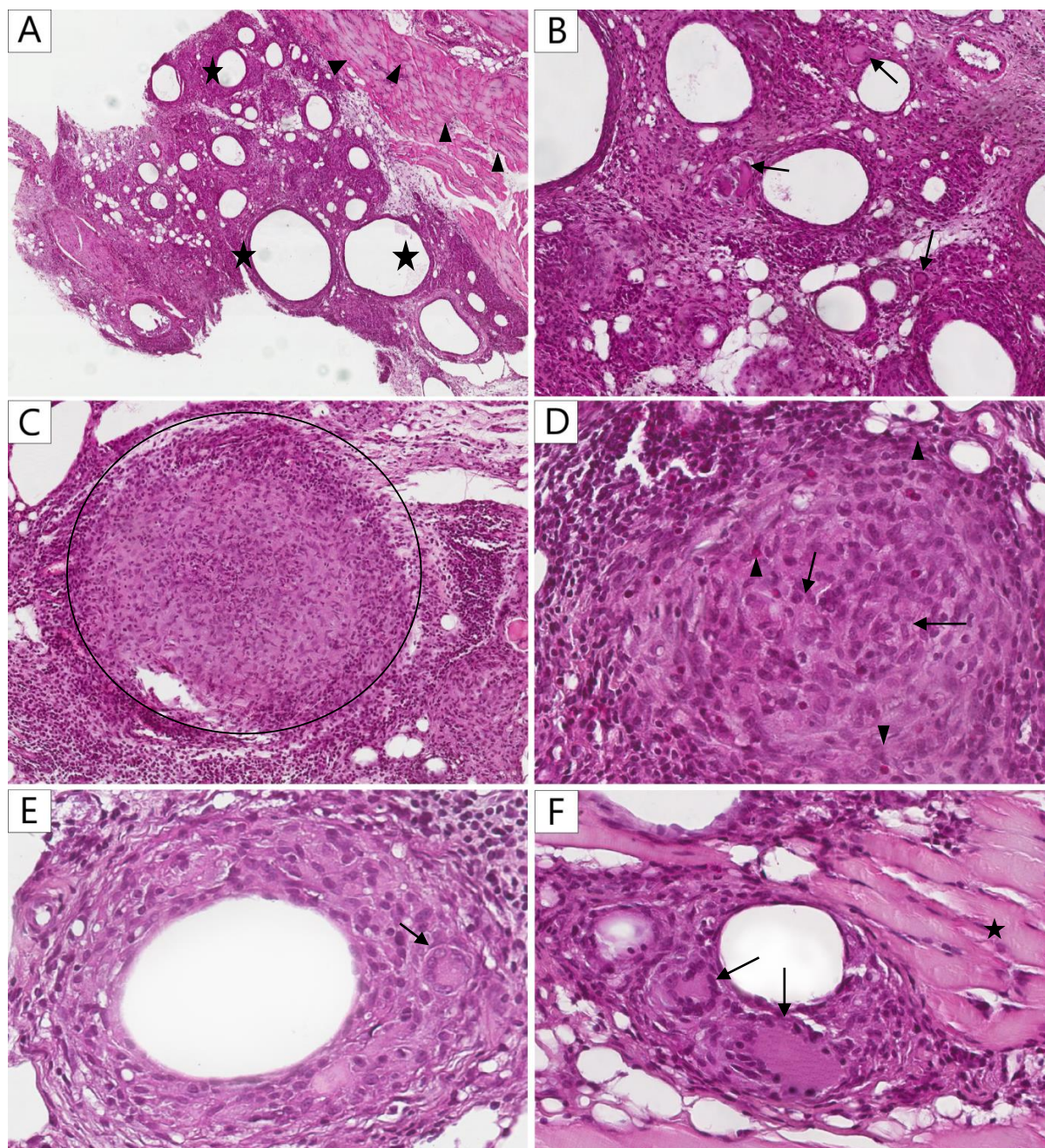


Рис. 1. Результаты гистологического исследования:

А – псевдокистозные поражения (звездочка) на фоне диффузного гранулематозного инфильтрата, с фрагментами мышечной ткани (указатель), ув. x80. В – гранулематозный инфильтрат с единичными гигантскими клетками (стрелка), ув. x200. С – гранулема без казеозного некроза и гигантских клеток, окруженная лимфоцитарным валом, ув. x200. D – центрально расположенные эпителиоидные клетки (стрелка) с единичными эозинофилами (указатель), ув. x600. E – воспаление по типу кольцевидной гранулемы с центральным липидным ядром, окруженной воспалительным валом, гигантская клетка (стрелка), ув. x600. F – гигантские многоядерные клетки (стрелки) между пучками миоцитов (звездочка), ув. x600

