

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОМЕНА МИГРАЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ В ЛИМФАТИЧЕСКИЕ СОСУДЫ В ПРОЦЕССЕ ВОСПАЛЕНИЯ, ИНДУЦИРОВАННОГО УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМ ГРИБОМ *A. FUMIGATUS*

© 2019 г. Е. Л. Болховитина^{1*}, А. С. Федорина^{1,3}, А. О. Богородский²,
А. О. Смирнова^{1,2}, Е. Н. Чурсанова^{1,3}, А. М. Сапожников¹,
В. И. Борщевский², М. А. Шевченко¹

*E-mail: alenkash83@gmail.com

¹ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный
исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»,
Москва, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 27.03.2019

Нейтрофилы – основные эффекторные клетки иммунного ответа на экзогенные патогены, в том числе, условно-патогенный грибок *Aspergillus fumigatus*. В очаге воспаления в процессе борьбы с патогеном наблюдают массовую гибель нейтрофилов. Однако в некоторых случаях нейтрофилы выживают и мигрируют в лимфатические сосуды, что имеет значения для окончательной нейтрализации патогена и активации адаптивного иммунного ответа. В данном исследовании была охарактеризована способность нейтрофилов мигрировать в лимфатические сосуды в процессе воспаления, вызванного ингаляцией конидий *A. fumigatus*. В результате были получены новые данные о динамике миграции нейтрофилов в лимфатические сосуды и о роли нейтрофилов в контроле за диссеминацией конидий в организме.

Ключевые слова: нейтрофилы, *Aspergillus fumigatus*, лимфатические сосуды, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

DOI: 10.31857/S102872210006751-1

Адрес: 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10 ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, лаборатория клеточных взаимодействий, Болховитина Елена Леонидовна.

Тел./факс: +7(495) 330 40 11, 8 926 263 15 66 (моб.).

E-mail: alenkash83@gmail.com

Авторы:

Болховитина Е. Л., м.н.с. лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия;

Федорина А. С., студент ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Богородский О. А., аспирант ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия;

Смирнова А. О., студент ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия;

Чурсанова Е. Н., студент ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия;

Сапожников А. М., д.б.н., профессор, заведующий лабораторией клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия;

Борщевский В. И., к.ф.-м.н., с.н.с. Лаборатории перспективных исследований мембранных белков Исследовательского центра механизмов старения и возрастных исследований ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия;

Шевченко М. А., к.б.н., н.с. лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия.

Нейтрофилы – основные эффекторные клетки иммунного ответа против экзогенных пато-

генов бактериальной и грибной природы, в том числе условно-патогенного гриба *Aspergillus fumigatus* [1]. В очаге воспаления нейтрофилы погибают нетозом, некрозом или апоптозом [2], но иногда выживают и возвращаются в кровоток или проникают в лимфатические сосуды [1, 3]. Выжившие нейтрофилы мигрируют в лимфатические узлы, где нейтрализуют остаточные патогены [1]. При этом в случае *M. bovis*, именно нейтрофилы транспортировали патоген в лимфоузлы [3]. В то же время, *S. aureus* перемещался по лимфе независимо от нейтрофилов, так как последние приходят в дренирующие лимфоузлы по кровеносным сосудам [1].

Механизм, посредством которого конидии *A. fumigatus* преодолевают эпителиальный барьер респираторного тракта и далее распространяются в организме при инфекции, не известен. При этом высеив патогена из стерильных жидкостей организма — крови и лимфы, наблюдают при инвазивном аспергиллезе, что подтверждает проникновение конидий из просвета дыхательных путей через эпителиальные и эндотелиальные барьеры в ткани и сосуды. Ранее мы проводили исследования интернализации конидий нейтрофилами слизистой оболочки главного бронха [4].

Цель настоящего исследования — охарактеризовать способность нейтрофилов проникать в лимфатические сосуды в процессе воспаления, вызванного ингаляцией конидий гриба *A. fumigatus*.

Конидии *A. fumigatus* вводили мышам орофарингеально. Тотальные образцы главного бронха окрашивали антителами крысы против Ly6G мыши (clone 1A8, Biolegend), антителами козы против CD31 мыши (R&D System), и антителами кролика против Lyve-1 мыши (Abcam). Затем набором вторичных антител осы (Invitrogen): против иммуноглобулинов крысы — Alexa488, против иммуноглобулинов козы — Alexa555 и против иммуноглобулинов кролика — Alexa647. Визуализацию проводили при помощи конфокального микроскопа Zeiss LSM 780.

