

Особенности локализации FAP-положительных активированных стромальных клеток при фиброзе у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19

© Н.В. ДАНИЛОВА¹, Н.А. БАСАЛОВА¹, Н.А. ОЛЕЙНИКОВА¹, Е.И. КЕЛЛИ², О.В. ЗАЙРАТЬЯНЦ³, А.Ю. ЕФИМЕНКО¹

¹Медицинский научно-образовательный институт МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия;

³ФГБОУ ВО Российский университет медицины Минздрава России, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Оценить представленность и локализацию FAP-положительных активированных стромальных клеток в зависимости от выраженности фиброзных изменений в тканях у пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19.

Материал и методы. Изучено 20 наблюдений умерших от COVID-19. Иммуногистохимическое исследование проведено с использованием антител к CD90, FAP и aSMA и двойной системы визуализации. Степень выраженности фиброза в легочной ткани оценивали по шкале R.Hubner (2008).

Результаты. FAP-положительные клетки определяются в легких, почках, печени и миокарде, при этом в легких его экспрессия ассоциирована с фибротическими измененными участками ткани. Экспрессию FAP различной интенсивности наблюдали в кровеносных капиллярах, альвеолярном и бронхиальном эпителии, а также в фиброзных узелках в легких, где она частично локализуется совместно с ключевым маркером миофибробластов aSMA. В фиброзных фокусах преимущественно обнаруживали и CD90-позитивные стромальные клетки.

Заключение. Полученные результаты позволяют уточнить локализацию активированных стромальных предшественников в тканях человека при повреждении и предположить важную роль FAP в формировании фиброзных фокусов и прогрессировании фиброзных изменений в тканях, в первую очередь легких, что делает его возможной перспективной фармацевтической мишенью для терапии заболеваний, связанных с развитием фиброза.

Ключевые слова: фиброз, активированные стромальные клетки, белок активации фибробластов альфа (FAP), миофибробласты, фиброзный фокус, COVID-19.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Данилова Н.В. — <https://orcid.org/0000-0001-7848-6707>

Басалова Н.А. — <https://orcid.org/0000-0002-2597-8879>

Олейникова Н.А. — <https://orcid.org/0000-0001-8564-8874>

Келли Е.И. — <https://orcid.org/0009-0000-2718-9462>

Зайратьянц О.В. — <https://orcid.org/0000-0003-3606-3823>

Ефименко А.Ю. — <https://orcid.org/0000-0002-0696-1369>

Автор, ответственный за переписку: Данилова Н.В. — e-mail: natalyadanilova@gmail.com

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Данилова Н.В., Басалова Н.А., Олейникова Н.А., Келли Е.И., Зайратьянц О.В., Ефименко А.Ю. Особенности локализации FAP-положительных активированных стромальных клеток при фиброзе у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19. *Архив патологии.* 2024;86(6):5–14. <https://doi.org/10.17116/patol2024860615>

Localization features of FAP-positive activated stromal cells in fibrosis in patients with new coronavirus infection COVID-19

© N.V. DANILOVA¹, N.A. BASALOVA¹, N.A. OLEYNIKOVA¹, E.I. KELLY², O.V. ZAYRATIANTS³, A.YU. EFIMENKO¹

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

²Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1, Moscow, Russia;

³Russian University of Medicine, Russia, Moscow

ABSTRACT

Objective. To evaluate the representation and localization of FAP-positive activated stromal cells depending on the severity of fibrotic changes in tissues of patients with a confirmed diagnosis of COVID-19.

Material and methods. 20 autopsy observations of patients who died from COVID-19 were studied. Immunohistochemical studies were performed using antibodies to CD90, FAP and aSMA and a dual imaging system. The severity of fibrosis in lung tissue was assessed according to the R.Hubner scale (2008).

Results. FAP-positive cells are detected in the lungs, kidneys, liver and myocardium, while only in the lungs FAP expression is associated with fibrotic tissue areas. FAP expression of varying intensity was observed in capillaries, alveolar and bronchial

epithelium, as well as in fibrotic nodules in the lungs, where it partially colocalizes with the key myofibroblast marker α SMA. CD90-positive stromal cells were also predominantly found in fibrotic foci.

Conclusion. The results obtained allow us to clarify the localization of activated stromal precursors in human tissues during injury and suggest an important role of FAP in the formation of fibrotic foci and the progression of fibrotic changes in tissues, primarily the lungs, which makes it a promising pharmaceutical target for the treatment of diseases associated with the development of fibrosis.

Keywords: fibrosis, activated stromal cells, fibroblast activation protein alpha (FAP), myofibroblasts, fibrotic focus, COVID-19

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Danilova N.V. — <https://orcid.org/0000-0001-7848-6707>

Basalova N.A. — <https://orcid.org/0000-0002-2597-8879>

Oleynikova N.A. — <https://orcid.org/0000-0001-8564-8874>

Kelly E.I. — <https://orcid.org/0009-0000-2718-9462>

Zayratiants O.V. — <https://orcid.org/0000-0003-3606-3823>

Efimenko A.Yu. — <https://orcid.org/0000-0002-0696-1369>

Corresponding author: Danilova N.V. — e-mail: natalyadanilova@gmail.com

TO CITE THIS ARTICLE:

Danilova NV, Basalova NA, Oleynikova NA, Kelly EI, Zayratiants OV, Efimenko AY. Localization features of FAP-positive activated stromal cells in fibrosis in patients with new coronavirus infection COVID-19. *Russian Journal of Archive of Pathology*. 2024;86(6):5–14. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol2024860615>

Развитие фиброза в виде замещения функциональной ткани пораженного органа соединительной тканью и как следствие утрата специфических функций органа вплоть до полной дисфункции (например, развитие дыхательной недостаточности при фиброзе легких) и летального исхода является достаточно частым неблагоприятным исходом репаративной регенерации у человека [1]. По современным данным [2], более 50% смертельных исходов во всем мире так или иначе связаны с фибротическими заболеваниями, причем эта цифра только увеличивается. Поэтому изучение клеточных и молекулярных механизмов фиброза с целью поиска эффективных способов профилактики его развития, а также полного или частичного разрешения с восстановлением функции поврежденных тканей является очень актуальной задачей.

Основными эффекторными клетками фиброза считаются миофибробласты, которые формируют фиброзные фокусы (**fibrotic foci**) — морфофункциональные единицы патологического фиброза, представляющие собой плотные отложения внеклеточного матрикса (ВКМ), в котором находятся синтетически активные миофибробласты [3, 4]. Пролиферативная и миграционная активность клеток стромы выражена по периферии фокуса, образуя инвазивный фронт, обеспечивающий прогрессию фиброза, что во многом напоминает рост и инвазию злокачественных опухолей. Такие фокусы описаны в легких, почках, коже и некоторых других органах [1, 5–7]. В формировании фиброзных фокусов и прогрессии фиброза важное значение, по последним данным [8], могут иметь не только фибробласты, но и другие типы клеток, активация которых при повреждении тканей и развитии хронического воспаления сопровождается появлением экспрессии белка активации фибробластов альфа (**fibroblast activation protein alpha**, **FAP**) и приводит к пополнению пула миофибробластов. Этот же маркер описан для фибробластов, ассоциированных с опухолью (**cancer-associated fibroblast**, **CAF**), роль которых хорошо изучена в канцерогенезе, однако крайне мало известно о роли **FAP**-положительных стромальных клеток в развитии фиброза.