Иммуногистохимический анализ распределения Т-клеточных субпопуляций в воспалительном гранулематозном инфильтрате выявил существенное преобладание Th-1 лимфоцитов (TBX21+) и Th-17 клеток (IL-17+) со значительно меньшей долей или практически отсутствием Th-2 лимфоцитов (GATA3+) и регуляторных Т-лимфоцитов (Foxp3+). В частности, во всех проанализированных образцах основная часть гранулематозного инфильтрата была представлена Th-1 клетками, характеризующимися выраженной ядерной экспрессией TBX21+, образующими плотные клеточные конгломераты в основном на периферии

иммунной гранулемы, располагающимися в ассоциации с другими клетками лимфоидного ряда, а также диффузные одиночные скопления преимущественно в межгранулемных областях (рис. 2B). Аналогичная реакция была со стороны Th-17 лимфоцитов, однако наибольшая концентрация клеток была выявлена в составе стенок кольцевидной гранулемы (рис. 2C). В отличие от Th-1 лимфоцитов, иммуногистохимическая реакция с GATA3+ лимфоцитами характеризовалась отсутствием ядерной реакции (рис. 2D), наличием лишь единичных иммунопозитивных GATA3+ клеток в отдельных полях зрения. Аналогичная нукле-

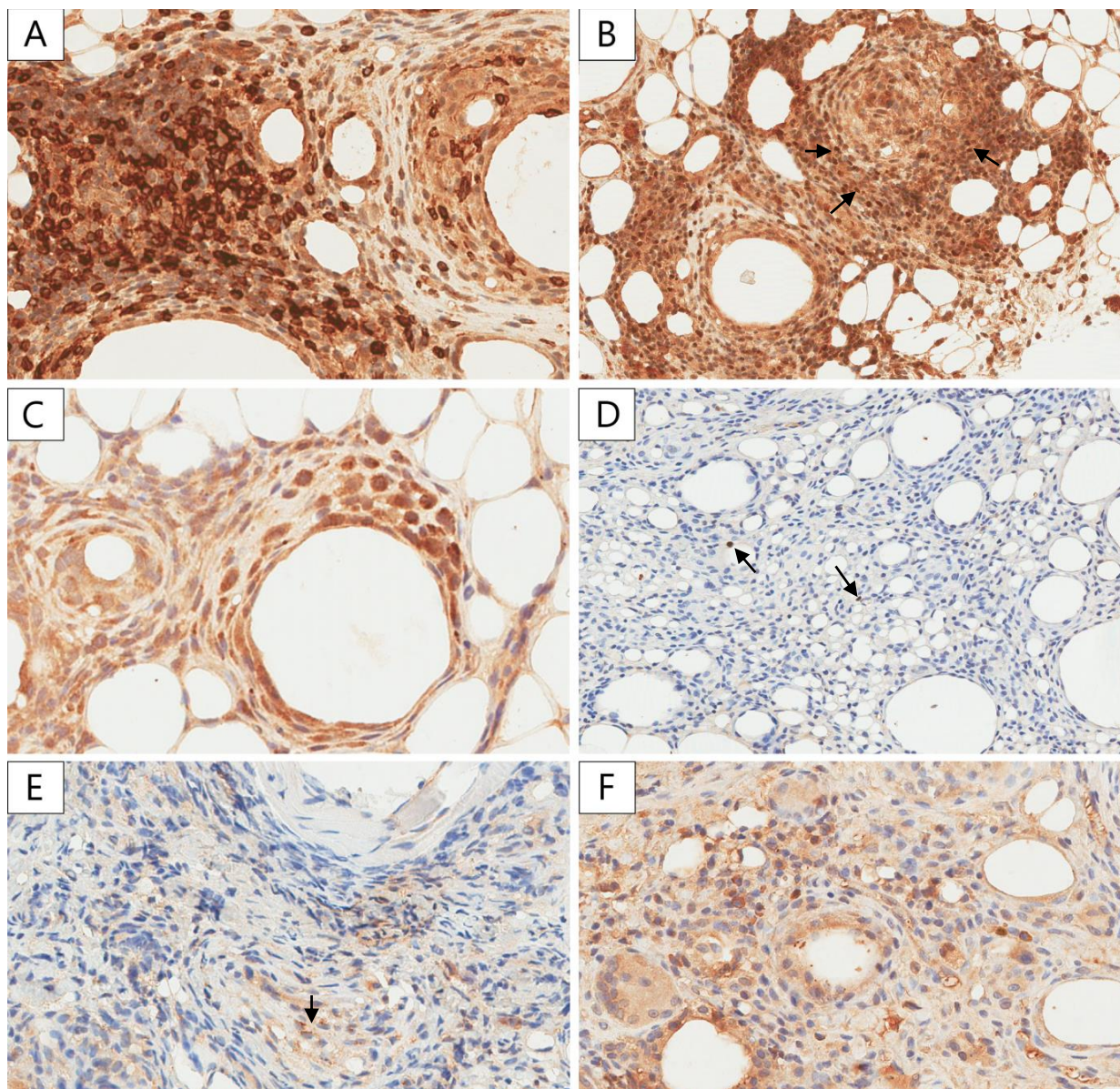


Рис. 2. Результаты гистологического исследования:

- А – выраженное скопление CD3+ клеток в воспалительном инфильтрате. ИГХ реакция с анти-CD3, ув. x600.
В – перифокальная инфильтрация Th-1 клетками (стрелки) в ассоциации с другими клетками гранулемы. ИГХ реакция с анти-TBX21, ув. x400. С – Th-17 клетки в составе кольцевидной гранулемы. ИГХ реакция с анти-IL-17, ув. x800. D – одиночные Th-2 клетки (стрелки) в межгранулемных областях, ИГХ реакция с анти-GATA3, ув. x400.
