

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ CD20 ПРИ ГРАНУЛЕМАЗНОМ ВОСПАЛЕНИИ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ПАРИКАЛЬЦИТОЛА

Аблякимов Э.Т.

Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Симферополь, e-mail: ablyakimov1995@bk.ru

Целью исследования было изучение неклассических эффектов витамина D в отношении особенностей распределения В-клеток, экспрессирующих белок CD20, в очаге гранулематозного воспаления с помощью иммуногистохимических методов исследования. Эксперимент проводили на 40 лабораторных крысах линии Wistar. У всех крыс моделировали гранулематозное воспаление путем введения антигена (супероксиддисмутазы А). Были сформированы четыре группы по 10 животных в каждой: 1-я группа – контрольная, без коррекции; 2-я группа – крысам вводили парикальцитол за 10 дней до сенсibilизации супероксиддисмутазой А; 3-я группа – крысам вводили парикальцитол с момента сенсibilизации супероксиддисмутазой А; 4-я группа – крысам вводили парикальцитол с момента введения разрешающей дозы супероксиддисмутазы А. Парикальцитол вводили 1 раз в 3 дня. Всех крыс вывели из эксперимента на 35-е сутки путем эвтаназии на фоне парентеральной седации. У животных контрольной группы в очаге гранулематозного воспаления обнаружили незначительное количество В-клеток на фоне незрелых иммунных гранул. Во 2-й, 3-й и 4-й группах у животных в очаге гранулематозного воспаления выявили увеличение количества В-клеток на фоне зрелых иммунных гранул. Парикальцитол оказывает иммуномодулирующий эффект и стимулирует созревание иммунной гранулемы путем увеличения количества В-клеток в очаге гранулематозного воспаления. Представленные данные расширяют имеющиеся представления о патогенезе аутоиммунных гранулематозных заболеваний и открывают перспективы дальнейших исследований в этой области.

Ключевые слова: витамин D, кластер дифференцировки 20, супероксиддисмутаза, иммунная гранулема, воспаление, иммунология, парикальцитол, гистология.

Исследование проведено при поддержке гранта РФФ № 23-25-00161.

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF CD20 EXPRESSION IN GRANULOMATOUS INFLAMMATION ON THE BACKGROUND OF PARICALCITOL ADMINISTRATION

Ablyakimov E.T.

Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S.I. Georgievsky. V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, e-mail: ablyakimov1995@bk.ru

The aim of the study was to study the non-classical effects of vitamin D on the distribution of B-cells expressing the CD20 protein in the focus of granulomatous inflammation using immunohistochemical methods. The experiment was conducted on 40 laboratory Wistar rats. Granulomatous inflammation was modeled in all rats by administering the superoxide dismutase A antigen. Four groups of 10 animals each were formed: the 1st group was the control group without correction; the 2nd group received paricalcitol 10 days before sensitization with superoxide dismutase A; the 3rd group received paricalcitol from the moment of sensitization with superoxide dismutase A; the 4th group received paricalcitol from the moment of administration of the resolving dose of superoxide dismutase A. Paricalcitol was administered once every 3 days. All rats were euthanized on the 35th day by parenteral sedation. In the control group, a small number of B-cells were found in the focus of granulomatous inflammation against the background of immature immune granulomas. In the 2nd, 3rd, and 4th groups, an increase in the number of B-cells was found in the focus of granulomatous inflammation against the background of mature immune granulomas. Paricalcitol has an immunomodulatory effect and stimulates the maturation of immune granulomas by increasing the number of B-cells in the focus of granulomatous inflammation. The presented data expand the existing understanding of the pathogenesis of autoimmune granulomatous diseases and open up prospects for further research in this area.

Keywords: vitamin D, cluster of differentiation 20, superoxide dismutase, immune granuloma, inflammation, immunology, paricalcitol, histology.

The study was conducted with the support of the Russian Science Foundation grant No. 23-25-00161.