Перспективным для изучения этих процессов объектом является развивающийся на фоне воздействия вируса

SARS-CoV-2 фиброз легких, также сопровождающийся наличием разрастающихся фиброзных фокусов, замещающих функциональную ткань легкого. Несмотря на то, что этиологические факторы и степень тяжести фиброза могут быть разными, значительное количество данных указывает на сходные патофизиологические механизмы, лежащие в основе развития фиброза легких, а также других органов (почек, сердца, печени, кожи). В ряде источников литературы показано, что увеличение экспрессии **FAP** напрямую коррелирует с тяжестью фибротизирующих заболеваний легких, относящихся к группе интерстициальных заболеваний легких [9]. Однако следует отметить, что в большинстве случаев такие заболевания носят необратимый, а зачастую и неуклонно прогрессирующий характер, в то время как для фиброза, являющегося последствием воздействия вирусов **SARS**, показана возможность обратимости фиброзных процессов [10]. Поскольку субпопуляции **FAP**-положительных клеток, по-видимому, могут выступать в качестве регуляторов, определяющих смещение течения фиброза в сторону как прогрессии, так и реверсии, изучение аутопсийного материала от пациентов с подтвержденной коронавирусной инфекцией может стать уникальным источником информации о роли этих клеток в фиброгенезе.

Таким образом, цель исследования — оценить на аутопсийном материале умерших с подтвержденным диагнозом **COVID-19** представленность и локализацию **FAP**-положительных активированных стромальных клеток в зависимости от выраженности фиброзных изменений в тканях.

Материал и методы

Материал предоставлен из патолого-анатомического отделения ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1» Департамента здравоохранения города Москвы (ДЗМ) по согласованию с главным внештатным специалистом по патологической анатомии ДЗМ проф. О.В. Заирятыным.

В работе использованы образцы тканей (миокард, легкое, печень, почка, крупный артериальный сосуд) от 20 ау-

Таблица 1. Клинико-морфологические характеристики пациентов**Table 1.** Clinical and morphologic characteristics of patients

Возраст, годы	Пол	Длительность процесса, дни	Морфологическая стадия диффузного альвеолярного повреждения
67	Ж	18	Продуктивная
50	М	7	Экссудативная
57	М	5	»
52	М	15	»
59	М	19	Продуктивная
47	М	17	Экссудативная
64	М	28	Продуктивная
79	М	12	»
62	М	12	Экссудативная
63	М	5	»
47	М	5	»
80	Ж	15	»
56	Ж	13	»
57	М	14	»
94	М	5	»
79	Ж	5	»
60	Ж	14	»
77	М	9	»
68	Ж	13	»
58	М	10	»

топсийных (6 женщин и 14 мужчин) наблюдений (табл. 1) умерших от инфекции COVID-19, подтвержденной выявлением вируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции. Образцы фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине в течение 24–48 ч в после забора материала. Гистологическая проводка осуществлялась по стандартной методике. С парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3–4 мкм, которые монтировали на предметные стекла (Menzel GmbH & Co KG, Германия). Окрашивание проводили по стандартной методике с использованием гематоксилина Майера и эозина (Pan-Reac AppliChem, Испания). Для выявления степени фиброзных изменений выполняли окраску пикрофуксином по Ван Гизону (Биовитрум, Россия). Препараты изучали под световым микроскопом Leica DM LB2.

Иммуногистохимическое исследование проведено в автоматическом режиме в автопейнере BOND-III по принципу параллельного окрашивания. Использовали две пары антител: кроличьи моноклональные антитела к CD90/Thy-1 (Epitomics, клон EP56, 1:100) в паре с мышиными моноклональными антителами к SMA (Bond, клон asm-1, RTU) и кроличьи моноклональные антитела к FAP (Hua-bio, клон JA56—11, 1:100) в паре с мышиными моноклональными антителами к SMA (Bond, клон asm-1, RTU). Депарафинирование осуществляли в автоматическом режиме с помощью Bond Dewax Solution, демаскировку антигенов — при помощи раствора для высокотемпературной демаскировки Bond Epitope Retrieval-2. В качестве системы детекции использовали небиотинную двойную систему Bond ChromoPlex I Dual с двумя хромогенами: DAB и Fast Red.

В каждой серии препаратов применяли соответствующие положительные и отрицательные контроли. Сте-

пень выраженности фиброза в легочной ткани оценивали по шкале R.Hubner, 2008 [11].

Результаты

Морфологические изменения в легких варьировали в широких пределах. В 16 случаях в легких наблюдалась экссудативная стадия диффузного альвеолярного повреждения (ДАП), в 4 наблюдениях — продуктивная стадия ДАП. В 6 образцах выявлены отек, мелкие кровоизлияния, слабая лимфогистиоцитарная инфильтрация легочной ткани, полнокровие кровеносных сосудов, десквамация альвеолярного и бронхиального эпителия. Фиброзных изменений не выявлено (Grade 0 по R.Hubner). В большинстве случаев (10 наблюдений) установлены слабая лимфогистиоцитарная инфильтрация легочной ткани, полнокровие кровеносных сосудов, слабые фиброзные изменения в виде изолированных альвеолярных перегородок с легкими фиброзными изменениями и фиброзных изменений альвеолярных перегородок с формированием фиброзных узелков (Grade 1, 2 по R.Hubner). В 4 образцах выявлены полнокровие кровеносных сосудов и умеренные фиброзные изменения в виде сливающихся очагов фиброза (Grade 5 по R.Hubner). Помимо описанных изменений, в легких у всех пациентов наблюдали разную степень диффузного альвеолярного повреждения. Изменения в печени варьировали от отсутствия фиброза до цирроза. Изменения в сердце у подавляющего большинства пациентов характеризовались наличием соединительной ткани вокруг сосудисто-нервных пучков с единичными фиброзными септами среди кардиомиоцитов и лишь в 2 наблюдениях были представлены диффузным кардиосклерозом. В почках лишь в 1 случае наблюдались выраженные фиброзные изменения с наличием полостей соединительной ткани вокруг канальцев и собирательных трубочек. Изменения были более выражены в мозговом веществе. Большинство почечных клубочков сохранно, единичные клубочки с фиброзным замещением.

Экспрессия FAP и CD90 в тканях миокарда, печени и почек

Экспрессия FAP в миокарде у всех 20 пациентов ограничивалась эндотелием сосудов и не наблюдалась даже в участках кардиосклероза (рис. 1, а, б). В ткани печени в 3 случаях регистрировалась слабая экспрессия FAP в эндотелии синусоидов (рис. 1, г, д), при этом в 2 отмечен выраженный фиброз печени с капилляризацией синусоидов, но без экспрессии FAP. В почках в половине наблюдений (10 случаев) наблюдалась экспрессия FAP в капиллярах клубочков, в зонах фиброза реакция отсутствовала (рис. 2, а, б). В ткани крупных артериальных сосудов в зоне фиброзных атеросклеротических бляшек отмечалась выраженная положительная экспрессия FAP у 6 пациентов из 18 (рис. 2, г, д). На остальном протяжении в ткани неизмененных сосудов реакция с FAP отсутствовала.