Е – единичные Treg-лимфоциты (стрелка), ИГХ реакция с анти-Foxp3, ув. x600.
F – одиночные скопления NF-kB+ клеток возле гигантских клеток, ИГХ реакция с анти-NF-kB, ув. x600

арная иммуногистохимическая реакция была выявлена для Treg-лимфоцитов (Foxp3+ клеток) (рис. 2Е).

Кроме того, клеточная популяция воспалительного инфильтрата была представлена преимущественно PPAR-γ и NF-kB+ клетками с выраженной ядерной иммунопозитивной реакцией, которые определялись в качестве единичных иммунопозитивных клеточных элементов (рис. 2F).

Во всех изученных образцах с признаками иммунной гранулематозной инфильтрации в состав смешанного воспалительного инфильтрата входили клетки моноцитарно-макрофагального происхождения (CD68+), составляющие приблизительно до 1/3 от общей популяции в репрезентативных полях зрения.

Иммунопозитивные клетки с выраженной мембранной и цитоплазматической экспрессией марке-

ра CD68 (SCARD1) в значительно большей степени были представлены в гранулематозном инфильтрате, особенно в TBX21+ областях с образованием гигантских клеток по типу Пирогова – Лангхана (рис. 3А). В меньшей степени рассеянные и одиночные CD68+ (SCARD1) клетки наблюдались в GATA3+ областях (рис. 3В).

Иммуногистохимический анализ клеток макрофагального ряда показал наличие M1 (провоспалительных) и M2 (противовоспалительных) фенотипов макрофагов, с преобладанием последних. В частности, M1 клеточная субпопуляция гранулематозного инфильтрата была представлена CD80+ макрофагами с выраженной мембранной иммунопозитивной реакцией, образующими групповые и диффузные одиночные скопления (рис. 3С). В отличие от них подавляющее большинство макрофагов с фенотипом M2 было