При однократном введении, конидии наблюдали только на стороне эпителия, обращенной в просвет дыхательного пути, но не в стенке бронха и не в подслизистом слое. Окрашивание при помощи антител к Lyve-1 позволило идентифицировать сеть сосудов, представляющую афферентные лимфатические капилляры. Ней-

трофилы определяли по экспрессии Ly6G. Как в острой фазе воспаления, так и в отложенной фазе и на стадии разрешения воспаления были идентифицированы единичные нейтрофилы, ассоциированные с лимфатическими капиллярами. Нейтрофилы находились на стороне эндотелия, обращенной во внутреннюю полость в непосредственной близости от эндотелиальных клеток, а в некоторых случаях в стенках капилляров. В острой фазе воспаления наблюдалась массовая миграция нейтрофилов по кровеносным сосудам, экспрессирующим CD31, но не Lyve-1. На стадии разрешения воспаления таких событий практически не наблюдалось.

Использование полученного в данном исследовании метода единовременной визуализации нейтрофилов, конидий, лимфатических и кровеносных сосудов позволит определить роль миграции нейтрофилов по лимфатическим сосудам в развитии терминации воспалительных процессов.

Таким образом, в данной работе было показано, что при разовой ингаляции иммунокомпетентным мышам спор условно-патогенного гриба *A. fumigatus*, наблюдается миграция нейтрофилов в ассоциированные с дыхательными путями лимфатические капилляры.

Поддержано РФФИ, проект № 18-315-00166; участие В. И. Борщевского поддержано Минобрнауки России, проект № 6.9909.2017/6.7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bogoslawski A., Butcher E. C., Kubes P. Neutrophils recruited through high endothelial venules of the lymph nodes via PNA^d intercept disseminating *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci USA. 2018;115(10):2449–2454.
2. Lu T., Kobayashi S. D., Quinn M. T., Deleo F. R. A NET Outcome. Front Immunol. 2012 Dec 5;3:365.
3. Abadie V., Badell E., Douillard P., Ensergueix D., Leenen P. J., Tanguy M., Fiette L., Saeland S., Gicquel B., Winter N. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. Blood. 2005 Sep 1;106(5):1843–50.
4. Shevchenko M. A., Bogorodskiy A. O., Troyanova N. I., Servuli E. A., Bolkhovitina E. L., Büldt G., Fahlke C., Gordeliy V. I., Gensch T., Borschhevskiy V. I., Sapozhnikov A. M. *Aspergillus fumigatus* Infection-Induced Neutrophil Recruitment and Location in the Conducting Airway of Immunocompetent, Neutropenic, and Immunosuppressed Mice. J Immunol Res. 2018 Jan 18; 2018:5379085.

INVESTIGATION OF NEUTROPHIL MIGRATION VIA LYMPHATIC VESSELS
IN THE COURSE OF *A. FUMIGATUS*-INDUCED INFLAMMATION

© 2019 E. L. Bolkhovitina^{1*}, A. S. Fedorina^{1,3}, A. O. Bogorodskiy²,
A. O. Smirnova^{1,2}, E. N. Chursanova^{1,3}, A. M. Sapozhnikov¹,
V. I. Borshchevskiy², M. A. Shevchenko¹

*E-mail: alenkash83@gmail.com

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia;

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

³Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprugniy, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 27.03.2019

Neutrophils are the main effector cells that are mediated immune response to exogenous pathogens including opportunistic fungi *Aspergillus fumigatus*. Neutrophils infiltrate inflamed tissues and massively die during the fight against pathogen. However, in some cases neutrophils survive and migrate to lymphatic vessels to neutralize residual pathogens and activate adaptive immune response. In the present study we characterized the ability of neutrophils to migrate via lymphatic vessels during *A. fumigatus* conidia-induced inflammation. As a result, new data about neutrophils migration kinetics to lymphatic vessels and the role of neutrophils in control of fungal spore dissemination in the host organism were obtained.

Key words: neutrophils, lymphatic vessels, APC, *Aspergillus fumigatus*, airway inflammation

Authors:

Bolkhovitina E. L., ✉ JRF Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia. E-mail: alenkash83@gmail.com;

Fedorina A. S., Student of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Bogorodskiy O. A., PhD student of Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprugniy, Russia;

Smirnova A. O., Student of Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprugniy, Russia;

Chursanova E. N., Student of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Sapozhnikov A. M., Professor, Head of the Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia;

Borshchevskiy V. I., PhD, SRF, Laboratory for Advanced Studies of Membrane Proteins, Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprugniy, Russia;

Shevchenko M. A., PhD, RF, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia.