

ВЛИЯНИЕ САПОЗИНА D НА ТЕЧЕНИЕ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ



Г.С. Шепелькова, В.В. Евстифеев, В.Г. Авдиенко, И.В. Бочарова, В.В. Еремеев

ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

Резюме. Сапозины (Sap) — подгруппа гликопротеинов большого семейства сапозин-подобных белков. Сапозины образуются в кислых эндосомах путем расщепления просапозина. Сапозины участвуют в процессе презентации липидных антигенов микобактерий на молекулах CD1. Сапозин D (SapD) является наиболее распространенным сапозин-подобным белком в нормальных тканях, где его концентрация в три раза выше, чем у других сапозинов. SapD способствует гидролизу церамида кислой церамидазой *in vivo*, о чем свидетельствует накопление α -гидроксил-церамида в почках и мозжечке дефицитных по гену SapD мышей. Соответственно, у животных с дефицитом SapD обнаруживаются дегенерация почечных канальцев и гидронефроз, а также прогрессирующая потеря клеток Пуркинье в мозжечке, что приводит к атаксии. До настоящего времени наследственный дефицит SapD у людей не выявлен. Ранее нами было показано, что макрофаги, полученные от мышей-нокаут по гену SAPD, подавляли рост *M. tuberculosis* слабее, чем макрофаги мышей дикого типа. Причем компенсация дефицита SapD в клетках нокаут приводит к восстановлению их бактерицидной функции. Таким образом, SapD является важным компонентом в формировании иммунного ответа к туберкулезу. Однако неясно, как дефицит SapD влияет на формирование противотуберкулезного иммунного ответа в условиях *in vivo*. На модели экспериментальной туберкулезной инфекции мышей дикого типа и SapD-ko было показано, что через 5 недель после инфицирования микобактериальная нагрузка в легких и селезенке у SapD-ko была достоверно выше, чем у мышей дикого типа. Анализ клеточного состава легочной ткани показал, что для «наивных» SapD-ko по сравнению с мышами дикого типа характерно большее количество макрофагов. Также было показано, что через 5 недель после заражения мыши SapD-ko отличаются от мышей дикого типа более выраженной нейтрофильной инфильтрацией легочной ткани. Исследование склонности к апоптозу клеток легочной ткани мышей SapD-ko и мышей дикого типа показало, что содержание апоптотических клеток в легких мышей нокаут по SapD через 3 недели после инфицирования достоверно выше, чем у мышей линии B6. Таким образом, дефицит SapD приводит к существенному усилению воспаления при экспериментальной туберкулезной инфекции, а также влияет на предрасположенность клеток легкого к апоптозу.

Ключевые слова: туберкулез, *M. tuberculosis*, протекция, сапозин D, гликолипопротеин, лизосома.

THE EFFECT OF SAPOSIN D ON THE ANTI-TUBERCULOSIS IMMUNE RESPONSE IN EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS INFECTION

Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Avdienko V.G., Bocharova I.V., Yermeev V.V.

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Abstract. Saposins (Sap) are a subgroup of glycoproteins belonging to the Saposin-Like Proteins family. They are generated by the proteolytic processing of the common precursor prosaposin. Saposins localize primarily in the lysosomes and

Адрес для переписки:

Шепелькова Галина Сергеевна
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2, ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза.
Тел.: 8 (499) 785-90-72.
E-mail: shepelkovag@yahoo.com

Contacts:

Galina S. Shepelkova
107564, Russian Federation, Moscow, Yauza alley, 2,
Central Tuberculosis Research Institute.
Phone: +7 (499) 785-90-72.
E-mail: shepelkovag@yahoo.com

Для цитирования:

Шепелькова Г.С., Евстифеев В.В., Авдиенко В.Г., Бочарова И.В., Еремеев В.В. Влияние сапозина D на течение туберкулезной инфекции у мышей // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 439–445.
doi: 10.15789/2220-7619-TEO-2029

Citation:

Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Avdienko V.G., Bocharova I.V., Yermeev V.V. The effect of saposin D on the anti-tuberculosis immune response in experimental tuberculosis infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 439–445.
doi: 10.15789/2220-7619-TEO-2029