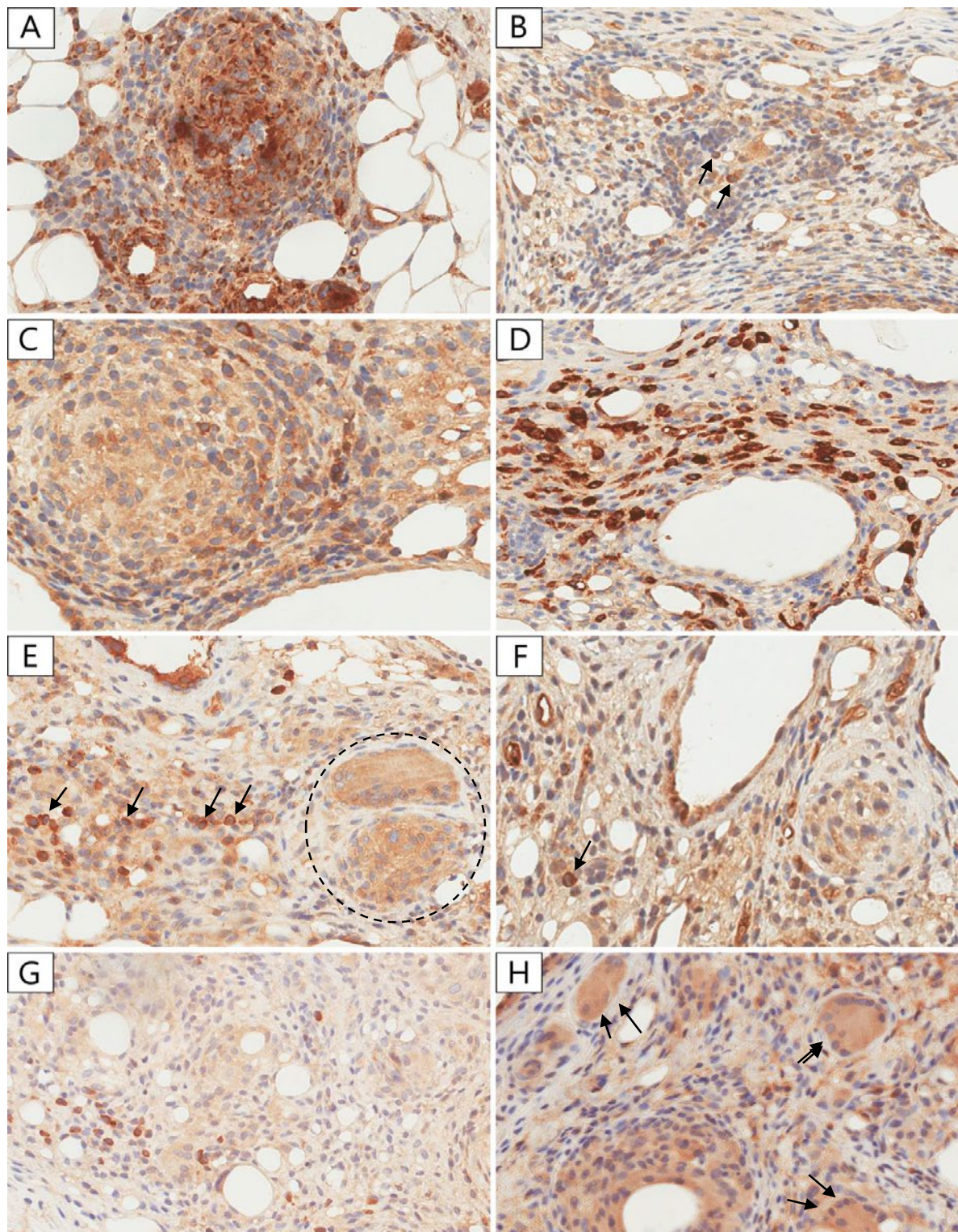


Рис. 3. Результаты гистологического исследования:

А – выраженное скопление CD68+ клеток в центральной части гранулемы, ИГХ реакция с анти-CD68, ув. x600. В – диффузная инфильтрация стромы макрофагами (стрелки) в GATA3+ областях, ИГХ реакция с анти-SCARD1, ув. x600. С – макрофаги с фенотипом M1, ИГХ реакция с анти-CD80, ув. x800. D – выраженная инфильтрация стромы макрофагами с фенотипом M2, ИГХ реакция с анти-CD163, ув. x600. E – скопления макрофагов с фенотипом M1 рядом (стрелки) с гигантскими клетками (пунктирная линия), ИГХ реакция с анти-CD80, ув. x600. F – дендритная клетка (стрелка) в интерстициальной ткани, ИГХ реакция с анти- CD1a, ув. x800. G – скопления PD-L1+ иммунокомпетентных клеток, ИГХ реакция с анти-PD-L1, ув. x600. H – PD-L1+ гигантские клетки (стрелки), ИГХ реакция с анти- PD-L1, ув. x600

представлено клетками с выраженной мембранной экспрессией маркера CD163, которые диффузно располагались в тесной ассоциации с Th-1 лимфоцитами (рис. 3D). В частности, гигантские клетки по типу

Пирогова – Лангханса экспрессировали преимущественно M1 макрофагальный маркер (CD80) и определялись как в центральной части гранулемы, так и за ее пределами (рис. 3E).