Экспрессия CD90 встречалась значительно реже. В отличие от FAP в тканях миокарда и печени экспрессия CD90 отсутствовала у всех пациентов (рис. 1, в, е). В ткани почки слабая экспрессия CD90 наблюдалась в капиллярах клубочков у 1 пациента и умеренная — в эпителии извитых канальцев у 3 пациентов (рис. 2, в). В остальных случаях реакция в ткани почки отсутствовала. Интересны ре-

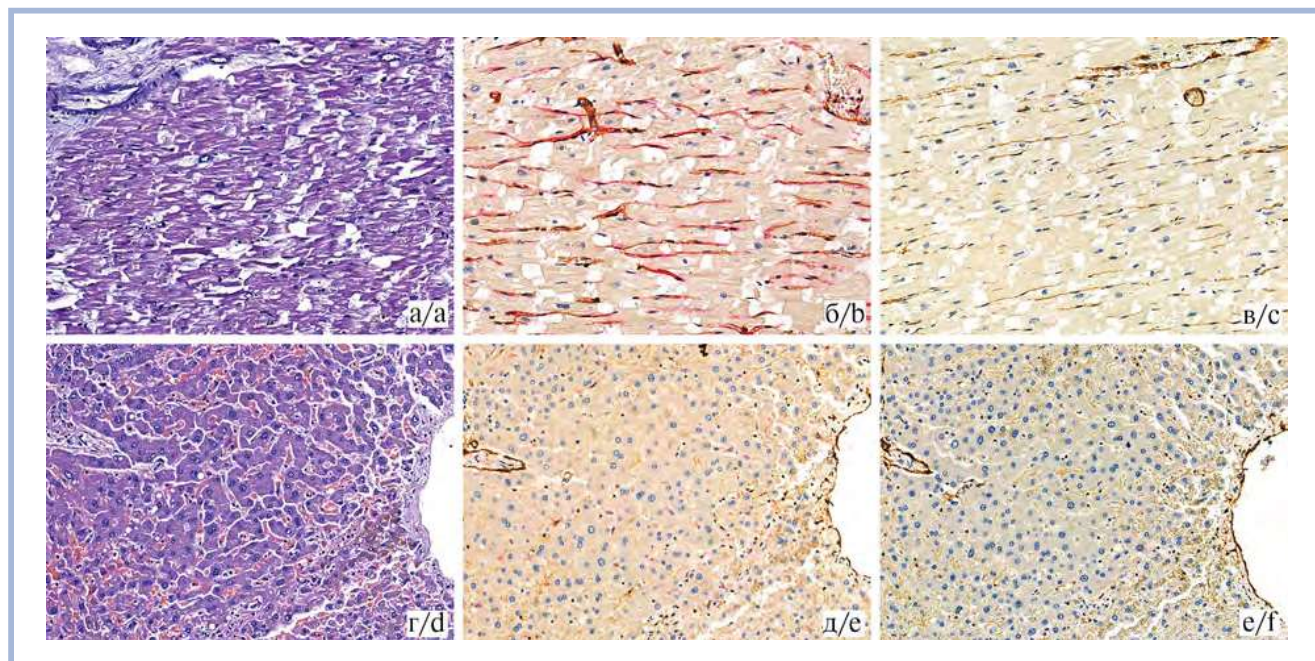


Рис. 1. Экспрессия FAP, CD90 и aSMA в ткани миокарда и печени у больных Covid-19.

а, б, в — ткань миокарда; б — яркая положительная экспрессия FAP в эндотелии капилляров миокарда и положительная экспрессия aSMA в сосудах мышечного типа; в — отсутствие экспрессии CD90 в эндотелии капилляров миокарда и положительная экспрессия aSMA в сосудах мышечного типа; г, д, е — ткань печени, д — слабая экспрессия FAP в эндотелии синусоидов печени и положительная экспрессия aSMA в сосудах мышечного типа; е — отсутствие экспрессии CD90 в эндотелии синусоидов печени и положительная экспрессия aSMA в сосудах мышечного типа.

а, г — окраска гематоксилином и эозином; б, д — иммуногистохимическая реакция с антителами к FAP; в, е — иммуногистохимическая реакция с антителами к CD90. ×200.

Fig. 1. Expression of FAP, CD90 and aSMA in myocardial and liver tissue in patients with Covid19.

а, b, c — myocardial tissue; b — positive expression of FAP in the endothelium of myocardial capillaries and positive expression of aSMA in muscular vessels; c — lack of CD90 expression in the endothelium of myocardial capillaries and positive expression of aSMA in muscular vessels; d, e, f — liver tissue, e — weak expression of FAP in the endothelium of liver sinusoids and positive expression of aSMA in muscular vessels; f — lack of CD90 expression in the endothelium of liver sinusoids and positive expression of aSMA in muscular vessels.

а, d — H&E; b, e — immunohistochemical reaction with antibodies to FAP; c, f — immunohistochemical reaction with antibodies to CD90. ×200.

зультаты по экспрессии CD90 в крупных кровеносных сосудах. В зоне атеросклеротического фиброза выявлялась умеренная экспрессия CD90, причем в 4 случаях из 6 данная экспрессия во всех наблюдениях была колокализована с FAP (рис. 2, д, е).

Экспрессия FAP и CD90 в ткани легкого

Изменения в легких у большинства пациентов (11 наблюдений) ограничивались слабой или умеренной экспрессией FAP в клетках десквамированного альвеолярного и бронхиального эпителия (экссудативная фаза диффузного альвеолярного повреждения), а также кровеносных капиллярах. Интенсивная реакция с FAP в клетках десквамированного альвеолярного и бронхиального эпителия наблюдалась у 4 пациентов (рис. 3, а–е). В 3 наблюдениях с умеренной степенью фиброза по R. Hubner, выявленной при окраске по Ван Гизону, в просвете альвеол обнаруживалась фибробластическая полиповидная ткань (продуктивная стадия диффузного альвеолярного повреждения), состоящая из клеток, экспрессирующих FAP, CD90 и aSMA, а в 1 случае наблюдались фиброзные узелки.

В одном образце легкого наряду со слабой экспрессией в капиллярах и умеренной экспрессией в десквамиро-

ванных клетках эпителия определялась яркая экспрессия FAP-положительных клеток в зоне периваскулярного фиброза, ассоциированной с отложением угольного пигмента (рис. 3, ж–и), который не имеет отношения к новой коронавирусной инфекции и, вероятно, присутствовал в ткани легкого до нее. Причем в данном очаге отсутствовали CD90-положительные и aSMA-положительные клетки.

Экспрессия CD90 встречалась реже, чем FAP, только в 2 наблюдениях (у пациентов с умеренным фиброзом по R. Hubner) обнаружена положительная реакция CD90 в фиброзных узелках.

При сравнительном анализе экспрессии FAP и CD90 в ткани легких в зависимости от степени фиброза по R. Hubner (табл. 2) выявлено, что при отсутствии фиброза экспрессия FAP наблюдалась лишь в кровеносных сосудах капиллярного типа и клетках альвеолярного эпителия, причем выраженность этой экспрессии не зависела от степени фиброза. В случаях со слабым и умеренным фиброзом по R. Hubner также выявлена экспрессия в кровеносных сосудах капиллярного типа, клетках альвеолярного и бронхиального эпителия различной интенсивности, а также обнаружены фиброзные узелки, содержащие aSMA-положительные, FAP-положительные и CD90-положительные клетки. Экспрессия CD90 в капиллярах легких отсутствовала и определялась лишь в составе мелких фиброзных фокусов, структура которых будет описана ниже.