are required for the catabolism of glycosphingolipids. Saposins are involved in the presentation of lipid mycobacterial antigens on CD1 molecules. SapD is the most abundant saposin in normal tissues, where its concentration is three times higher than that of other saposins. SapD promotes the hydrolysis of ceramide by acid ceramidase *in vivo*, as evidenced by the accumulation of α -hydroxyl-ceramide in the kidneys and cerebellum of SapD-deficient mice. Accordingly, SapD-deficient animals show renal tubular degeneration and hydronephrosis, as well as progressive loss of Purkinje cells in the cerebellum, leading to ataxia. To date, no hereditary SapD deficiency has been identified in humans. Previously we had shown that macrophages derived from SAPD knockout mice suppress the growth of *M. tuberculosis* to a lesser extent than macrophages from wild-type mice. Moreover, compensation for the deficiency of SapD in knockout cells led to the restoration of their bactericidal function. Thus, SapD is an important component in the anti-TB immune response. However, it is not clear how SapD deficiency affects the *in vivo* antituberculosis immune response. In the model of experimental tuberculosis infection, it was shown that five weeks post infection the mycobacterial load in the lungs and spleens was significantly higher in SapD-ko mice than in wild-type mice. Analysis of the lung tissue cellular composition showed the differences between SapD-ko and B6 mice. Thus “naive” SapD-ko mice are characterized by a larger quantity of macrophages compared to B6 mice. It was also shown that five weeks after infection, SapD-ko mice differ from wild-type mice in a more pronounced neutrophilic infiltration of the lung tissue. A study of the propensity for apoptosis of cells in the lung tissue of SapD-ko mice showed that the content of apoptotic cells in the lungs of SapD knockout mice three weeks after infection was significantly higher than in wild-type B6 mice. Thus, SapD deficiency leads to a significant increase in inflammation during experimental tuberculosis infection, and also affects the predisposition of lung cells to apoptosis.

Key words: *tuberculosis, M. tuberculosis, influenza, saposin D, glycolipoprotein, lysosome.*

Введение

На протяжении тысячелетий туберкулез (ТБ) представляет собой серьезную угрозу для человечества. При этом в 70% случаев легкие служат воротами проникновения инфекта и местом развития заболевания [19]. Этиологическим фактором туберкулеза является вирулентный и сложно устроенный бактериальный патоген — *M. tuberculosis*, способный противостоять протективному иммунному ответу хозяина и даже модифицировать его [6]. *M. tuberculosis* может годами персистировать в неактивном (дормантном) состоянии, фактически не причиняя вреда организму хозяина и не выходя за его пределы. Подобное состояние принято называть «латентной формой» инфекции. Переход бактерии из дормантного в метаболически активное состояние происходит при нарушении баланса между активностью *M. tuberculosis* и ограничительной функцией иммунной системы хозяина. Данный переход характеризуется интенсивным размножением микобактерий до нескольких миллиардов, что в конечном итоге ведет к разрушению тканей организма хозяина и, как следствие, — к диссеминации инфекции [9, 17].

Фагоцитоз — основной механизм защиты хозяина от бактериальной инфекции. «Киллинг» бактерий при фагоцитозе зависит от переноса инфекта в лизосомы, то есть слияния фагосомы с лизосомой. В полости лизосом насчитывается более 60 кислых гидролитических ферментов, основной функцией которых является расщепление макромолекул. Также данные органеллы содержат сапозин-подобные белки — белки-активаторы сфинголипидов, к которым относятся в том числе сапозины (Sap) [2, 4, 5]. В состав

данного семейства входят пять сапозинов A–D и белок-активатор GM2. SapA–D образуются в лизосомах за счет протеолитического расщепления общего предшественника просапозина (pSap) [10]. Sap представляют собой небольшие, гликозилированные, термо- и кислотоустойчивые неферментативные белки, основной функцией которых является деградация сфинголипидов за счет активации специфических гидролаз [14]. Также было показано, что данные белки могут взаимодействовать с липидными лизосомальными мембранами, приводя к деградации последних [4, 8]. Sap при взаимодействии с гликопротеинами CD1 участвуют в антигенной презентации микобактериальных липидов иммунным клеткам хозяина [18].

Ранее, в экспериментах *in vitro*, нами было продемонстрировано влияние SapD на бактерицидную/бактериостатическую функцию макрофагов. Так, макрофаги SapD-дефицитных мышей в сравнении с культурой клеток мышей дикого типа менее эффективно подавляли рост *M. tuberculosis*. При этом компенсация дефицита SapD в клетках нокауты приводила к восстановлению их бактерицидной функции [3]. То есть SapD — важный и необходимый компонент иммунного ответа при ТБ. В данной работе мы изучали влияние SapD на чувствительность мышей к экспериментальной туберкулезной инфекции.

Материалы и методы

Животные. Все эксперименты на животных были одобрены ЛЭК ФГБНУ «ЦНИИТ». В работе использовали самок мышей линий C57BL/6 (B6) и C57BL/6-SapD^{-/-} (SapD-ko) из питомни-

ка ФГБНУ «ЦНИИТ». Мыши линии SapD^{-/-} были любезно предоставлены профессором С. Кауфманом (Институт инфекционной биологии Макса Планка, Берлин, Германия) с одобрения Дж. Матсуды (Институт биологических наук о здоровье, Высшая школа Университета Токусимы, Токусима, Япония) [11].

Микобактериальные культуры и индукция экспериментальной туберкулезной инфекции. Для заражения животных был использован штамм H37RV Pasteur *M. tuberculosis* в фазе логарифмического роста [12]. В работе применяли модель низкодозового аэрозольного заражения (100 КОЕ/мышь).

