УДК 571.27
DOI: https://doi.org/10.17816/MAJ79206

РОЛЬ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА ВИРУСА SARS-COV-2 В АКТИВАЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ОТВЕТА НА ЧАСТИЦЫ РАЗМЕРОМ 100 нм В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ГЛАВНОГО БРОНХА МЫШЕЙ

Е.Л. Болховитина[1], Ю.Д. Вавилова[1], А.О. Богородский[2], И.С. Охрименко[2], В.И. Борщевский[2], М.А. Шевченко[1]

[1] Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия;
[2] Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

Как цитировать: Болховитина Е.Л., Вавилова Ю.Д., Богородский А.О., Охрименко И.С., Борщевский В.И., Шевченко М.А. Роль рецептор-связывающего домена вируса SARS-COV-2 в активации нейтрофилов при формировании ответа на частицы размером 100 нм в слизистой оболочке главного бронха мышей // Медицинский академический журнал. 2021. Т. 21. № 3. С. 97–102. DOI: https://doi.org/10.17816/MAJ79206

Поступила: 26.08.2021 Одобрена: 06.09.2021 Принята: 16.09.2021

Обоснование. Попадающие в респираторный тракт патогены, в том числе вирусные частицы, выводятся из организма при помощи мукоцилиарного клиренса и фагоцитирующих клеток иммунной системы. Сведения о том, какие именно фагоциты отвечают за интернализацию вирусных частиц в слизистой оболочке главного бронха, необходимы как для понимания механизмов противовирусного иммунного ответа, так и для разработки стратегии регуляции противовирусного иммунитета.

Цель — определить роль рецептор-связывающего домена SARS-CoV-2 в активации нейтрофил-опосредованного ответа, формирующегося в слизистой оболочке главного бронха мышей после введения частиц размером 100 нм.

Материалы и методы. Мыши линии C57BL/6 получали орофарингеально флуоресцентные частицы размером 100 нм в растворе рецептор-связывающего домена вируса SARS-CoV-2. Через 24 ч главный бронх мыши окрашивали при помощи флуоресцентно меченных антител. Трехмерные изображения слизистой оболочки главного бронха получали с использованием конфокального микроскопа. При помощи количественного анализа изображений оценивали фагоцитарную активность нейтрофилов в слизистой оболочке главного бронха.

Результаты. Миграцию нейтрофилов в слизистую главного бронха обнаружили только при введении частиц в растворе рецептор-связывающего домена вируса SARS-CoV-2, но не в фосфатном буфере или в растворе бычьего сывороточного альбумина. Раствор рецептор-связывающего домена вируса SARS-CoV-2 сам по себе также вызывал приток нейтрофилов в слизистую оболочку главного бронха. Мигрировавшие в слизистую оболочку главного бронха в ответ на введение частиц в растворе рецептор-связывающего домена вируса SARS-CoV-2 нейтрофилы принимали активное участие в интернализации частиц.

Заключение. Раствор рецептор-связывающего домена вируса SARS-CoV-2 обладает способностью активировать нейтрофил-опосредованный ответ в слизистой оболочке главного бронха.

Ключевые слова: нейтрофилы; рецептор-связывающий домен SARS-CoV-2; наночастицы; слизистая оболочка главного бронха.

RECEPTOR-BINDING DOMAIN OF SARS-COV-2 CONTRIBUTION TO THE NEUTROPHIL ACTIVATION DURING 100 nm PARTICLE-INDUCED IMMUNE RESPONSE IN CONDUCTION AIRWAY MUCOSA OF MICE

Elena L. Bolkhovitina[1], Julia D. Vavilova[1], Andrey O. Bogorodskiy[2], Ivan S. Okhimenko[2], Valentin I. Borshchevskiy[2], Marina A. Shevchenko[1]

[1] Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;
[2] Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russia

To cite this article: Bolkhovitina EL, Vavilova JD, Bogorodskiy AO, Okhimenko IS, Borshchevskiy VI, Shevchenko MA. Receptor-binding domain of SARS-COV-2 contribution to the neutrophil activation during 100 nm particle-induced immune response in conduction airway mucosa of mice. *Medical Academic Journal.* 2021;21(3):97–102. DOI: https://doi.org/10.17816/MAJ79206

Received: 26.08.2021 Revised: 06.09.2021 Accepted: 16.09.2021

BACKGROUND: Airborne pathogens such as virus particles undergo elimination from the respiratory tract by mucociliary clearance and phagocytosis by immune cells. The data about phagocytic cell type infiltration and stimuli that attract phagocytic cells to conducting airway are required for the anti-virus immune response mechanism understanding and the treatment strategy development.