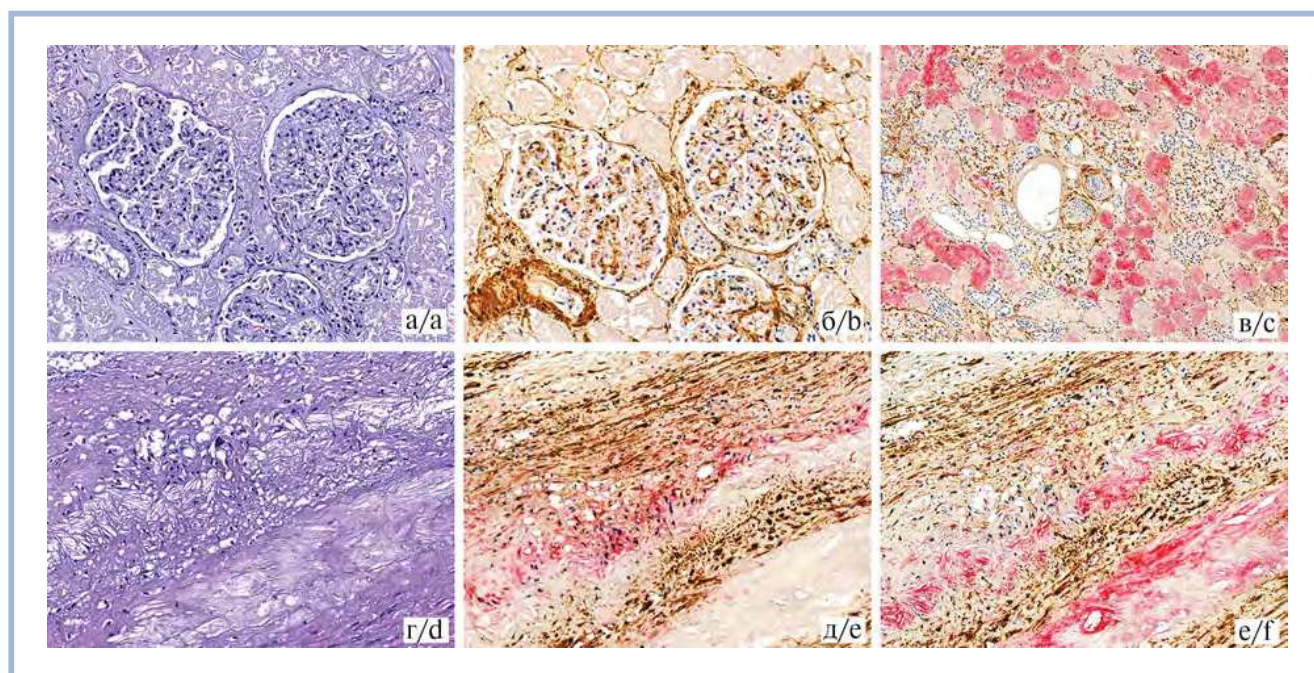


Рис. 2. Экспрессия **FAP**, **CD90** и **aSMA** в ткани почки и крупных артериальных сосудах у больных **Covid-19**.

а, б, в — ткань почки; б — слабая положительная экспрессия **FAP** в капиллярах почечных клубочков и положительная экспрессия **aSMA** в сосудах мышечного типа, а также мезангии и стромальных клетках; в — экспрессия **CD90** в эпителии извитых канальцев почки и положительная экспрессия **aSMA** в сосудах мышечного типа, а также мезангии и стромальных клетках; г, д, е — ткань крупного артериального сосуда в зоне атеросклеротической бляшки; д — экспрессия **FAP** в зоне атеросклеротической бляшки и положительная экспрессия **aSMA** в гладкомышечных клетках; е — выраженная экспрессия **CD90** в зоне атеросклеротической бляшки и положительная экспрессия **aSMA** в гладкомышечных клетках.

а, г — окраска гематоксилином и эозином; б, д — иммуногистохимическая реакция с антителами к **FAP**; в — иммуногистохимическая реакция с антителами к **CD90**; е — иммуногистохимическая реакция с антителами к **CD90**. а, б, г—е — $\times 200$, в — $\times 100$.

Fig. 2. Expression of **FAP**, **CD90** and **aSMA** in kidney tissue and large arterial vessels in patients with **Covid19**.

а, б, с — kidney tissue; б — weak positive expression of **FAP** in the capillaries of the renal glomeruli and positive expression of **aSMA** in muscular-type vessels, as well as mesangium and stromal cells; с — expression of **CD90** in the epithelium of the renal convoluted tubules and positive expression of **aSMA** in muscular-type vessels, as well as mesangium and stromal cells; д, е, f — tissue of a large arterial vessel in the area of an atherosclerotic plaque, е — expression of **FAP** in the area of an atherosclerotic plaque and positive expression of **aSMA** in smooth muscle cells; f — prominent expression of **CD90** in the atherosclerotic plaque zone and positive expression of **aSMA** in smooth muscle cells.

а, д — H&E; б, е — immunohistochemical reaction with antibodies to **FAP**; с, f — immunohistochemical reaction with antibodies to **CD90**. а, б, д — $\times 200$, с — $\times 100$.

Структура типичного фиброзного фокуса в легком

Очаги фибробластической полиповидной ткани были образованы преимущественно **aSMA**-позитивными и **FAP**-позитивными веретеновидными клетками, располагающимися в основном на периферии фокуса. Клетки удлиненные, с многочисленными отростками, иногда звездчатой формы. В центре такого фокуса располагаются ярко окрашенные **FAP**-позитивные клетки, причем в части этих клеток два маркера (**aSMA** и **FAP**). **CD90**-позитивные клетки также располагались внутри фиброзных фокусов, однако количество их было меньше и не наблюдалась колокализация с **aSMA** (рис. 4). Фиброзные узелки в легком имели похожее строение с очагами фибробластической полиповидной ткани (рис. 5).

Обсуждение

При выраженном или длительно воздействующем повреждении в тканях может начать развиваться ряд патологических состояний, включая хроническое воспаление, фиброз с появлением фиброзных фокусов и опухолевая трансформация. При изучении патогенеза фиброза в последнее

время пристальное внимание ученых направлено не только на миофибробласты как общепризнанные участники фиброзных процессов в разных тканях, но и на их предшественников, так называемые активированные стромальные клетки, экспрессирующие **FAP**. Показано, что эти клетки наряду с **aSMA**-позитивными миофибробластами входят в состав фиброзных фокусов при фиброзе легких и некоторых других органов — сердца, печени, поджелудочной железы, молочной железы [12]. В последние несколько лет роль **FAP** активно изучается в патогенезе заболеваний фиброзирующей природы. Было показано, что количество **FAP**-позитивных клеток в интерстиции легких существенно увеличивается при идиопатическом легочном фиброзе и силикозе, при этом высказано предположение, что именно эти клетки отвечают за локальное ремоделирование ВКМ, которое приводит к повреждению эпителия и возникновению новых фиброзных очагов [13, 14]. **FAP**-позитивные клетки также находятся в зоне инфаркта и ремоделирования ткани рядом с зоной инфаркта, а также в атеросклеротических бляшках [15, 16]. Описано их появление при повреждении тканей и в других органах.