Во всех исследуемых образцах иммуногистохимический анализ зрелых дендритных клеток (CD83+) и клеток Лангерганса (CD1a+) показал наличие лишь небольшого количества иммунопозитивных клеток. Вместе с тем CD1a+ и CD83+ клетки характеризовались одинаковой, умеренной или выраженной степенью экспрессии маркеров, которые чаще располагались в виде отдельных единичных клеток (рис. 3F) в гранулематозном инфильтрате.

Иммуногистохимический анализ клеток, экспрессирующих PD-L1, показал выраженную иммунопозитивную мембранную реакцию. Поскольку мембранное и цитоплазматическое окрашивание часто неразличимы из-за высокого ядерно-цитоплазматического соотношения, учитывали только окрашивание на лимфоцитах и макрофагах, но не на нейтрофилах, эозинофилах и плазмócитах. Интересно, что во всех образцах PD-L1+ клетки образовывали клеточные скопления в гранулематозном инфильтрате, которые в среднем состояли из 15–20 клеток на одно стандартное поле зрения (рис. 3G), а также характеризовались умеренной экспрессией на макрофагах, эпителиоидных клетках и гигантских клетках (рис. 3H).

Исследование гранулематозного инфильтрата на первом этапе включало анализ экспрессии маркера CD3, специфичного для всех клеток субпопуляции Т-лимфоцитов. Как и ожидалось, было выявлено преобладание Т-клеточного иммунитета, за счет выраженной экспрессии маркера CD3. Морфогенез гранулематозного воспаления включает в себя сложное взаимодействие между различными иммунными клетками, поэтому в рамках данного эксперимента было изучено распределение Т-лимфоцитов по субпопуляциям: Т-хелперы 1 типа (TBX21+), Т-хелперы 2 типа (GATA3+), Т-хелперы 17 типа (IL-17+) и регуляторные Т-лимфоциты (Foxp3+). Выявленное характерное преобладание TBX21+ клеток с относительно небольшим количеством регуляторных Т-лимфоцитов и практически полным отсутствием Т-хелперов 2 типа свидетельствует о преимущественно провоспалительной направленности иммунного ответа в гранулематозном инфильтрате. Полученные данные можно объяснить тем, что иммунные гранулемы относятся к гиперчувствительности замедленного типа IV (ГЗТ IV), опосредованной Th-1 клетками, а не к гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ), опосредованной Th-2 клетками, а также тем, что секреция IFN- γ Th-1 клетками приводит к активации макрофагов, образованию гранул и считается ключевым фактором, способствующим гранулематозному процессу [10]. Кроме того, транскрипционный фактор T-bet (TBx21) ингибирует экспрессию фактора GATA3 [11], что морфологически отражается количественным антагонизмом Th-1 и Th-2 клеток в воспалительном иммунном ответе. Согласно исследованию William Damsky с соавт., ингибирование Th-1 типа способствовало регрессии саркоидоза, что также подтверждает важную роль клеточного иммунитета в развитии гранул [12]. Ещё одной значимой клеточной субпопуляцией Т-лимфоцитов в регуляции воспалительных процессов в настоящее время рассматриваются Т-хелперы 17 типа [13]. Иммуногистохимический анализ Т-хелперов 17 типа (IL-17+ клетки) выявил выраженную диффузную инфильтрацию гранулемы Th-17 клетками по сравнению с Treg-лимфоцитами (Foxp3+ клетки).

Аутоиммунные заболевания протекают с участием Th-2 и Foxp3+ клеток [14, 15]. Но, несмотря

на это, во всех проанализированных случаях гранулематозного инфильтрата вне зависимости от характера и выраженности воспаления была выявлена скудная инфильтрация Th-2 лимфоцитами и Foxp3+ клетками. Снижение количества или функции Treg-лимфоцитов объясняет выраженную воспалительную реакцию [16], а также может быть ассоциировано с тяжестью воспалительного процесса и неблагоприятным прогнозом [17]. Тем не менее роль Th-2 и Foxp3+ клеток в патогенезе гранулематозных заболеваний остается невыясненной.