AIM: To detect the role of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 in neutrophil immune response activation in conducting airway mucosa after 100 nm particles application.

MATERIALS AND METHODS: C57BL/6 mice received an oropharyngeal application of fluorescent 100 nm particles suspended in the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 solution. 24 hours after, conducting airways of mice were dissected and subjected for immunohistochemistry as whole-mounts. Three-dimensional images of conducting airway regions were obtained using confocal microscopy. Quantitative image analysis was performed to estimate the ingestion activity of neutrophils in conducting airway mucosa.

RESULTS: Neutrophil migration to conducting airway mucosa was detected in case of the application of particles in receptor-binding domain solution, but not in phosphate buffer or bovine serum albumin solution. Receptor-binding domain solution alone also induced neutrophil migration to conducting airway mucosa. Infiltrating conducting airway wall mucosa neutrophils contributed to particles internalization.

CONCLUSIONS: The receptor-binding domain of SARS-CoV-2 can activate the neutrophil-mediated response in conducting airway mucosa.

Keywords: neutrophils; receptor-binding domain SARS-CoV-2; nanoparticles; conducting airway mucosa.

Обоснование

Нейтрофилы обеспечивают защиту организма от патогенов, в том числе вирусной природы [1]. В отсутствие патологии нейтрофил-опосредованный ответ завершается разрешением воспаления, но в случае ощутимого повреждения тканей при осложнениях вирусных инфекций разрешение может не наступать [2]. Известно, что нейтрофилы способны инфильтрировать легкие, повреждая эндотелий сосудов и эпителий альвеол, нарушая процесс газообмена [3]. Острый воспалительный нейтрофил-опосредованный ответ обусловливает закупорку легочных сосудов при летальном сепсисе, и иногда причиной образования тромба становятся образуемые нейтрофилами внеклеточные сети [4, 5]. Нейтрофилы крови пациентов с тяжелым течением коронавирусной инфекции в большей степени подвержены нетозу *in vitro*, кроме того, нетоз наблюдают в гистологических срезах тканей легких таких пациентов [6]. Механизмы, запускаемые SARS-CoV-2 и приводящие к неконтролируемому нейтрофил-опосредованному ответу, не ясны.

Цель настоящей работы — определить роль рецептор-связывающего домена вируса SARS-CoV-2 (RBD) в активации нейтрофил-опосредованного ответа, формирующегося в слизистой оболочке главного бронха мышей после введения частиц размером 100 нм.

Материалы и методы

В исследовании использовали мышей C57BL/6 (самок) в возрасте 8–20 нед. из питомника лабораторных животных «Пущино». Мышей обездвиживали в атмосфере изофлурана и вводили орофарингеально флуоресцентные частицы размером 100 нм (Fluospheres, Thermofisher) в дозе 10 млн частиц на мышь. Предварительно частицы обрабатывали ультразвуком (для предотвращения агломерации) и разводили в 0,1 % растворе RBD (Хайтест)

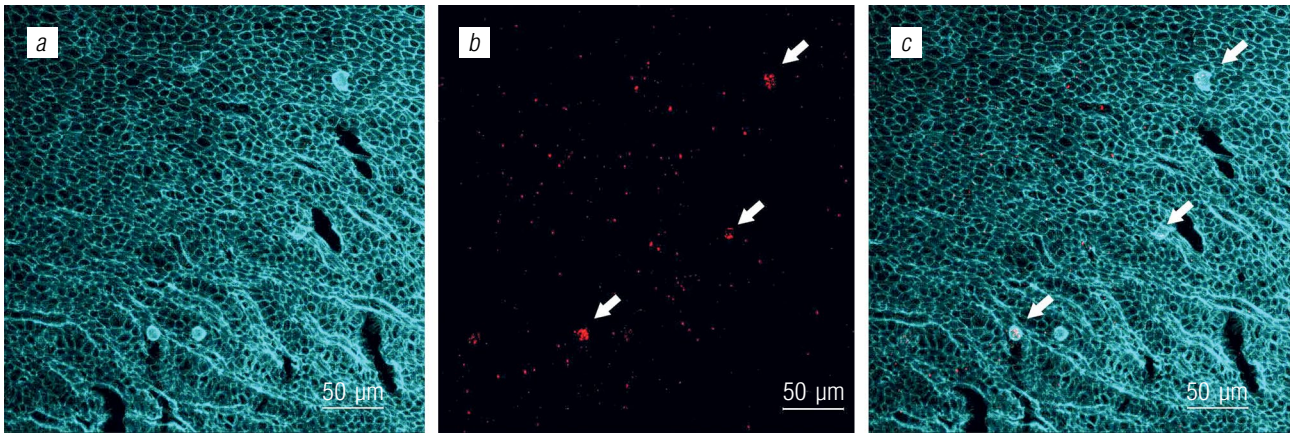

Рис. 1. Инертные частицы 100 нм, подверженные поглощению актин-богатыми клетками в слизистой оболочке главного бронха: *a* — окрашивание фаллоидином (светло-голубой), визуализация эпителия главного бронха и богатых актином клеток округлой формы на обращенной в просвет поверхности эпителия; *b* — частицы (красный) как в свободном виде, так и в виде скоплений (стрелки); *c* — суммарное изображение скопления частиц, находящихся внутри богатых актином клеток округлой формы. Масштаб — 50 мкм

Fig. 1. Inert 100 nm particles are subjected to internalization by actin-rich cells in conducting airway mucosa: *a* — phalloidin (cyan) allows visualizing conducting airway epithelium and actin-rich round-shape cells in the luminal side of conducting airway epithelium; *b* — particles (red) were observed in a free state and as agglomerates (arrows); *c* — merged image shows that particles agglomerates were inside actin-rich round-shape cells. Scale bar 50 μm

в фосфатном буфере. Контрольные группы мышей получали частицы в фосфатном буфере, в 0,1 % растворе бычьего сывороточного альбумина (Serva) и 0,1 % раствор RBD (без частиц). Через 24 ч легкие мышей извлекали и выдерживали ночь при 4 °C в 2 % растворе параформальдегида (Sigma-Aldrich). Главный бронх вырезали и окрашивали флуоресцентно меченными антителами: Alexa647-Ly6G или APC-CD11b (BioLegend). Филаменты актина окрашивали Atto425-меченым фаллоидином (Sigma-Aldrich), ядра — Hoechst 33342 (Thermofisher). Препараты покрывали монтирующей средой Prolong Gold (Thermofisher). Трехмерные изображения получали при помощи конфокального микроскопа Zeiss LSM 780 (Zeiss). Количественный анализ изображений проводили в программе Imaris (Oxford Instruments).

Результаты

Разведенные в фосфатном буфере флуоресцентные частицы детектировали в слизистой оболочке главного бронха через 24 ч после введения. Частицы находились на обращенной в просвет стороне эпителиального барьера и преимущественно были поглощены клетками-фагоцитами, экспрессирующими актин на уровне эпителиальных клеток (рис. 1, *a*, *c*). При окрашивании против Ly6G — антигена нейтрофилов мыши — не выявлено нейтрофилов в слизистой оболочке главного бронха через 24 ч после введения частиц. Было проведено окрашивание при помощи антител к CD11b — общему маркеру фагоцитов, экспрессия которого характерна на высоком уровне для зрелых и незрелых нейтрофилов, а также для других

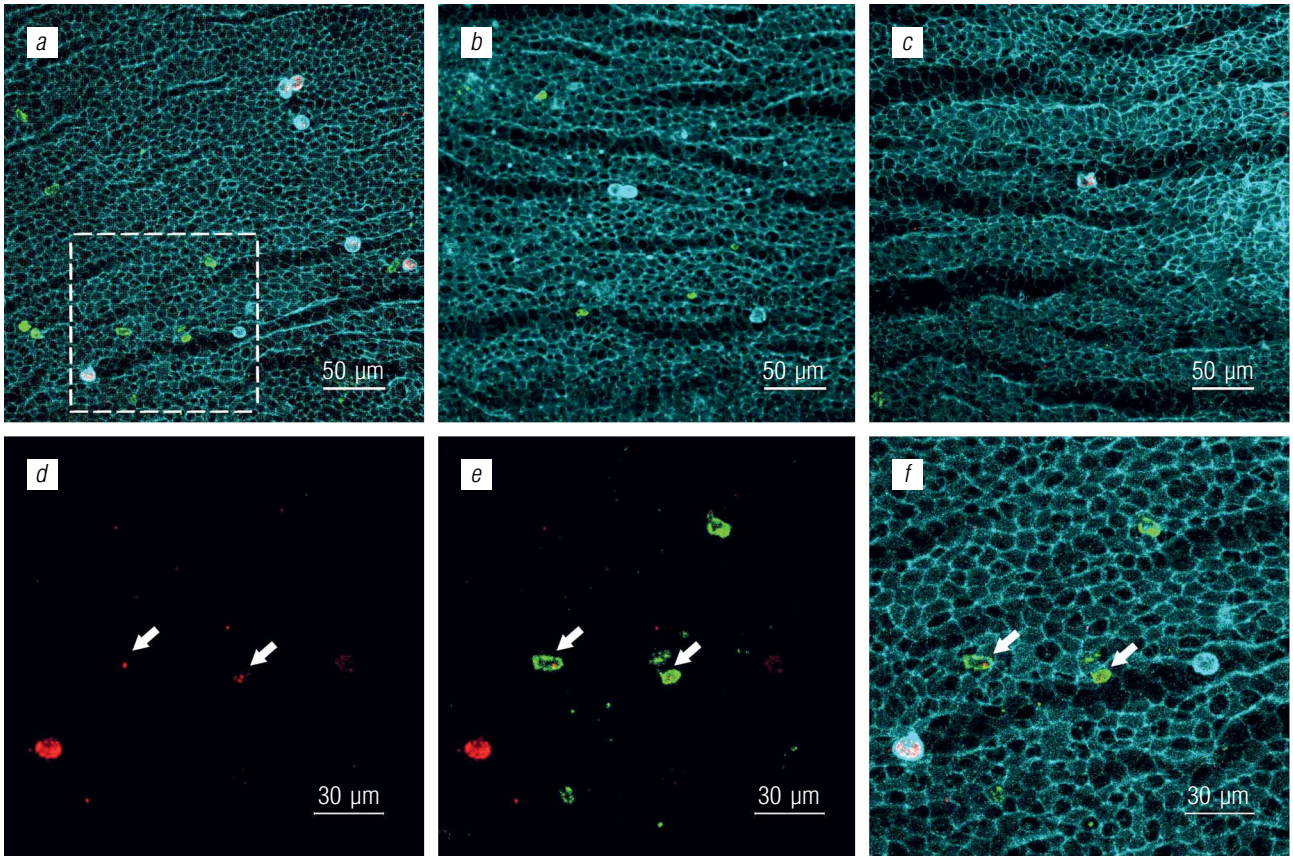

Рис. 2. Приток нейтрофилов в слизистую оболочку главного бронха, стимулируемый RBD: *a* —репрезентативное изображение фрагмента главного бронха мыши через 24 ч после введения частиц 100 нм в растворе RBD; *b* — регион главного бронха мыши, получившей только раствор RBD (без частиц); *c* — регион главного бронха мыши через 24 ч после введения частиц в растворе бычьего сывороточного альбумина. Шкала — 50 мкм; *d–f* — увеличенное изображение региона, показанного на рис. *a*, представляет частицы, в том числе поглощенные нейтрофилами (стрелки). Шкала — 30 мкм. Фаллоидин (светло-голубой) окрашивает эпителиальные клетки и богатые актином клетки-фагоциты, CD11b (зеленый) позволяет определить нейтрофилы, частицы (красный)

Fig. 2. RBD stimulates neutrophil infiltration to conducting airway mucosa: *a* — representative image of the conducting airway region 24 hours after the application of 100 nm particles in RBD solution; *b* — the region of conducting airway of mouse that received RBD solution alone (without particles); *c* — the region of conducting airway of mouse that received particles in bovine serum albumin solution. Scale bar 50 μm; *d–f* — enlarged images of the region indicated in *a* shows particles, some of them are internalized by neutrophils (arrows). Scale bar 30 μm. Phalloidin (cyan) allows to visualize epithelium and actin-rich phagocytic cells, CD11b (green) permit to observe neutrophils, particles (red)

типов фагоцитирующих клеток. Богатые актином клетки, поглощавшие частицы, экспрессировали CD11b на очень низком уровне, других $CD11b^+$-клеток в слизистой оболочке главного бронха обнаружено не было.

Флуоресцентные частицы в растворе RBD, в отличие от частиц в фосфатном буфере, вызывали приток нейтрофилов в слизистую оболочку главного бронха, что детектировали как при помощи антител к Ly6G, так и при помощи антител к CD11b (рис. 2, *a*). У мышей, получавших орофарингеально раствор RBD без частиц, также были обнаружены нейтрофилы, но в значительно меньшем количестве (рис. 2, *b*). Введение частиц в растворе бычьего сывороточного альбумина не вызывало притока нейтрофилов в слизистую оболочку главного бронха (рис. 2, *c*). Приходящие в ответ на введение частиц в растворе RBD нейтрофилы поглощали частицы наряду с высокоэкспрессирующими актин фагоцитами, задействованными в захвате частиц даже в отсутствие RBD (рис. 2, *d–f*).

Обсуждение результатов

Известно, что наночастицы способны индуцировать нейтрофил-опосредованный ответ [7]. Однако в данной работе при орофарингеальном введении частиц размером 100 нм мышам мы не обнаружили нейтрофилов в слизистой оболочке главного бронха. Для определения нейтрофилов применяли маркер Ly6G. Такой подход был использован нами ранее, при визуализации нейтрофилов в слизистой оболочке главного бронха в ответ на введение спор грибов [8]. Однако в ответ на частицы размером 100 нм данный подход не позволил выявить нейтрофилы. Было показано, что в крови пациентов с осложненным течением COVID-19 увеличивалось количество незрелых нейтрофилов [9]. Незрелые нейтрофилы мыши слабо экспрессируют Ly6G [10]. Для обнаружения нейтрофилов независимо от степени их созревания нами были использованы антитела против CD11b. С помощью антител к CD11b также не был выявлен приток нейтрофилов в ответ на инертные частицы. Таким образом, показано, что инертные частицы размером 100 нм не активируют нейтрофил-опосредованный ответ в слизистой оболочке главного бронха. Частицы, вводимые в растворе RBD, стимулировали приток нейтрофилов в слизистую оболочку главного бронха мыши, более того, даже в отсутствие частиц RBD вызывал слабый приток нейтрофилов. Мигрировавшие нейтрофилы поглощали частицы на обращенной в просвет дыхательного пути стороне эпителия главного бронха. Таким образом, RBD вызывал приток нейтрофилов в слизистую оболочку главного бронха и стимулировал фагоцитоз частиц нейтрофилами.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта № 20-04-60311 Вирусы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическая экспертиза. Выполнение исследования одобрено комиссией по контролю за содержанием и использованием животных Государственного научного центра ФГБУН «Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН (протоколы № 302/2020 от 5 августа 2020 г. и № 319 от 24 марта 2021 г.).

Список литературы

1. Ley K., Hoffman H.M., Kubes P. et al. Neutrophils: New insights and open questions // Sci. Immunol. 2018. Vol. 3, No. 30. P. eaat4579. DOI: 10.1126/sciimmunol.aat4579
2. Jamieson A.M., Pasman L., Yu S. et al. Role of tissue protection in lethal respiratory viral-bacterial coinfection // Science. 2013. Vol. 340, No. 6137. P. 1230–1234. DOI: 10.1126/science.1233632
3. Short K.R., Kroeze E.J.B.V., Fouchier R.A.M., Kuiken T. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome // Lancet Infect. Dis. 2014. Vol. 14, No. 1. P. 57–69. DOI: 10.1016/s1473-3099(13)70286-x
4. Lee E.K.S., Gillrie M.R., Li L. et al. Leukotriene B4-mediated neutrophil recruitment causes pulmonary capillaritis during lethal fungal sepsis // Cell. Host. Microbe. 2018. Vol. 23, No. 1. P. 121–133.e4. DOI: 10.1016/j.chom.2017.11.009
5. Jiménez-Alcázar M., Rangaswamy C., Panda R. et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps // Science. 2017. Vol. 358, No. 6367. P. 1202–1206. DOI: 10.1126/science.aam8897
6. Veras F.P., Pontelli M.C., Silva C.M. et al. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology // J. Exp. Med. 2020. Vol. 217, No. 12. P. e20201129. DOI: 10.1084%2Fjem.20201129
7. Keshavan S., Calligari P., Stella L. et al. Nano-bio interactions: a neutrophil-centric view // Cell. Death Dis. 2019. Vol. 10, No. 8. P. 569. DOI: 10.1038/s41419-019-1806-8
8. Bogorodskiy A.O., Bolkhovitina E.L., Gensch T. et al. Murine intraepithelial dendritic cells interact with phagocytic cells during Aspergillus fumigatus-induced inflammation // Front. Immunol. 2020. Vol. 11. P. 298. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00298
9. Silvin A., Chapuis N., Dunsmore G. et al. Elevated calprotectin and abnormal myeloid cell subsets discriminate severe

from mild COVID-19 // Cell. 2020. Vol. 182, No. 6. P. 1401–1418.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.002
10. Boivin G., Faget J., Ancey P.B. et al. Durable and controlled depletion of neutrophils in mice // Nat. Commun. 2020. Vol. 11, No. 1. P. 2762. DOI: 10.1038/s41467-020-16596-9

References

1. Ley K, Hoffman HM, Kubes P, et al. Neutrophils: New insights and open questions. *Sci Immunol*. 2018;3(30):eaat4579. DOI: 10.1126/sciimmunol.aat4579
2. Jamieson AM, Pasman L, Yu S, et al. Role of tissue protection in lethal respiratory viral-bacterial coinfection. *Science*. 2013;340(6137):1230–1234. DOI: 10.1126/science.1233632
3. Short KR, Kroeze EJBV, Fouchier RAM, Kuiken T. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(1):57–69. DOI: 10.1016/s1473-3099(13)70286-x
4. Lee EKS, Gillrie MR, Li L, et al. Leukotriene B4-mediated neutrophil recruitment causes pulmonary capillaritis during lethal fungal sepsis. *Cell Host Microbe*. 2018;23(1):121–133.e4. DOI: 10.1016/j.chom.2017.11.009
5. Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science*. 2017;358(6367):1202–1206. DOI: 10.1126/science.aam8897
6. Veras FP, Pontelli MC, Silva CM, et al. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *J Exp Med*. 2020;217(12):e20201129. DOI: 10.1084%2Fjem.20201129
7. Keshavan S, Calligari P, Stella L, et al. Nano-bio interactions: a neutrophil-centric view. *Cell Death Dis*. 2019;10(8):569. DOI: 10.1038/s41419-019-1806-8
8. Bogorodskiy AO, Bolkhovitina EL, Gensch T, et al. Murine intraepithelial dendritic cells interact with phagocytic cells during Aspergillus fumigatus-induced inflammation. *Front Immunol*. 2020;11:298. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00298
9. Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, et al. Elevated calprotectin and abnormal myeloid cell subsets discriminate severe from mild COVID-19. *Cell*. 2020;182(6):1401–1418.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.002
10. Boivin G, Faget J, Ancey PB, et al. Durable and controlled depletion of neutrophils in mice. *Nat Commun*. 2020;11(1):2762. DOI: 10.1038/s41467-020-16596-9

Информация об авторах / Information about the authors

Елена Леонидовна Болховитина — младший научный сотрудник. ГНЦ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3386-509X; e-mail: alenkash83@gmail.com

Elena L. Bolkhovitina — junior scientific researcher. Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3386-509X; e-mail: alenkash83@gmail.com

Юлия Дмитриевна Вавилова — аспирант, младший научный сотрудник. ГНЦ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9075-218X; e-mail: Juliateterina12@gmail.com

Julia D. Vavilova — Postgraduate student, junior scientific researcher. Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9075-218X; e-mail: Juliateterina12@gmail.com

Андрей Олегович Богородский — младший научный сотрудник. ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7589-7823; e-mail: bogorodskiy173@gmail.com

Andrey O. Bogorodskiy — junior scientific researcher. Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russia. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7589-7823; e-mail: bogorodskiy173@gmail.com

Иван Станиславович Охрименко — научный сотрудник. ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1053-2778; eLibrary SPIN: 8418-0194; e-mail: ivan.okhrimenko@phystech.edu

Ivan S. Okhrimenko — scientific researcher. Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russia. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1053-2778; SPIN-code 8418-0194; e-mail: ivan.okhrimenko@phystech.edu

Валентин Иванович Борщевский — ведущий научный сотрудник. ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4398-9712; eLibrary SPIN: 2018-8957; e-mail: borshchevskiy.vi@phystech.edu

Valentin I. Borshchevskiy — senior scientific researcher. Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russia. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4398-9712; eLibrary SPIN: 2018-8957; e-mail: borshchevskiy.vi@phystech.edu

Информация об авторах / Information about the authors

Марина Александровна Шевченко — научный сотрудник. ГНЦ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5278-9937; eLibrary SPIN: 8509-1096; e-mail: mshevch@gmail.com

Marina A. Shevchenko — scientific researcher. Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5278-9937; eLibrary SPIN: 8509-1096; e-mail: mshevch@gmail.com

✉ **Контактное лицо / Corresponding author**

Марина Александровна Шевченко / Marina A. Shevchenko
E-mail: mshevch@gmail.com