Для изучения особенностей локализации **FAP**-позитивных клеток в тканях человека при развитии

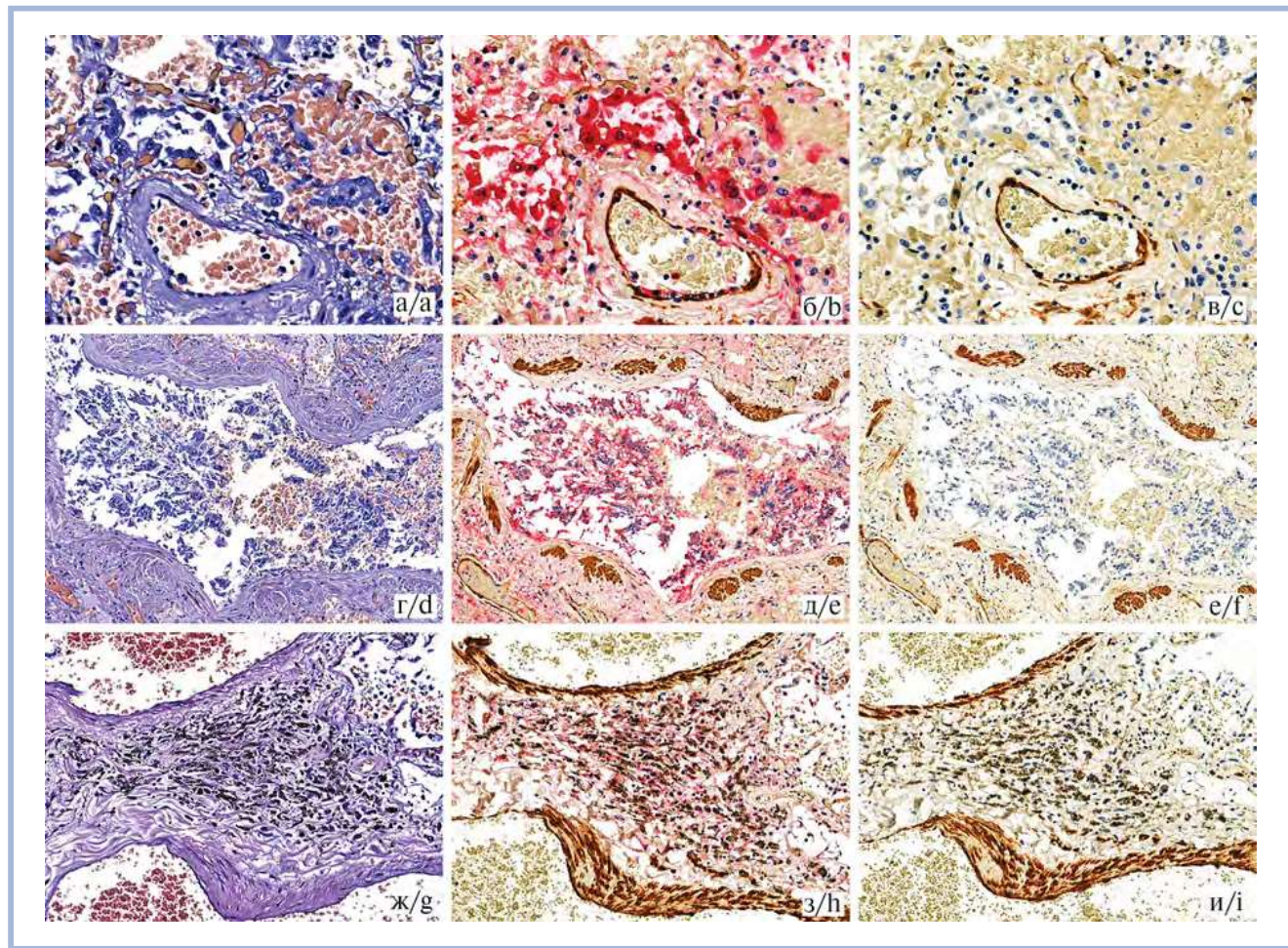


Рис. 3. Экспрессия FAP и CD90 в ткани легкого у больных Covid-19.

а — ткань легкого с выраженным полнокровием кровеносных сосудов, десквамацией клеток альвеолярного эпителия в виде слоев (экссудативная фаза диффузного альвеолярного повреждения); б — яркая положительная экспрессия FAP в эндотелии капилляров, а также десквамированных клетках бронхиального и альвеолярного эпителия; в — отсутствие экспрессии CD90 в ткани легкого; г — крупный бронх с десквамацией эпителиальной выстилки; д — положительная экспрессия FAP в клетках бронхиального эпителия; е — отсутствие экспрессии CD90 в клетках бронхиального эпителия; ж — очаг фиброза, ассоциированный отложением угольного пигмента; з — положительная экспрессия FAP в зоне фиброза; и — отсутствие экспрессии CD90 в зоне фиброза;

а, г, ж — окраска гематоксилином и эозином; б, д, з — иммуногистохимическая реакция с антителами к FAP; в, е, и — иммуногистохимическая реакция с антителами к CD90.

а—в — $\times 400$; г—е — $\times 150$; ж—и — $\times 200$.

Fig. 3. Expression of FAP and CD90 in lung tissue from patients with Covid19.

а — lung tissue with prominent vascular congestion, desquamation of alveolar epithelial cells (exudative phase of diffuse alveolar damage); б — bright positive expression of FAP in the capillary endothelium, as well as desquamated cells of the bronchial and alveolar epithelium; в — lack of expression of CD90 in lung tissue; д — large bronchus with desquamation of the epithelial lining, е — positive expression of FAP in bronchial epithelial cells; ф — lack of expression of CD90 in bronchial epithelial cells; г, h, i — focus of fibrosis associated with dust accumulation, h — positive expression of FAP in the fibrosis zone, i — lack of expression of CD90 in the fibrosis zone.

а, d, g — H&E, б, e, h — immunohistochemical reaction with antibodies to FAP, c, f, i — immunohistochemical reaction with antibodies to CD90.

а — c — $\times 400$, d — f — $\times 150$, g — i — $\times 200$.

фиброза в рамках данного исследования мы использовали коллекцию образцов зафиксированных тканей легких, почек, печени, а также миокарда и крупной артерии 20 пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19. В качестве референса были использованы участки тканей этих органов, в которых не наблюдали развитие фиброзных осложнений. На срезах ткани было произведено ИГХ-мечение как FAP, так и маркеров миофибробластов (αSMA) и общей фракции стромальных регуляторных клеток CD90 (THY1).

Мы обнаружили, что FAP-положительные клетки выявляются в различных органах пациентов с COVID-19, включая легкие, почки, печень и миокард, однако в боль-

шинстве исследованных органов экспрессия FAP ограничивается эндотелием сосудов в основном в капиллярах, а в зонах фиброза реакция отсутствует. В ткани крупных артериальных сосудов экспрессия FAP у части пациентов наблюдается в зоне фиброзных атеросклеротических бляшек. В то же время в легких была выявлена связь между наличием FAP-положительных клеток и выраженностью фиброзных изменений. Согласно полученным данным, при отсутствии выраженного фиброза в легких экспрессия FAP наблюдалась лишь в кровеносных сосудах капиллярного типа и клетках альвеолярного эпителия, причем выраженность этой экспрессии не зависела от степени фи-

Таблица 2. Сравнительный анализ экспрессии **FAP** и **CD90** в легких у пациентов с различной степенью фиброзных изменений**Table 2.** Comparative analysis of **FAP** and **CD90** expression in the lungs of patients with varying degrees of fibrotic changes.