Антигены. Растворимую фракцию ультразвукового дезинтеграта *M. tuberculosis* штамма H37RV использовали в качестве антигена во всех экспериментах [1].

Определение количества микобактерий в органах зараженных животных. Через 21 и 35 дней после инфицирования исследовали рост микобактерий в селезенке и легких экспериментальных животных. Десятикратные серийные разведения гомогенатов органов высевали на чашки Петри с твердым агаром Дюбо. На 21 день после посева на агар Дюбо проводили подсчет колоний.

Анализ экспрессии поверхностных маркеров проводили методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSCalibur (Beckton Dickenson, США) с использованием флуоресцентно-меченых антител FITC, PE, PerCP и APC по рекомендации фирмы-производителя (BD Pharmingen (США) и Biolegend (США)).

Определение активности каспазы-3/7 в клетках легочной ткани проводили с использованием набора Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega,

США). Клетки легочной ткани инкубировали с ультразвуковым дезинтегратором *M. tuberculosis*. Через 24 часа после инкубации к клеткам добавляли Caspase-Glo реагент (согласно рекомендации фирмы-производителя). Образцы инкубировали 2 часа в темноте при комнатной температуре, а затем оценивали активность каспазы-3/7 на люминометре (согласно рекомендации фирмы-производителя). В качестве контроля использовали клетки легочной ткани, не стимулированные ультразвуковым дезинтегратором *M. tuberculosis*.

Гистологические исследования. Серийные срезы легкого экспериментальных животных толщиной 8 мкм, полученные в электронном криотоме (ThermoFisher Scientific, Великобритания), фиксировали в метаноле и окрашивали гематоксилином и эозином [16].

Статистическая обработка результатов. Метод Стьюдента, корреляционный и вариационный анализ применяли для статистической обработки данных. При сравнении кривых выживания применяли тест Лог-ранка. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Экспериментальные данные обрабатывали с помощью пакета программ GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.).

Результаты

Работу проводили на самках мышей нокаут по SapD на основе В6. В качестве контроля использовали самок мышей линии В6 дикого типа. Мышей аэрозольно инфицировали низкой дозой *M. tuberculosis* штамма H37RV (100 КОЕ/мышь). На 21 и 35 день после заражения исследовали рост микобактерий в лег-

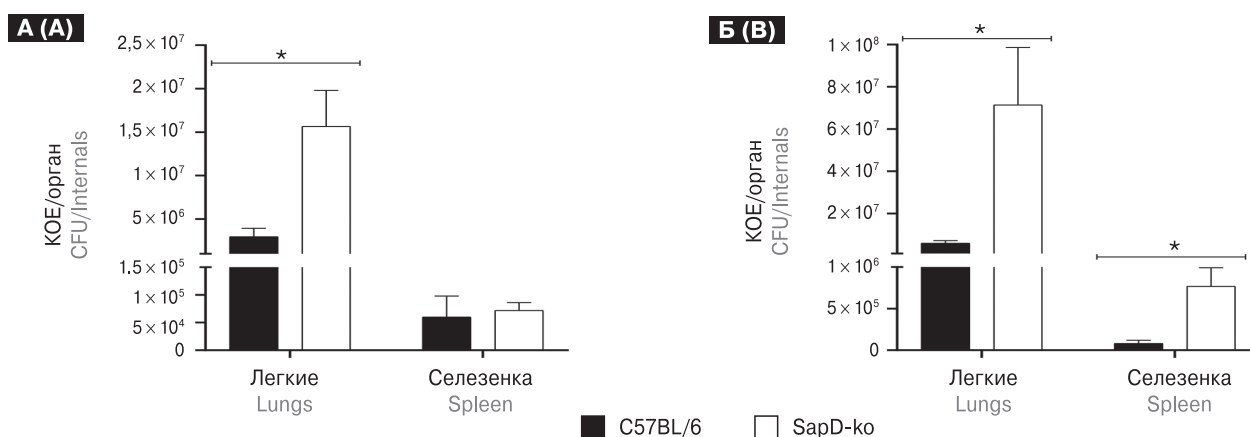


Рисунок 1. Микобактериальная нагрузка селезенки и легкого мышей В6 и SapD-ko через 21 (А) и 35 (Б) дней после аэрозольного инфицирования низкой дозой *M. tuberculosis*

Figure 1. Splenic and lung tissue mycobacterial load in B6 and SapD-ko mice at day 21 (A) and day 35 (B) post aerosol infection with a low dose of *M. tuberculosis*

Примечание. На рисунке приведены данные одного из трех идентичных экспериментов (M±SD, n = 5 в группе). * — $p < 0,05$.
Note. The data from one of three identical experiments are shown (M±SD, n = 5 per group). * — $p < 0.05$.