Иммуногистохимический анализ клеток моноцитарно-макрофагального ряда выявил преобладание макрофагов с фенотипом M2 (CD163+ клетки). Полученные данные согласуются с результатами гистологических исследований, в частности с данными изучения образцов кожи, полученных от пациентов с саркоидозом, которые показали, что повышенная экспрессия маркера CD163 в пораженных тканях коррелировала с тяжестью заболевания [18]. В нашем исследовании была обнаружена выраженная CD80+ реакция со стороны гигантских клеток, тогда как CD163+ реакция была минимальной или отсутствовала. Вероятно, это может объясняться тем, что гигантские клетки образованы преимущественно провоспалительными макрофагами с фенотипом M1.

Доступно лишь ограниченное число исследований, в которых изучалась роль дендритных клеток (ДК) при аутоиммунном гранулематозном воспалении, в том числе саркоидозе, и они характеризуются противоречивыми результатами. В частности, у пациентов с саркоидозом ДК играли важную роль в активации Th-1 лимфоцитов [19]. Однако в нашем исследовании была обнаружена примесь единичных зрелых ДК (CD83+) и клеток Лангерганса (CD1a+) в саркоидоз-подобном воспалении. Малое количество ДК в гранулематозном инфильтрате позволяет предположить, что эти клетки не играют активной роли в патогенезе иммунной гранулемы. Выявленное преобладание Th1-лимфоцитов в гранулематозном инфильтрате вероятно связано с преимущественной активацией клеток макрофагального ряда, но не ДК.

Выявлена низкая экспрессия PPAR- γ на фоне выраженного иммунного воспалительного процесса. Учитывая, что дефицит PPAR γ усиливает образование гранул [20], минимальная иммуноопосредованная реакция с маркером PPAR- γ может указывать на тяжесть аутоиммунного процесса. NF- κ B является маркером хронического воспаления и определялся диффузно, но точно, аналогично макрофагам с фенотипом M1. Поскольку NF- κ B является ключевым фактором транскрипции активированных M1-макрофагов и необходим для индукции большого количества провоспалительных генов, включая те, которые кодируют TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IL-12 [21], становится ясной локальная морфологическая взаимосвязь NF- κ B и M1-макрофагов при ИГХ-исследовании. Вместе с тем интерпретировать полученные данные следует с осторожностью, принимая во внимание отсутствие абсолютной специфичности указанных иммуногистохимических маркеров, а также возможность их ко-экспрессии по мере трансдифференцировки клеточных субпопуляций.

Анализ экспрессии PD-L1 выявил ее в небольшой когорте клеток. Полученные данные согласуются с кон-

цепцией роли PD-L1 в реализации гранулематозного воспаления, поскольку в последнее время в нескольких отчетах описывается связь между использованием ингибиторов контрольных точек (CTLA-4, PD-L1) и развитием саркоидоз-подобной реакции [22, 23], одним из предположительных механизмов которой является активация Th-17 клеток. Выявленная повышенная активация Th-17 лимфоцитов и низкая концентрация PD-L1+ клеток подтверждают данную гипотезу. Возможно, это вызвано угнетением Treg-клеток, которые являются антагонистами Th-17 лимфоцитов. Кроме того, была выявлена иммунопозитивная реакция PD-L1 на гигантских клетках, которые также экспрессировали CD80 (маркер провоспалительных макрофагов с фенотипом M1), что свидетельствует о провоспалительном характере экспрессии PD-L1. Возможно, образование гигантских клеток связано с образованием PD-L1+ клеточных ассоциаций в очаге гранулематозного воспаления.

Заключение. По данным описательного гистологического анализа и иммуногистохимического исследования образцов тканей в результате *sod* А-индуцированной экспериментальной модели, во всех случаях обнаружены характерные морфологические признаки саркоидоз-подобного гранулематозного воспаления с преобладанием Т-клеточного звена со сдвигом в сторону Т-хелперов 1 типа на фоне незначительного количества регуляторных Т-клеток и Т-хелперов 2 типа. Также в составе гранулематозного инфильтрата выявлена значительная доля клеток моноцитарно-макрофагального ряда (преимущественно, за счёт субпопуляции противовоспалительных макрофагов с фенотипом M2). В частности, были показаны особенности экспрессии PD-L1 на фоне гранулематозного воспаления,