Введение

Исследования последних десятилетий показывают неуклонный рост случаев различных заболеваний аутоиммунного генеза с преимущественно гранулематозным типом воспаления, которые нередко приводят к летальным исходам [1]. Согласно данным мировой литературы, установлена тесная зависимость между увеличением количества случаев различных аутоиммунных гранулематозных заболеваний и дефицитом витамина D (VD) [2, 3]. Данная взаимосвязь предусматривает различные неклассические эффекты VD, опосредованные активацией собственных рецепторов (VDR), проявляющиеся влиянием на клеточный и гуморальный иммунитет [4]. Тем не менее, неклассические эффекты VD в отношении патогенеза аутоиммунных гранулематозных заболеваний с позиций влияния на ключевые межклеточные взаимодействия, особенно на клетки, экспрессирующие белок CD20, остаются недостаточно изученными.

CD20 – член семейства тетраспанов интегральных мембранных белков, состоящий из 297 аминокислот и синтезируемый исключительно клетками гуморального иммунитета, а именно В-клетками. Он экспрессируется практически всеми клетками данного дифферона (незрелыми и наивными В-клетками, В-клетками памяти и В-клетками герминативного центра), за исключением ранних пре-В-лимфоцитов или плазмочитов [5]. Таким образом, CD20 является маркером практически всех В-клеток, а клетки, экспрессирующие его, являются CD20 позитивными (CD20+). В данном исследовании можно определить влияние парикальцитола практически на все В-клетки, за исключением ранних пре-В-клеток и плазматических клеток.

Изучены особенности распределения CD20+ клеток в очаге индуцированного гранулематозного воспаления. С целью индуцирования иммунного гранулематозного воспаления была модифицирована модель саркоидоза легких с использованием супероксиддисмутазы А (SOD A) [6]. Выбор данной модели обусловлен тем, что:

- 1) саркоидоз является морфологическим «эталон» для изучения неспецифических иммунных гранул, поскольку многие гранулематозные заболевания могут клинически и гистологически имитировать саркоидоз [7];
- 2) иммунное воспаление, индуцированное SOD A в эксперименте с мышами, показало гистологический и иммунофенотипический профили саркоидоза, которые хорошо коррелировали с профилями при саркоидозе у человека [8];
- 3) обнаружена обратная зависимость между уровнем VD и тяжестью гранулематозных заболеваний, включая саркоидоз [9].

Выбор CD20+ клеток обусловлен следующими факторами:

- 1) ранее была выявлена локализация CD20+ клеток на периферии тканей больных саркоидозом [10], в некоторых случаях количество CD20+ клеток превосходило количество Т-клеток [11];
- 2) В-клетки при саркоидозе реагируют на аутоантигены, что дополнительно подтверждается высоким процентом CD20+ клеток с фенотипом возрастных В-клеток (age-associated B cells), которые типичны для гранулематозных заболеваний [12];
- 3) саркоидоз можно успешно лечить с помощью анти-CD20 моноклональных антител, таких как ритуксимаб [13].

В доступной литературе отсутствуют иммуногистохимические исследования на экспериментальном материале, посвященные изучению особенностей распределения CD20+ клеток в очаге иммунного гранулематозного воспаления на фоне неклассических эффектов VD, опосредованных активацией VDR. В связи с этим **целью** данного экспериментального **исследования** было изучение неклассических эффектов VD в отношении особенностей распределения В-клеток, экспрессирующих белок CD20, в очаге гранулематозного воспаления с помощью иммуногистохимических методов.

Материал и методы исследования

Эксперименты над животными были выполнены в соответствии: с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей, с Федеральным законом от 27.12.2018 № 498-ФЗ (ред. от 27.12.2019 г.) «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации», а также с учетом рекомендаций этического комитета ФГАОУ ВО «КФУ имени В.И. Вернадского» (протокол № 10 от 27.10.2022 г.).