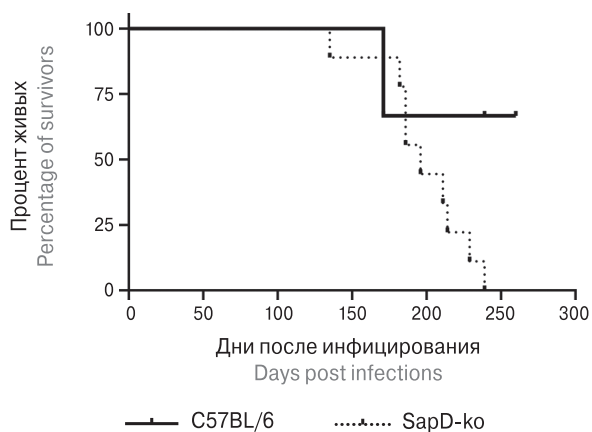


Рисунок 2. Различия в выживании мышей В6 (прямая линия) и SapD-ko (пунктир), инфицированных *M. tuberculosis*

Figure 2. Survival differences of B6 (straight line) and SapD-ko (dotted line) mice infected with *M. tuberculosis*

Примечание. Самки мышей линий В6 и SapD-ko (по 9 животных в группе) были аэрозольно инфицированы фильтрованной культурой *M. tuberculosis* (100 КОЕ/мышь). Выживаемость зараженных животных контролировали ежедневно на протяжении 260 дней после инфекции. На рисунке представлены данные одного из трех типовых независимых экспериментов.

Note. B6 and SapD-ko female mice (9 animals per group) were aerosolized with a filtered *M. tuberculosis* (100 CFU/mouse). The survival of infected animals was monitored daily for 260 days after infection. The data of one of three typical independent experiments are shown.

ком и селезенке (рис. 1). В легких дефицитных по SapD мышей содержалось почти на порядок больше микобактерий, чем в легких мышей дикого типа как через двадцать один, так и через тридцать пять дней после заражения (рис. 1). Данное наблюдение свидетельствует о повышенной чувствительности лишенных SapD мышей к ТБ. В то же время содержание микобактерий в селезенке зараженных животных обеих групп через 21 день после заражения не различалось (рис. 1А). Через тридцать пять дней после инфицирования уровень микобактериальной нагрузки в селезенке мышей SapD-ko был достоверно выше, чем у мышей дикого типа (рис. 1Б). По-видимому, на ранней стадии (21 день после аэрозольного заражения низкой дозой) туберкулезной инфекции дефицит SapD не сказывается на темпах диссеминации микобактерий из легких.

Остальные мыши ($n = 9$ в группе) были оставлены для определения динамики выживания после заражения. Как показано на рис. 2, все дефицитные по гену SapD мыши погибли к 240 дню после инфекции, в то время как все животные контрольной группы дожили до 260 дня — времени окончания эксперимента

($p = 0,0057$). То есть дефицит SapD снижает способность мышей противостоять туберкулезной инфекции.

Анализ инфильтрации легочной ткани мышшей, аэрозольно инфицированных низкой дозой микобактерий, проводили через 21 и 35 дней после заражения. К 21 дню после инфицирования возрастает инфильтрация легочной ткани как у нокауты по SapD, так и у мышшей дикого типа (рис. 3Б, Д, III обложка). Однако, в отличие от нокауты, у В6 происходит формирование отграниченного очага инфекции (рис. 3Б, III обложка). Данные различия становятся более очевидными на 35 день после инфицирования. Из рис. 5 видно наличие сформированного структурированного очага (гранулемы) у мышшей дикого типа, в то время как у SapD-ko-животных гранулемы только формируются (рис. 3В, Е, III обложка).

Субпопуляционный анализ легочной ткани показал достоверные отличия в количестве Т-лимфоцитов CD4⁺ между группами как у «наивных», так и у инфицированных мышшей (рис. 4А). Так, через 21 день после заражения CD4⁺ Т-клеток было достоверно больше в легких мышшей В6, чем у мышшей-нокауты по SapD. Через 35 дней после инфицирования содержание CD4⁺ Т-лимфоцитов выравнивалось (рис. 4А). В соответствии с гистологическими наблюдениями количественная оценка популяций клеток, инфильтрирующих ткань легкого, показала меньшее количество макрофагов (клетки, несущие фенотип F4/80⁺) у неинфицированных мышшей SapD-ko в сравнении с животными дикого типа (В6) (рис. 4Б). Через 21 день после заражения низкой дозой *M. tuberculosis* в легких мышшей-нокауты по SapD и мышшей дикого типа определялось одинаковое количество F4/80⁺-клеток, а через 35 дней после инфицирования количество макрофагов у SapD-ko было выше, чем у мышшей дикого типа (рис. 4Б). Так же, как и при гистологическом окрашивании (рис. 3, III обложка), анализ данных, полученных методом проточной цитометрии, показал повышение нейтрофильной инфильтрации в тканях легких мышшей-нокауты по SapD по сравнению мышами В6 как через 21, так и через 35 дней после инфицирования (рис. 4В).