такие как экспрессия PD-L1 на гигантских клетках, а также образование PD-L1+ клеточных ассоциаций в очаге. Тем не менее роль PD-L1 при саркоидозе и других гранулематозных заболеваниях остается неопределенной. Полученные данные расширяют имеющиеся представления о патогенезе аутоиммунных гранулематозных заболеваний и открывают перспективы дальнейших исследований в этой области.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информированное согласие: Исследование одобрено Комитетом по этике ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского». При проведении исследования были соблюдены принципы Хельсинкской декларации, принятой Генеральной ассамблеей Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.). Всех крыс содержали в стандартных условиях вивария. Все процедуры *in vivo* проводили в соответствии с протоколами, одобренными комитетом по уходу и использованию животных ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского». Животных выводили из эксперимента в соответствии с «Международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных», требованиями Международного совета медицинских научных обществ (CIOMS) (1985 г.) и правилами лабораторной практики в Российской Федерации.

Финансирование: Данное исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00161, <https://rscf.ru/project/23-25-00161/>

Литература/References

- Wälscher J., Wessendorf T. E., Darwiche K., Taube C., Bonella F. Sarkoidose. *Pneumologie*. 2022;76(4):281-293. <https://doi.org/10.1055/a-1275-4838>
- Rosen Y. Pathology of Granulomatous Pulmonary Diseases. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2022;146(2):233-251. <https://doi.org/10.5858/arpa.2020-0543-RA>
- Van Kruiningen H. J. What the early pathologists got wrong, and right, about the pathology of Crohn's disease: a historical perspective. *APMIS*. 2020;128(12):621-625. <https://doi.org/10.1111/apm.13081>
- Mironova M., Gopalakrishna H., Rodriguez Franco G., Holland S. M., Koh C. [et al.]. Granulomatous liver diseases. *Hepatol. Commun*. 2024;8(4):e0392. <https://doi.org/10.1097/HJC.0000000000000392>
- Judson M. A. Granulomatous Sarcoidosis Mimics. *Front. Med.* 2021;8:680989. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.680989>
- Саркоидоз: монография / под ред. А. А. Визеля. М.: «Атмосфера», 2010. [Sarkoidoz: monografija / pod red. A. A. Vizelja. M.: «Атмосфера», 2010. (In Russ.)].
- Culver D. A., Judson M. A. New advances in the management of pulmonary sarcoidosis. *BMJ*. 2019;367:l5553. <https://doi.org/10.1136/bmj.l5553>
- Esteves T., Aparicio G., Garcia-Patos V. Is there any association between Sarcoidosis and infectious agents?: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pulm. Med.* 2016;16(1):165. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0332-z>
- Swaigood C. M., Oswald-Richter K., Moeller S. D., Klemenc J. M., Ruple L. M. [et al.]. Development of a sarcoidosis murine lung granuloma model using Mycobacterium superoxide dismutase A peptide. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2011;44(2):166-74. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0350OC>
- Grunewald J., Grutters J. C., Arkema E. V. Sarcoidosis. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2019;5:45. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0096-x>
- Hertweck A., Vila de Mucha M., Barber P. R., Dagil R., Porter H. [et al.]. The TH1 cell lineage-determining transcription factor T-bet suppresses TH2 gene expression by redistributing GATA3 away from TH2 genes. *Nucleic. Acids Res.* 2022;50(8):4557-4573. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac258>
- Damsky W., Wang A., Kim D. J., Young B. D., Singh K. [et al.]. Inhibition of type 1 immunity with tofacitinib is associated with marked improvement in longstanding sarcoidosis. *Nat. Commun.* 2022;13(1):3140. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30615-x>
- Thomas R., Qiao S., Yang X. Th17/Treg Imbalance: Implications in Lung Inflammatory Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(5):4865. <https://doi.org/10.3390/ijms24054865>
- Raphael I., Nalawade S., Eagar T. N., Forsthuber T. G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2015;74(1):5-17. <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2014.09.011>
- Dominguez-Villar M., Hafler D. A. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 2018;19:665–673. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0120-4>
- Kullberg S., Rivera N. V., Abo Al Hayja M., Grunewald J., Eklund A. Changes in lung immune cells related to clinical outcome during treatment with infliximab for sarcoidosis. *Clin. Exp. Immunol.* 2020;201(1):85-93. <https://doi.org/10.1111/cei.13438>
- Patterson K. C., Miller W. T., Hancock W. W., Akimova T. FOXP3+ regulatory T cells are associated with the severity and prognosis of sarcoidosis. *Front. Immunol.* 2023;14:1301991. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1301991>
- Isohisa T., Asai J., Kanemaru M., Arita T., Tsutsumi M. [et al.]. CD163-positive macrophage infiltration predicts systemic involvement in sarcoidosis. *J. Cutan. Pathol.* 2020;47(7):584-591. <https://doi.org/10.1111/cup.13675>
- Lepzien R., Nie M., Czarnewski P., Liu S., Yu M. [et al.]. Pulmonary and blood dendritic cells from sarcoidosis patients more potently induce IFN γ -producing Th1 cells com-