Исследование проводили на 40 белых крысах на базе Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского, г. Симферополь, Россия. В соответствии с поставленной целью, были изучены особенности распределения В-клеток, экспрессирующих белок CD20, в очаге аутоиммунного гранулематозного воспаления на фоне введения парикальцитол. Животных случайным образом распределили на группы: контрольную (К) (n=10) и экспериментальную группу (Э) (n=30), которую разделили на три подгруппы (Э1, Э2 и Э3). Экспериментальные крысы получали парикальцитол (19-нор-1,25-гидрокси-витамин D2) 1 раз в 3 дня из расчета ~200 нг/животное, который вводили внутрибрюшинно. При этом крысы Э1 (n=10) получали парикальцитол с первого дня эксперимента, крысы Э2 (n=10) получали парикальцитол с момента сенсibilизации SOD A, а крысы Э3 (n=10) получали парикальцитол с момента введения разрешающей дозы антигена. Крысы контрольной группы не получали парикальцитол. На 10-й день крысам

интрадермально вводили антиген SOD A в дозе 50 мкг, растворенный в 0,25 мл полного адьюванта Фрейнда. Через 10 дней после этого вводили аналогичную дозу SOD A, растворенную в 0,25 мл физиологического раствора. Всех крыс вывели из эксперимента на 35-е сутки путем декапитации на фоне седации. Для этого животным вводили 0,1%-ный раствор медетомидина гидрохлорида объемом 0,2 мл внутривенно.

Супероксиддисмутаза A представляет собой металлофермент и фактор патогенности, секретируемый *Mycobacterium* и *Nocardia*. С одной стороны, он преобразует свободные радикалы кислорода, генерируемые макрофагами хозяина, в перекись водорода и кислород. С другой стороны, он стимулирует клеточный иммунный ответ в поврежденных тканях и органах. SOD A была синтезирована в компании AtaGenix Laboratories (Ухань, КНР) в 2023 г.

В качестве коррекции использовали фармакологический аналог VD – парикальцитол (Земпалар®, Италия) 5 мкг/мл в виде раствора для парентерального введения, который оказывает минимальное воздействие на концентрацию кальция и фосфора.

После эвтаназии и декапитации животных в месте введения SOD A определяли местное уплотнение тканей (инфильтрат), которое фиксировали в 10%-ном забуференном формалине. Для подготовки тканей к гистологическому анализу полученные образцы обезживали в серии этанолов с возрастающей концентрацией, начиная с 70% и заканчивая 100%, и просветляли в ксилоле. После этого образцы заливали парафином для создания твердых блоков, чтобы сохранить структуру тканей и получить качественные гистологические срезы. После парафинизации образцов тканей готовили срезы толщиной 4 мкм с использованием гибридного гистологического процессора Logos (Milestone Medical, Италия) и модуля Leica EG1150 (Leica Biosystems, Германия). Серийные гистологические срезы толщиной 4 мкм получены с использованием автоматического ротационного микротом Leica RM2255 (Leica Biosystems, Германия). Далее использовали стандартную гистологическую окраску – гематоксилин и эозин – для окрашивания полученных срезов. Для проведения качественной оценки морфологических преобразований с последующей морфологической оценкой иммунного воспаления использовали комплекс Olympus CX-33, включающий: микроскоп Olympus CX-33 40×100×400, цифровую камеру и персональный компьютер.

Для иммуногистохимического анализа диффузного гранулематозного инфильтрата, вызванного супероксиддисмутазой A, использовали гистологические срезы (~4 мкм). Окрашивание проводили с использованием полуавтоматического иммуногистостайнера BondMax (Leica Biosystems, Германия). Протокол окрашивания включал депарафинизацию, термическую демаскировку антигенов, блокирование пероксидазы, инкубацию с антителами (АТ) в течение 15 минут при температуре 20°C и визуализацию с помощью системы Bond Polymer Refine (Leica Biosystems, Германия). Перед визуализацией проводили контрастное

окрашивание гематоксилином на протяжении 2 минут для получения более детализированных изображений тканей и клеток, что облегчает их анализ под микроскопом. С помощью гистосканера Aperio CS2 (Leica Biosystems, Германия) были отсканированы все гистологические срезы. Для анализа изображений использовали программное обеспечение Aperio ImageScope и ImageJ.14.

Для идентификации клеток, экспрессирующих маркер CD20, в очаге воспаления использовали поликлональные АТ против CD20 IgG (кат. #DF13391; Affinity Biosciences ®).

Степень иммуногистохимической реакции оценивали как позитивную в случае коричневого окрашивания цитоплазмы или цитоплазматической мембраны. Степень окрашивания оценивали полуколичественно как сумму общей интенсивности коричневого окрашивания (минимальная реакция или ее отсутствие, умеренная или сильно положительная). В качестве позитивного контроля применяли образцы небных миндалин человека. Образцы, обработанные с отсутствием первичных АТ, использовали в качестве отрицательного контроля.

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel и Statistica 10.0 и с использованием описательной статистики. Сравнительный анализ был проведен с использованием U-критерия Манна–Уитни. Результаты исследования были выражены с помощью медианы (М), первого (Q1) и третьего квартилей (Q3) в виде М [Q1; Q3]. Критический уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Оценивая экспрессию поверхностного маркера CD20, следует отметить, что во всех образцах кожи, полученных от контрольных животных, была выявлена иммунонегативная реакция, особенно в центральной и перифокальной области незрелой иммунной гранулемы, тогда как в межгранулемных областях были обнаружены единичные CD20+ клетки (рис. 1).

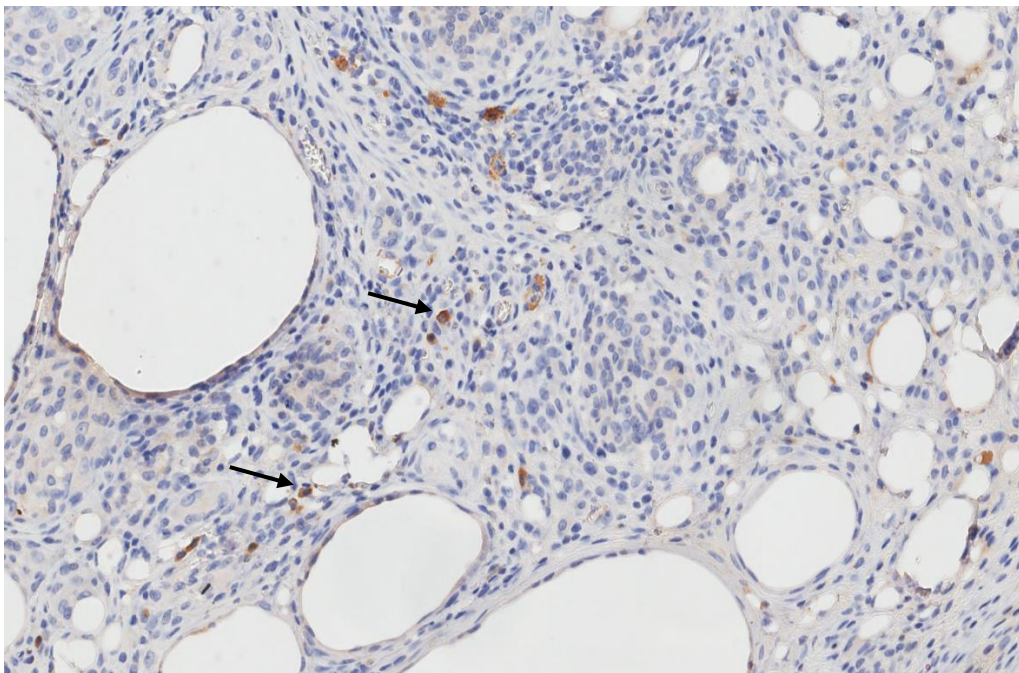


Рис. 1. Инфильтрация кожи (дермы) контрольной крысы с гранулематозным воспалением CD20+ клетками. Единичные CD20+ клетки в межгранулемных областях.