О содержании апоптотических клеток в легочной ткани подопытных мышшей судили по урону активности каспазы-3/7. Клетки легочной ткани интактных мышшей дикого типа и SapD-ko, мышшей не отличались по уровню активности каспазы-3/7. В то время как через 21 день после инфицирования активность каспазы-3/7 была достоверно выше в клетках легкого мышшей-нокауты, то есть в данной группе мышшей было достоверно большее количество апоптотических клеток легкого (рис. 5).

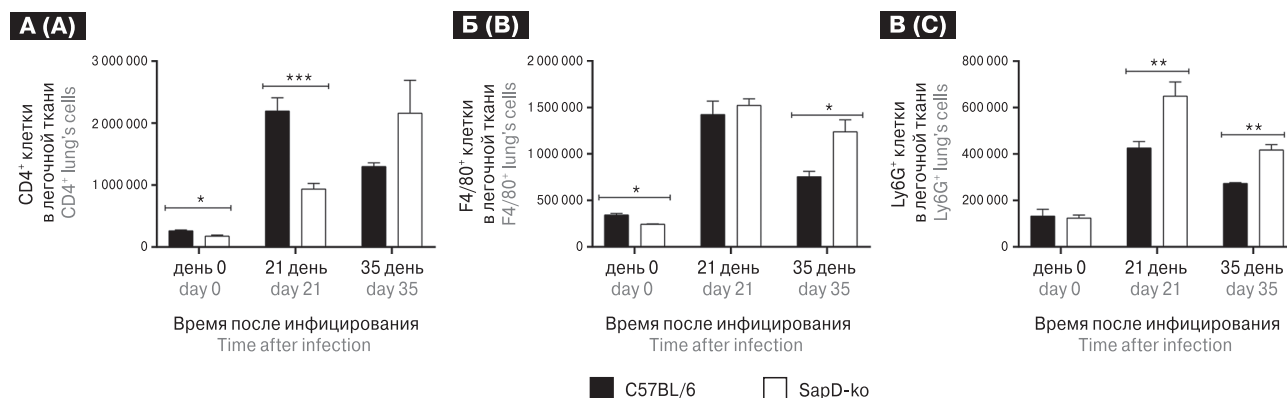


Рисунок 4. Характеристика поверхностных маркеров клеток легочной ткани SapD-ko и мышей дикого типа через 21 и 35 дней после заражения

Figure 4. Lung cell surface markers characterization of SapD-ko and wild-type mice at day 21 and day 35 post infection

Примечание. Мышей аэрозольно инфицировали вирулентным штаммом микобактерий. Клетки легкого SapD-ko и B6-мышей выделяли на 21 и 35 день после заражения, инкубировали с антителами CD4-PerCP (А), F4/80-PE (Б), Ly6G-FITC (В) и затем анализировали на проточном цитофлуориметре. На рисунке приведены данные одного из трех идентичных экспериментов ($M \pm SD$, $n = 5$ в группе). * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$; *** — $p < 0,0001$.

Note. Mice were infected with a virulent mycobacterium. SapD-ko and B6 mouse lung cells were isolated at day 21 and day 35 post infection, incubated with CD4-PerCP (A), F4/80-PE (B), Ly6G-FITC (B) antibodies and analyzed by flow cytometry. The data from one of three identical experiments are shown ($M \pm SD$, $n = 5$ per group). * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.001$; *** — $p < 0.0001$.

Обсуждение

SapD является наиболее распространенным сапозинном в нормальных тканях, где его концентрация в три раза выше, чем у других сапозиннов [13]. SapD способствует гидролизу церамида кислой церамидазой *in vivo*, о чем свидетельствует накопление α -гидроксил-церамида в почках и мозжечке мышей SapD-ko [11]. Соответственно, у животных с дефицитом SapD обнаруживаются дегенерация почечных канальцев и гидронефроз, а также прогрессирующая потеря клеток Пуркинье в мозжечке, что приводит к атаксии. До настоящего времени наследственный дефицит SapD у людей не выявлен.

Кислая среда лизосом резко увеличивает поверхностную гидрофобность SapD, тем самым позволяя положительно заряженным аминокислотам в нижней части SapD связаться с поверхностью интрализосомальных мембран, обогащенных отрицательно заряженными липидами. Затем верхняя часть SapD поворачивается на 180° вдоль своей оси, погружая таким образом его гидрофобные остатки в двуслойную мембрану и обращая положительно заряженные остатки к растворителю. Далее SapD возвращается к закрытой конформации, что формирует механистическую основу для экстирпации липидов из мембраны. В конечном итоге SapD покидает мембрану, унося связанный липид [15].

Главная функция Saps — участие в деградации сфинголипидов и мембран. Иными

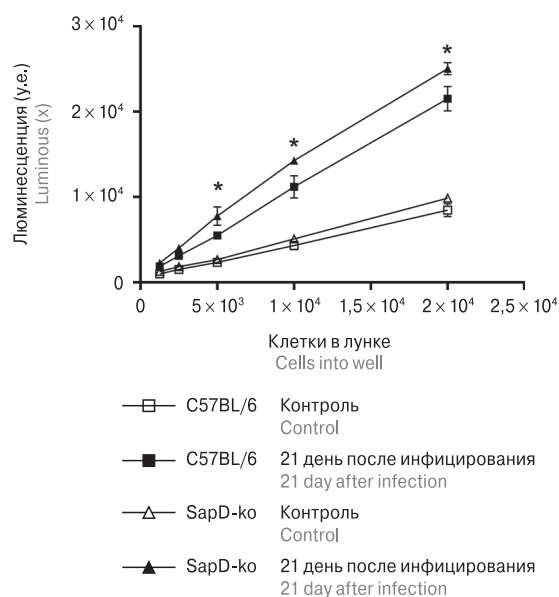


Рисунок 5. Клетки легочной ткани мышей SapD-ko сильнее подвержены апоптозу в сравнении с мышами дикого типа (по уровню активности каспазы-3/7)

Figure 5. SapD-ko mouse lung tissue cells are more prone to apoptosis compared to wild-type mice (assessed by level of caspase-3/7 activity)

Примечания. На рисунке приведены данные одного из трех идентичных экспериментов ($M \pm SD$, $n = 5$ в группе). * — $p < 0,05$.

Notes. The data from one of three identical experiments are shown ($M \pm SD$, $n = 5$ per group). * — $p < 0.05$.

словами Saps — непосредственные участники уничтожения внутриклеточных бактерий — способны бороться с микробами. Данная способность может быть ассоциирована со сдвигом катаболизма липидов либо непосредственно с бактерицидной способностью самих Saps (наши неопубликованные данные). В качестве подтверждения данной гипотезы можно рассматривать факт повышенной экспрессии SapC в казеозной туберкулеме человека [7]. В настоящей работе *in vivo*, на экспериментальной туберкулезной инфекции у мышей, была продемонстрирована повышенная чувствительность к ТБ у SapD-ко-животных в сравнении с мышами дикого типа. Так, продемонстрированы различия в бактериальной нагрузке селезенки и легочной ткани мышей SapD-ко и B6. Достоверно большее количество микобактерий высевалось из легочной ткани (через 21 и 35 дней после инфицирования *M. tuberculosis*) и селезенки (через 21 день после инфицирования) мышей SapD-ко в сравнении с группой контроля. Эти наблюдения согласуются с результатами наших предыдущих исследований о неспособности макрофагов от мышей SapD-ко эффективно подавлять микобактериальный рост в экспериментах *in vitro* [3], а также с наличием бактерицидной функции непосредственно у самого SapD (наши неопубликованные данные).

Также продемонстрированы достоверные отличия в длительности выживания инфицированных вирулентным штаммом мышей B6 и SapD-ко. Показано, что дефицит SapD снижает способность мышей противостоять ТБ инфекции. Мыши-нокауты по гену SAPD отличаются от животных дикого типа по степени образования воспалительных фокусов и по общему уровню инфильтрации в легочной ткани при экспериментальном ТБ. Так, для SapD-ко характерно достоверно большее количество макрофагов в легочной ткани на 35 день после

инфицирования большее содержание CD4⁺ Т-клеток на 21 день после заражения. Данные различия согласуются с невысокой бактерицидной и бактериостатической активностью SapD-ко-макрофагов. Продемонстрированы различия в инфильтрационном характере легочной ткани. Показано, что для мышей-нокаут по гену SAPD характерна более сильная инфильтрация легочной ткани нейтрофилами как через 21, так и через 35 дней после инфицирования. Разница в инфильтрации видна и по образованию очагов инфекции в легких. Так, у SapD-ко, в отличие от мышей дикого типа, формирование ТБ очагов инфекции начинается через 5 недель после заражения (рис. 3В, Е, III обложка). У мышей линии B6 ТБ очаги начинают формироваться к 3 неделе после заражения, а через 35 дней после инфицирования видны четко отграниченные фокусы ТБ воспаления (рис. 3Б, Д, III обложка). Для SapD-ко-животных в сравнении с мышами линии B6 продемонстрировано достоверно большее количество апоптотических клеток в легочной ткани на 21 день после инфицирования (рис. 5). Специфический механизм действия сапозина на интрализосомальные мембраны предположительно может быть использован для разрушения апоптотических везикул, расположенных в лизосомах, после фагоцитоза макрофагами или дендритными клетками. Возможно, фосфатидилхолин, входящий в состав мембраны апоптотических телец, осуществляет свою специфическую функцию внутри фагоцитов, а именно — выступает в роли молекулярной мишени для сапозина в лизосомах для облегчения разрушения апоптотических пузырьков.

Суммируя все вышеизложенное, можно заключить, что дефицит SapD при экспериментальной туберкулезной инфекции способствует существенному усилению процессов воспаления, а также положительно влияет на предрасположенность к апоптозу клеток, инфильтрирующих легкие зараженных *M. tuberculosis* мышей.

Список литературы/References

1. Авдиенко В.Г., Бабаян С.С., Гусева А.Н. Количественные, спектральные и серодиагностические характеристики антимикобактериальных IgG-, IgM- и IgA-антител у больных туберкулезом легких // Проблемы туберкулеза и болезни легких. 2006. Т. 10. С. 47–55. [Avdienko V.G., Babaian S.S., Guseva A.N. Quantitative, spectral, and serodiagnostic characteristics of antimycobacterial IgG, IgM, and IgA antibodies in patients with pulmonary tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh = Problems of Tuberculosis and Lung Diseases*, 2006, vol. 10, pp. 47–55. (In Russ.)]
2. Еремеев В.В., Апт А.С. Сапозин-подобные белки в противоинфекционном иммунном ответе // Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2, № 3. С. 597–602. [Yeremeev V.V., Apt A.S. Saposin-like proteins in anti-infectious immune response. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2012, vol. 2, no. 3, pp. 597–602. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2012-3-597-602
3. Шепелькова Г.С., Евстифеев В.В., Эргешов А.Э., Еремеев В.В. Влияние сапозина D на бактериостатическую функцию макрофагов при экспериментальной туберкулезной инфекции // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 473–480. [Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Ergeshov A.E., Yeremeev V.V. Saposin D acting on macrophage bacteriostatic function in experimental tuberculosis infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 473–480. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-TEO-1386
4. Garrido-Arandia M., Cuevas-Zuñiga B., Diaz-Perales A., Pacios L. A comparative study of human saposins. *Molecules*, 2018, vol. 23: 422. doi: 10.3390/molecules23020422

5. Gebai A., Gorelik A., Nagar B. Crystal structure of saposin D in an open conformation. *J. Struc. Biol.*, 2018, vol. 204, no. 2, pp. 145–150. doi: 10.1016/j.jsb.2018.07.011
6. Huang L., Nazarova E.V., Russell D.G. Mycobacterium tuberculosis: bacterial fitness within the host macrophage. *Microbiol Spectr.*, 2019, vol. 7, no. 2: 10. doi: 10.1128/microbiolspec.BAI-0001-2019
7. Kim M.-J., Wainwright H., Loketz M., Bekker L.G., Walther G.B., Dittrich C., Visser A., Wang W., Hsu F.F., Wiewhart U., Tsenova L., Kaplan G., Russell D.G. Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO Mol. Med.*, 2010, vol. 2, pp. 258–274. doi: 10.1002/emmm.201000079
8. Kishimoto Y., Hiraiwa M., O'Brien J.S. Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. *J. Lipid. Res.*, 1992, vol. 33, no. 9, pp. 1255–1267.
9. Khan A., Singh V.K., Hunter R.L., Jagannath C. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis. *J. Leukoc. Biol.*, 2019, vol. 106, no. 2, pp. 275–282. doi: 10.1002/JLB.MR0318-095RR
10. Kolter T., Sandhoff K. Lysosomal degradation of membrane lipids. *FEBS Lett.*, 2010, vol. 584, pp. 1700–1712. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.021
11. Matsuda J., Kido M., Tadano-Aritomi K., Ishizuka I., Tominaga K., Toida K., Takeda E., Suzuki K., Kuroda Y. Mutation in saposin D domain of sphingolipid activator protein gene causes urinary system defects and cerebellar Purkinje cell degeneration with accumulation of hydroxy fatty acid-containing ceramide in mouse. *Hum. Mol. Genet.*, 2004, vol. 13, no. 21, pp. 2709–2723. doi: 10.1093/hmq/ddh281
12. Nikonenko B.V., Averbakh M.M. Jr, Lavebratt C., Schurr E., Apt A.S. Comparative analysis of mycobacterial infections in susceptible I/St and resistant A/Sn inbred mice. *Tuber. Lung Dis.*, 2000, vol. 80, no. 1, pp. 15–25. doi: 10.4049/jimmunol.165.10.5921
13. O'Brien J.S., Kishimoto Y. Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. *FASEB J.*, 1991, vol. 5, pp. 301–308. doi: 10.1096/fasebj.5.3.2001789
14. Olmeda B., García-Álvarez B., Pérez-Gil J. Structure–function correlations of pulmonary surfactant protein SP-B and the saposin-like family of proteins. *Eur. Biophys. J.*, 2013, vol. 42, pp. 209–222. doi: 10.1007/s00249-012-0858-9
15. Rossmann M., Schultz-Heienbrok R., Behlke J., Rimmel N., Alings C., Sandhoff K., Saenger W., Maier T. Crystal structures of human saposins C and D: implications for lipid recognition and membrane interactions. *Structure*, 2008, vol. 16, pp. 809–817. doi: 10.1016/j.str.2008.02.016
16. Shepelkova G., Evstifeev V., Majorov K., Bocharova I., Apt A. Therapeutic effect of recombinant mutated interleukin 11 in the mouse model of tuberculosis. *J. Infect. Dis.*, 2016, vol. 214, no. 3, pp. 496–501. doi: 10.1093/infdis/jiw176
17. Weiss G., Schaible U.E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev.*, 2015, vol. 264, no. 1, pp. 182–203. doi: 10.1111/immr.12266
18. Winau F., Schwierzeck V., Hurwitz R., Rimmel N., Sieling P.A., Modlin R.L., Porcelli S.A., Brinkmann V., Sugita M., Sandhoff K., Kaufmann S.H., Schaible U.E. Saposin C is required for lipid presentation by human CD1b. *Nat. Immunol.*, 2004, vol. 5, no. 2, pp. 169–174. doi: 10.1038/ni1035
19. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2021. URL: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>