Степень выраженности фиброза по R. Hubner [11]	Число наблюдений	Характерные особенности экспрессии FAP	Характерные особенности экспрессии CD90
Отсутствует	6	Экспрессия в клетках десквамированного альвеолярного эпителия разной степени выраженности и в кровеносных капиллярах	Отсутствие экспрессии
Слабая (Grade 1, 2)	10	Экспрессия в клетках десквамированного альвеолярного эпителия разной степени выраженности и в кровеносных капиллярах+наличие фиброзных узелков в 2 наблюдениях	» »
Умеренная (Grade 5)	4	В 2 наблюдениях фиброзные узелки	Положительная экспрессия в фиброзных узелках

броза. Однако мы обнаружили большое количество **FAP**-позитивных клеток в фиброзных фокусах, часть этих клеток была также положительной по маркеру **aSMA**. В ряде работ [1, 12] описано появление активированных стромальных клеток на границе инвазивного фронта фиброзного фокуса и предполагается дальнейшая их дифференцировка в миофибробласты. Мы наблюдали, что в легких пациентов с **COVID-19** клетки с экспрессией только **FAP** располагались на границе фиброзных фокусов, что позволяет предполагать их вклад в формирование инвазивного фронта, а клетки **FAP+aSMA+** локализовались преимущественно внутри фокусов и, вероятно, соответствовали субпопуляции дифференцирующихся в миофибробласты клеток. **CD90**-позитивные клетки также располагались внутри фиброзных фокусов, однако количество их было меньше и не наблюдалась колокализация с **aSMA**.

Сопоставляя полученные данные об экспрессии исследуемых антигенов как маркеров активированных фибробластов с данными об их экспрессии на **CAF**, следует отметить, что роль **FAP** и **CD90** в качестве маркеров **CAF** остается неоднозначной. Несмотря на многочисленные зарубежные публикации об идентификации **CAF** с помощью данных антител, наши собственные результаты демонстрируют крайне неоднозначные данные. Клетки, позитивные на **FAP**, в колоректальном раке выявлялись мозаично в разных зонах опухоли (в инвазивном крае, апикальной части опухоли и центральной) и не во всех случаях. Корреляционный анализ с целью поиска связи между экспрессией маркеров (колокализация) обнаружил сильную обратную связь между уровнем **aSMA** и **FAP** в центральной зоне колоректального рака ($r=0,79$, $p=0,034$), что свидетельствует о разном биологическом значении **FAP** и **aSMA** в отношении **CAF** и о том, что эти маркеры могут быть использованы для выявления разных субпопуляций **CAF** [17]. Маркер **CD90** описан как маркер **CAF** в раке предстательной железы и предполагается, что он ассоциирован с более высоким показателем по шкале Глисона для опухоли [18]. В нашем пилотном исследовании показано, что **CD90** полностью отсутствует в доброкачественной гиперплазии предстательной железы, однако наблюдается в строме карциномы, но распределение метки вызывает вопросы: реакция **CD90** в части случаев отсутствует в строме самой опухоли, но присутствует в строме вблизи опухоли, причем закономерности наличия маркера в зависимости от удаленности от опухоли выявить не удалось. Также интересным является наличие яркой реакции **CD90** в нервных стволах предста-

тельной железы, что может свидетельствовать о нейрональном происхождении клеток, позитивных на **CD90** не только в раке предстательной железы, но и при фиброзе легких.

Остается также неясным, какова роль **FAP** в дифференцировке клеток-предшественников в миофибробласты, является ли он преимущественно маркером промежуточной активированной клеточной популяции или драйвером изменений фенотипа и функций стромальных клеток [8]. Известно, что **FAP** является мембранной протеазой, демонстрирующей экзо- и эндопептидазную активность, которая участвует в протеолизе ВКМ, облегчая инвазию клеток. С другой стороны, **FAP**-положительные клетки способны к секреции ключевых белков профиброзного ВКМ. Роль **FAP**-положительных клеток в прогрессии фиброза на данный момент представляется весьма противоречивой. Ранее мы показали, что повреждение тканей легкого при блеомин-индуцированном фиброзе у мышей сопровождается появлением и накоплением **FAP**-положительных клеток, что положительно коррелирует со степенью тяжести фиброза [19]. Данные других исследователей [12, 20] также свидетельствуют, что **FAP** активируется при моделировании фиброза легких у мышей блеомином уже на ранних стадиях через 1 нед и сохраняются как минимум в течение 4 нед на высоком уровне. В данной работе подтверждена связь накопления **FAP**-положительных клеток с формированием и, возможно, прогрессией фиброзных узелков. Кроме того, учитывая наблюдаемую экспрессию **FAP** не только на стромальных клетках, можно предположить, что в качестве источников активированных предшественников миофибробластов в тканях пациентов с **COVID-19** могут выступать как эпителиальные, так и эндотелиальные клетки, для которых показана возможность трансдифференцировки в миофибробласты при развитии фиброза [1–4, 8]. Это косвенно подтверждается и невысокой экспрессией маркера **CD90**, выявленной в нашем исследовании.

Заключение

Таким образом, мы показали, что **FAP**-положительные клетки определяются в различных органах пациентов с **COVID-19**, но в фиброзированных областях ткани эти клетки преимущественно представлены в легких как основном органе-мишени для поражающего действия коронавируса **SARS-Cov-2**. Мы наблюдали экспрессию **FAP** различной интенсивности в кровеносных сосудах капил-