Иммуногистохимическая реакция с антителами против CD20+ антигена. Ув. x400

Примечание: стрелка – CD20+ клетки.

Однако в экспериментальной группе, преимущественно в первой и второй подгруппах, были выявлены CD20+ клетки, которые местами формировали клеточные скопления на фоне созревания иммунных гранул и характеризовались высокой степенью коричневого окрашивания цитоплазмы и цитоплазматической мембраны (рис. 2).

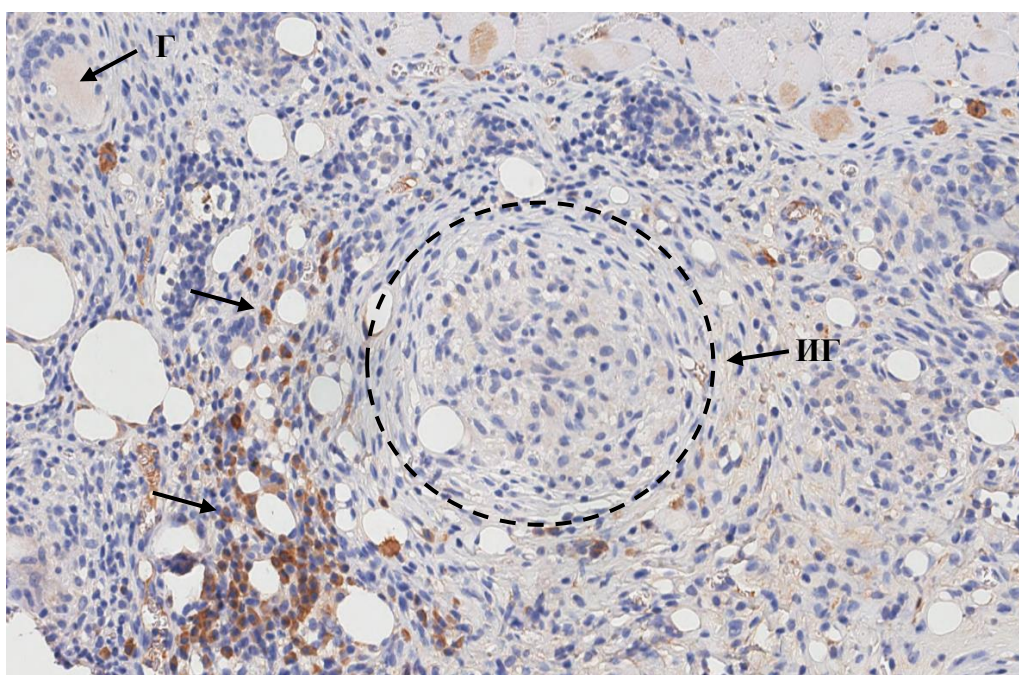


Рис. 2. Инфильтрация кожи (дермы) крысы первой экспериментальной группы CD20+ клетками. Скопления CD20+ клеток в перифокальной области иммунной гранулемы.

Иммуногистохимическая реакция с антителами против CD20+ антигена. Ув. x400

Примечание: стрелка – CD20+ клетки, Г – гигантская клетка Пирогова–Лангханса, ИГ – иммунная гранулема.

Статистический анализ плотности CD20+ клеток в гранулематозном инфильтрате показал, что наибольший уровень экспрессии маркера CD20 был отмечен в группе Э2 и составил 17,0 [12,0; 24,0]. В контрольной группе была выявлена очень низкая экспрессия маркера CD20, которая была незначительно ниже аналогичного показателя в группе Э3 (1,0 [0,0; 2,0] и 3,0 [1,0; 6,0] соответственно, $p=0,03$). В первой экспериментальной группе уровень экспрессии маркера CD20 был выше в 7 раз по сравнению с контролем и составил 7,0 [3,5; 9,5] ($p=0,0004$).

Таким образом, в группах Э1, Э2 и Э3 после введения парикальцитола плотность CD20+ клеток достоверно увеличивалась по сравнению с контролем в 7, 17 и 3 раза соответственно (во всех случаях $p=0,03$), что обусловлено массовой миграцией клеток лимфоидного ряда в область иммунного воспаления. Резкое увеличение количества CD20+ клеток во всех экспериментальных группах свидетельствует о том, что не только клеточный, но и гуморальный иммунитет играет важную роль в патогенезе иммунной гранулемы.

Следует отметить, что увеличение уровня экспрессии маркера CD20 во всех экспериментальных группах может свидетельствовать о важной роли В-лимфоцитов в формировании и созревании иммунной гранулемы, особенно на этапе сенсibilизации и введения разрешающей дозы антигена. Это подтверждается тем, что количество CD20+ клеток было значительно увеличено на этапе сенсibilизации по сравнению с третьей экспериментальной группой, где вводили разрешающую дозу SOD A ($p=0,000019$) (таблица).

Уровень экспрессии маркера CD20 в контрольной и экспериментальных группах крыс
(М [Q1; Q3])

Показатель	КГ	ЭГ 1	ЭГ 2	ЭГ 3
М [Q1; Q3]	1,0 [0,0; 2,0]	7,0 [3,5; 9,5]*	17,0 [12,0; 24,0]*	3,0 [1,0; 6,0]*

Примечание: КГ – контрольная группа животных, ЭГ – экспериментальная группа животных,
* – $p<0,05$ в сравнении с контролем.

В-лимфоциты, вероятно, рекрутируются из периферической крови и костного мозга [14] с целью выработки АТ и провоспалительных интерлейкинов, для элиминации антигена и

координирования аутоиммунного процесса посредством влияния на другие иммунные клетки, которые также участвуют в формировании и созревании иммунной гранулемы [15]. Эти изменения в гранулематозном инфильтрате обусловлены иммуномодулирующим влиянием парикальцитола на CD20+ клетки через лиганд-ассоциированную активацию рецепторов VDR, что особенно выражено на этапе сенсibilизации и формирования иммунной гранулемы.

Заключение

Было обнаружено, что экспрессия маркера CD20 значительно увеличилась в экспериментальных группах по сравнению с контрольной группой. Это свидетельствует о важной роли В-лимфоцитов в формировании и созревании иммунной гранулемы, особенно на этапе сенсibilизации и введения разрешающей дозы антигена. Иммуномодулирующее действие парикальцитола, вероятно, способствует активации В-лимфоцитов, что подчеркивает его потенциал в терапии заболеваний, связанных с гранулематозным воспалением. Эти данные открывают новые перспективы для дальнейших исследований в области иммунологии и разработки терапевтических стратегий.

Автор выражает особую благодарность старшему преподавателю кафедры физики конденсированных сред, физических методов и информатики в медицине Физико-технического института КФУ Глушкову А.Н. за оказанную помощь при написании настоящей статьи.

Список литературы

1. Mitratza M., Klijs B., Hak A.E., Kardaun J.W.P.F., Kunst A.E. Systemic autoimmune disease as a cause of death: mortality burden and comorbidities // Rheumatology (Oxford Academic). 2021. Vol. 2. Is. 60 (3). P. 1321-1330. DOI: 10.1093/rheumatology/keaa537.
2. Kiani A., Abedini A., Adcock I.M., Mirenayat M.S., Taghavi K., Mortaz E., Kazempour-Dizaji M. Association Between Vitamin D Deficiencies in Sarcoidosis with Disease Activity, Course of Disease and Stages of Lung Involvements // Journal of Medical Biochemistry. 2018. Vol. 37. Is. 2. P. 103-109. DOI: 10.1515/jomb-2017-0041.
3. Wessels I., Rink L. Micronutrients in autoimmune diseases: possible therapeutic benefits of zinc and vitamin D // Journal of Nutritional Biochemistry. 2020. Vol. 77. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2019.108240.
4. Martens P.J., Gysemans C., Verstuyf A., Mathieu A.C. Vitamin D's effect on immune function // Nutrients. 2020. Vol. 12. Is. 5. P. 1248. DOI: 10.3390/nu12051248.

5. Pavlasova G., Mraz M. The regulation and function of CD20: an "enigma" of B-cell biology and targeted therapy // *Haematologica*. 2020. Vol. 105. Is. 6. P. 1494-1506.
DOI: 10.3324/haematol.2019.243543.
6. Huang Y., Lu C.Z., Wang C.C., Jiang Y., Wang X.Y., Duan Y.Y. Establishment and identification of a C57B/6 mouse sarcoidosis granuloma model // *Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*. 2013. Vol. 36. Is. 8. P. 587-91. PMID: 24252735.
7. Judson M.A. Granulomatous Sarcoidosis Mimics // *Front Med (Lausanne)*. 2021. Vol. 8. DOI: 10.3389/fmed.2021.680989.
8. Swaisgood C.M., Oswald-Richter K., Moeller S.D., Klemenc J.M., Rupple L.M., Farver C.F., Drake J.M., Culver D.A., Drake W.P. Development of a sarcoidosis murine lung granuloma model using Mycobacterium superoxide dismutase A peptide // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2011. Vol. 44. Is. 2. P. 166-74. DOI: 10.1165/rcmb.2009-0350OC.
9. Gianella F., Hsia C.C., Sakhaee K. The role of vitamin D in sarcoidosis // *Faculty Reviews*. 2020. Vol. 9. Is. 14. DOI: 10.12703/b/9-14.
10. Celada L.J., Drake W.P. Targeting CD4(+) T cells for the treatment of sarcoidosis: a promising strategy? // *Immunotherapy*. 2015. Vol. 7. Is. 1. P. 57-66. DOI: 10.2217/imt.14.103.
11. Bauer L., Müller L.J., Volkers S.M., Heinrich F., Mashreghi M.F., Ruppert C., Sander L.E., Hutloff A. Follicular Helper-like T Cells in the Lung Highlight a Novel Role of B Cells in Sarcoidosis // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2021. Vol. 204. Is. 12. P. 1403-1417. DOI: 10.1164/rccm.202012-4423OC.
12. Phalke S., Aviszus K., Rubtsova K., Rubtsov A., Barkes B., Powers L., Warner B., Crooks J.L., Kappler J.W., Fernández-Pérez E.R., Maier L.A., Hamzeh N., Marrack P. Age-associated B Cells Appear in Patients with Granulomatous Lung Diseases // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2020. Vol. 202. Is. 7. P. 1013-1023. DOI: 10.1164/rccm.201911-2151OC.
13. Cinetto F., Compagno N., Scarpa R., Malipiero G., Agostini C. Rituximab in refractory sarcoidosis: a single centre experience // *Clinical and Molecular Allergy*. 2015. Vol. 13. Is. 1. P. 19. DOI: 10.1186/s12948-015-0025-9.
14. Carrion C., Guérin E., Gachard N., le Guyader A., Giraut S., Feuillard J. Adult Bone Marrow Three-Dimensional Phenotypic Landscape of B-Cell Differentiation. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2019. Vol. 96. Is. 1. P. 30-38. DOI: 10.1002/cyto.b.21747.
15. Chen Y., Bharrhan S., Xu J., Sharma T., Wang Y., Salgame P., Zhang J., Nargan K., Steyn A.J.C., Maglione P.J., Chan J. B cells promote granulomatous inflammation during chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *PLOS Pathogens*. 2023. Vol. 19. Is. 3. DOI: 10.1371/journal.ppat.1011187.