Авторы:

Шепелькова Г.С., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии отдела иммунологии ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;

Евстифеев В.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии отдела иммунологии ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;

Авдиенко В.Г., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии отдела иммунологии ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;

Бочарова И.В., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;

Еремеев В.В., д.м.н., зав. отделом иммунологии ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия.

Authors:

Shepelkova G.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Biotechnology, Department of Immunology, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Evstifeev V.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Biotechnology, Department of Immunology, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Avdienko V.G., Senior Researcher, Laboratory for Biotechnology, Department of Immunology, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Bocharova I.V., Researcher, Department of Immunology, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Yermeev V.V., DSc (Medicine), Head of the Department of Immunology, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 14.09.2022
Отправлена на доработку 11.02.2023
Принята к печати 28.03.2023

Received 14.09.2022
Revision received 11.02.2023
Accepted 28.03.2023

**Иллюстрации к статье «Влияние сапозина D на течение туберкулезной инфекции у мышей»
(авторы: Г.С. Шепелькова, В.В. Евстифеев, В.Г. Авдиенко, И.В. Бочарова, В.В. Еремеев) (с. 439–445)**

Illustrations for the article “The effect of saposin D on the anti-tuberculosis immune response in experimental tuberculosis infection” (authors: Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Avdienko V.G., Bocharova I.V., Yeremeev V.V.) (pp. 439–445)

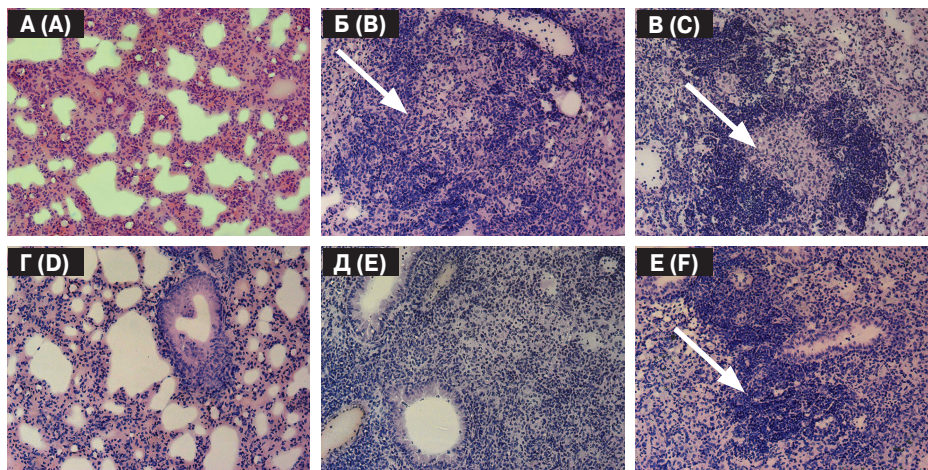


Рисунок 3. Гистологическая картина специфического воспаления в легких мышей В6 дикого типа (А–В) и SapD-ko (Г–Е) через 21 (Б, Д) и 35 дней (В, Е) после инфицирования низкой дозой *M. tuberculosis* (100 КОЕ/мышь)

Figure 3. Histological pattern of B6 wild-type (A–C) and SapD-ko (D–F) mouse specific inflammation in the lungs at day 21 (B, E) and day 35 (C, F) post low dose of *M. tuberculosis* (100 CFU/mouse) infection

Примечание. На срезах средней правой доли легкого, окрашенных гематоксилином и эозином, исследовали зоны туберкулезного воспаления при увеличении $\times 100$. А — срез легкого «наивных» В6; Г — срез легкого наивных SapD-ko. Стрелками показаны места формирования гранулем.

Note. The TB inflammation zones were examined on the lung middle right lobe sections stained with hematoxylin and eosin (magnification is $\times 100$). A — a “naive” B6 lung’s section; D — a “naive” section SapD-ko lung’s section. Arrows show the sites of granuloma formation.