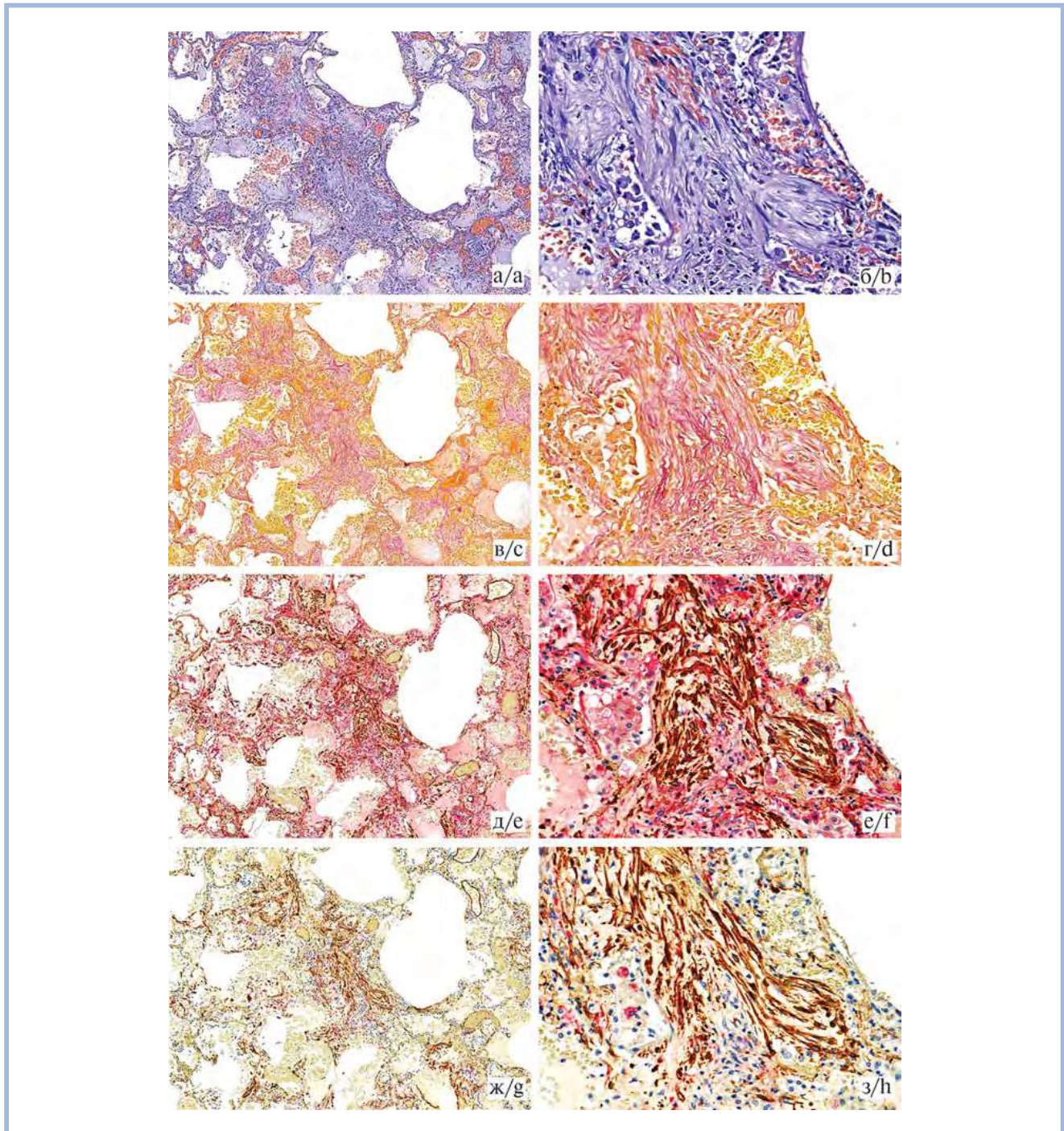


Рис. 4. Экспрессия FAP и CD90 в фибробластической полипоидной ткани легкого у больных Covid-19.

а, б — ткань легкого с выраженным полнокровием кровеносных сосудов, десквамацией клеток альвеолярного и бронхиального эпителия, наличием фибробластической полипоидной ткани в просветах альвеол; в, г — яркое окрашивание коллагена в фибробластической полипоидной ткани; д, е — положительная экспрессия FAP и aSMA в веретеновидных клетках в составе фибробластической полипоидной ткани; ж, з — положительная экспрессия CD90 и aSMA в веретеновидных клетках в составе фибробластической полипоидной ткани, а также экспрессия CD90 в десквамированных клетках альвеолярного эпителия.

а, б — окраска гематоксилином и эозином; в, г, — окраска пикрофуксином по Ван Гизону; д, е — иммуногистохимическая реакция с антителами к FAP и aSMA; ж, з — иммуногистохимическая реакция с антителами к CD90 и aSMA.

а, в, д, ж — $\times 100$; б, г, е, з — $\times 400$.

Fig. 4. Expression of FAP and CD90 in fibroblastic polypoid tissue in patients with Covid19.

а, б — lung tissue with prominent vascular congestion, desquamation of alveolar and bronchial epithelial cells, the presence of fibroblastic polypoid tissue in the lumens of the alveoli; в, г — staining of collagen in the fibroblastic polypoid tissue; д, е — positive expression of FAP and aSMA in spindle-shaped cells within the fibroblastic polypoid tissue; ж, з — positive expression of CD90 and aSMA in spindle-shaped cells within the fibroblastic polypoid tissue, and CD90 expression in desquamated cells of the alveolar epithelium.

а, б — H&E, в, г — picrofuchsin according to van Gieson, д, е, ж, з — immunohistochemical reaction with antibodies to FAP and aSMA; г, h — immunohistochemical reaction with antibodies to CD90 and aSMA.

а, в, г, ж — $\times 100$, б, д, ф, h — $\times 400$.

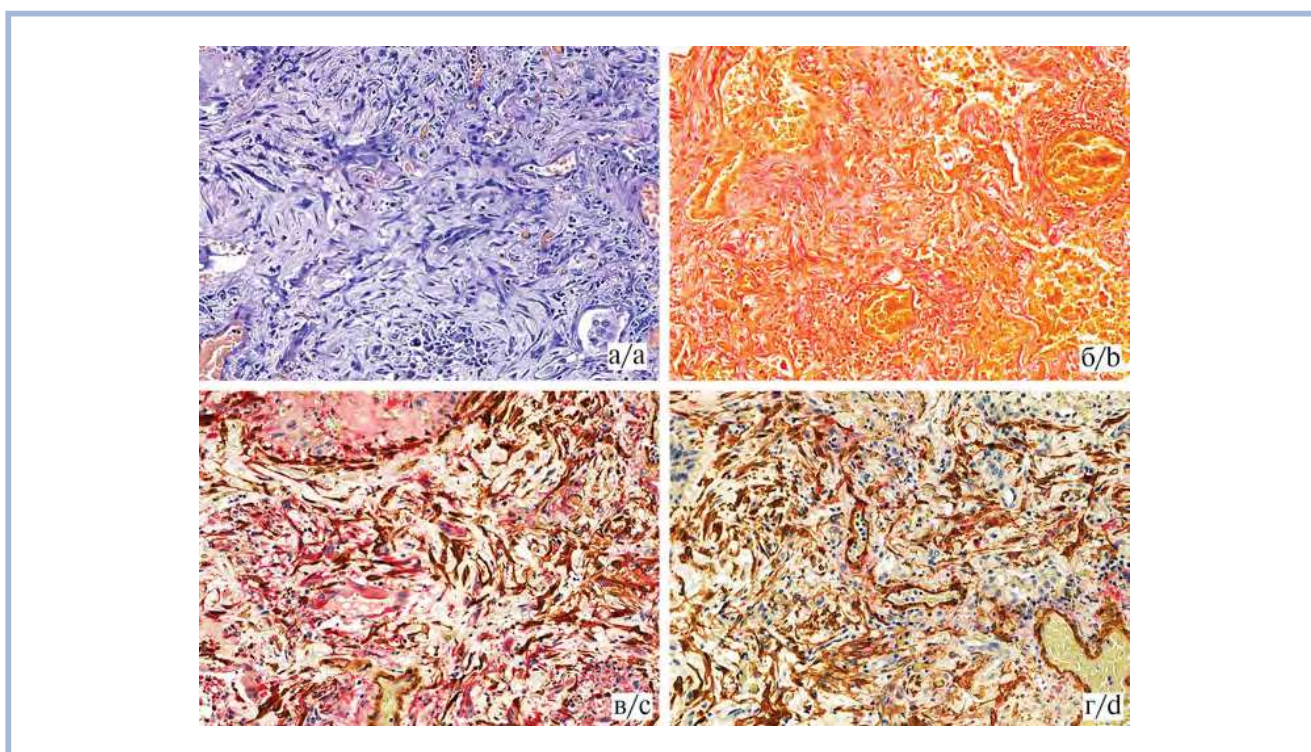


Рис. 5. Экспрессия FAP и CD90 в фиброзных узелках легкого у больных Covid-19.

а — ткань легкого с выраженным полнокровием кровеносных сосудов, умеренным фиброзом в виде сливающихся очагов фиброза (Grade 5 по R. Hubner); б — яркое окрашивание коллагена в очаге фиброза; в — положительная экспрессия FAP и aSMA в веретеновидных клетках в составе фиброзного узелка; г — положительная экспрессия CD90 и aSMA в веретеновидных клетках в составе фиброзного узелка, а также экспрессия CD90 в десквамированных клетках альвеолярного эпителия.

а — окраска гематоксилином и эозином; б — окраска пикрофуксином по Ван Гизону; в — иммуногистохимическая реакция с антителами к FAP и aSMA; г — иммуногистохимическая реакция с антителами к CD90 и aSMA. ×200.

Fig. 5. Expression of FAP and CD90 in fibrous lung nodules in patients with Covid19.

а — lung tissue with prominent vascular congestion, desquamation of alveolar and bronchial epithelial cells, moderate fibrosis in the form of confluent foci of fibrosis (Grade 5 according to R. Hubner); б — strong staining of collagen in the fibrous focus; в — positive expression of FAP and aSMA in spindle-shaped cells within the fibrous nodule; д — positive expression of CD90 and aSMA in spindle-shaped cells within the fibrous nodule, and CD90 expression in desquamated cells of the alveolar epithelium.

а — H&E; б — picrofuchsin according to van Gieson; в — immunohistochemical reaction with antibodies to FAP and aSMA; д — immunohistochemical reaction with antibodies to CD90 and aSMA. ×200.

лярного типа, клетках альвеолярного и бронхиального эпителия, а также в фиброзных узелках, где он, по-видимому, маркирует активированные стромальные клетки на границе фиброзных фокусов, а в центре фокусов частично кокализует с ключевым маркером миофибробластов aSMA. В фиброзных фокусах преимущественно обнаруживаются и CD90-позитивные стромальные клетки.

Полученные результаты позволяют уточнить локализацию активированных стромальных предшественников в тканях человека при повреждении и предположить важную роль FAP в формировании фиброзных фокусов и прогрессировании фиброзных изменений в первую очередь в тканях легких, что делает его возможной перспективной фармацевтической мишенью для терапии заболеваний, связанных с развитием фиброза. Однако конкретные механизмы участия экспрессирующих FAP клеток в ремоделировании фиброзных фокусов и прогрессии/реверсии

патологического фиброза органов и тканей требуют дальнейшего изучения.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-00198, <https://rscf.ru/project/23-15-00198>.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Данилова Н.В., Басалова Н.А., Ефименко А.Ю.

Сбор и обработка материала — Данилова Н.В., Олейникова Н.А., Келли Е.И., Зайратьянц О.В.

Обработка данных — Данилова Н.В., Басалова Н.А.

Написание текста — Данилова Н.В., Басалова Н.А.

Редактирование — Ефименко А.Ю.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Henderson NC, Rieder F, Wynn TA. Fibrosis: from mechanisms to medicines. *Nature*. 2020;587(7835):555–566. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2938-9>
- Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*. 2007;117(3):524–529. <https://doi.org/10.1172/JCI31487>
- Pakshir P, Hinz B. The big five in fibrosis: macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biol*. 2018;68–69:81–93. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.019>
- Lurje I, Gaisa NT, Weiskirchen R, Tacke F. Mechanisms of organ fibrosis: emerging concepts and implications for novel treatment strategies. *Mol Aspects Med*. 2023;92:101191. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2023.101191>
- Cool CD, Groshong SD, Rai PR, Henson PM, Stewart JS, Brown KK. Fibroblast foci are not discrete sites of lung injury or repair: the fibroblast reticulum. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(6):654–658. <https://doi.org/10.1164/rccm.200602-205OC>
- Li L, Fu H, Liu Y. The fibrogenic niche in kidney fibrosis: components and mechanisms. *Nat Rev Nephrol*. 2022;18:545–557. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00590-z>
- Sabater L, Gossart JB, Hernandez I, Rico D, Blanchard A, Borthwick LA, Fisher AJ, Majo J, Jiwa K, Collins A, et al. miRNA expression in fibroblastic foci within idiopathic pulmonary fibrosis lungs reveals novel disease-relevant pathways. *Am J Pathol*. 2023;193(4):417–429. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2022.12.015>
- Basalova N, Alexandrushkina N, Grigorieva O, Kulebyakina M, Efimenko A. Fibroblast activation protein alpha (FAP α) in fibrosis: beyond a perspective marker for activated stromal cells? *Bio-molecules*. 2023;13(12):1718. <https://doi.org/10.3390/biom13121718>
- King TE Jr, Schwarz MI, Brown K, Tooze JA, Colby TV, Waldron JA Jr, Flint A, Thurlbeck W, Cherniack RM. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(6):1025–1032. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.6.2001056>
- Zhang C, Wu Z, Li JW, Tan K, Yang W, Zhao H, Wang GQ. Discharge may not be the end of treatment: pay attention to pulmonary fibrosis caused by severe COVID-19. *J Med Virol*. 2021;93(3):1378–1386. <https://doi.org/10.1002/jmv.26634>
- Hübner RH, Gitter W, El Mokhtari NE, Mathiak M, Both M, Bolte H, Freitag-Wolf S, Bewig B. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques*. 2008;44(4):507–517. <https://doi.org/10.2144/000112729>
- Herrera J, Forster C, Pengo T, Montero A, Swift J, Schwartz MA, Henke CA, Bitterman PB. Registration of the extracellular matrix components constituting the fibroblastic focus in idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight*. 2019;4:e125185. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.125185>
- Acharya PS, Zukas A, Chandan V, Katzenstein ALA, Puré E. Fibroblast activation protein: a serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol*. 2006;37:352–360. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2005.11.020>
- Yang P, Luo Q, Wang X, Fang Q, Fu Z, Li J, Lai Y, Chen X, Xu X, Peng X, et al. Comprehensive analysis of fibroblast activation protein (FAP) expression in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2023;207(2):160–172. <https://doi.org/10.1164/rccm.202110-2414OC>
- Nagaraju CK, Dries E, Popovic N, Singh AA, Haemers P, Roderic HL, Claus P, Sipido KR, Driesen RB. Global fibroblast activation throughout the left ventricle but localized fibrosis after myocardial infarction. *Sci Rep*. 2017;7:10801. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09790-1>
- Monslow J, Todd L, Chojnowski JE, Govindaraju PK, Assoian RK, Puré E. Fibroblast activation protein regulates lesion burden and the fibroinflammatory response in apoe-deficient mice in a sexually dimorphic manner. *Am J Pathol*. 2020;190:1118–1136. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.01.004>
- Олейникова Н.А., Харлова О.А., Данилова Н.В., Михайлов И.А., Мальков П.Г. Гетерогенность опухолеассоциированных фибробластов в колоректальном раке. *Архив патологии*, 2020;82(4):5–12. Oleinikova NA, Kharlova OA, Danilova NV, Mikhailov IA, Mal'kov PG. Heterogeneity of cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer. *Archives of Pathology*. 2020;82(4):5–12. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol2020820415>
- Hesterberg AB, Rios BL, Wolf EM, Tubbs C, Wong HY, Schaffer KR, Lotan TL, Giannico GA, Gordetsky JB, Hurley PJ. A distinct repertoire of cancer-associated fibroblasts is enriched in cribriform prostate cancer. *J Pathol Clin Res*. 2021;7(3):271–286. <https://doi.org/10.1002/cjp2.205>
- Basalova N, Arbatskiy M, Popov V, Grigorieva O, Vigovsky M, Zaytsev I, Novoseletskaia E, Sagaradze G, Danilova N, Malkov P, et al. Mesenchymal stromal cells facilitate resolution of pulmonary fibrosis by miR-29c and miR-129 intercellular transfer. *Exp Mol Med*. 2023;55:1399–1412. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01017-w>
- Kimura T, Monslow J, Klampatsa A, Leibowitz M, Sun J, Liou-sia M, Woodruff P, Moon E, Todd L, Puré E, et al. Loss of cells expressing fibroblast activation protein has variable effects in models of TGF- β and chronic bleomycin-induced fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019;317:L271–L282. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00071.2019>

Поступила 30.09.2024

Received 30.09.2024

Принята в печать 21.10.2024

Accepted 21.10.2024