- pared with monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 2022;111(4):857-866. <https://doi.org/10.1002/JLB.5A0321-162R>
20. Mohan A., Neequaye N., Malur A., Soliman E., McPeck M. [et al.]. Matrix Metalloproteinase-12 Is Required for Granuloma Progression. *Front. Immunol.* 2020;11:553949. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.553949>
21. Wang N., Liang H., Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front. Immunol.* 2014;5:614. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>
22. Lafon M., Blaye C., Kind M., Bechade D., Chassaigne F. [et al.]. Sarcoidosis-like reaction in metastatic triple negative breast cancer treated by anti-PD-L1. *Breast J.* 2019;25(5):971-973. <https://doi.org/10.1111/tbj.13386>
23. Li Y., Flavell R. R., Juarez R., Chow M., Wu C. [et al.]. Retrospective study of the incidence of sarcoidosis-like reaction in patients treated with immunotherapy. *Clin. Radiol.* 2023;78(2):e131-e136. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2022.09.127>

Поступила 03.04.2024

Сведения об авторах:

Аблякимов Эльмар Тофикович, ассистент кафедры патологической анатомии с секционным курсом;
тел.: +79788142217; e-mail: ablyakimov1995@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3665-997X>

Кривенцов Максим Андреевич, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой;
тел.: +79787092328; e-mail: maksimkgmu@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5193-4311>

© Коллектив авторов, 2024

УДК 615.28

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2024.19071>

ISSN – 2073-8137

Эффективность катионного пептида PEP-36E против устойчивых к карбапенемам грамотрицательных бактерий *in vitro* и *in vivo*

А. Д. Болатчиев, В. А. Батурин, И. И. Ольшанская, А. А. Вартанян,
Е. Ю. Болатчиева, Н. Н. Диденко, Д. М. Кумукова, Е. Э. Бекназаров

Ставропольский государственный медицинский университет,
Российская Федерация

Cationic peptide PEP-36E is effective against carbapenem-resistant gram-negative bacteria *in vitro* and *in vivo*

Bolatchiev A. D., Baturin V. A., Olshanskaya I. I., Vartanyan A. A.,
Bolatchieva E. Yu., Didenko N. N., Kumukova D. M., Beknazarov E. E.

Stavropol State Medical University, Russian Federation

Устойчивость к антибиотикам ежегодно становится причиной 1,2 млн прямых и 4,95 млн ассоциированных смертей. Классические антибиотики на основе малых молекул не привлекательны с инвестиционной точки зрения для фармацевтических компаний из-за быстрого формирования резистентности. Антимикробные пептиды (АМП) обладают выраженной антибактериальной активностью при значительно меньшей вероятности формирования резистентности. Для *de novo* разработки новых АМП могут быть использованы различные методы машинного обучения. Ранее нами был разработан короткий катионный АМП PEP-36E, показавший в ходе работы активность *in vitro* против грамотрицательных бактерий, устойчивых к карбапенемам. Более того, PEP-36E в эмпирической дозе 100 мкг/мышь снижал летальность в обеих моделях генерализованной инфекции, вызванной *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, антибиотикорезистентность

Antibiotic resistance causes 1.2 million direct and 4.95 million associated deaths annually. Classic small molecule antibiotics are not attractive from an investment point of view for pharmaceutical companies due to the rapid development of resistance. Antimicrobial peptides (AMPs) have pronounced antibacterial activity with a significantly lower probability of developing resistance. Various machine learning methods can be used for *de novo* development of new AMPs. Previously, we developed a short cationic AMP PEP-36E. In the course of the work, it was shown that PEP-36E is active *in vitro* against Gram-negative bacteria resistant to carbapenems. Moreover, PEP-36E at an empirical dose of 100 µg/mouse reduced mortality in both models of generalized infection caused by *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*.

Keywords: antimicrobial peptides, antibiotic resistance