

О.М. Усова



Дніпровський державний
медичний університет
Дніпро, Україна

Надійшла: 24.02.2024
Прийнята: 20.03.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.1.78-82>

УДК: 616.98:578.834]-06:616.214.8-008-07:611.018.7

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА РОЛІ РЕЦЕПТОРІВ TMPRSS2 ТА ACE-2 У РОЗВИТКУ ОЛЬФАКТОРНИХ РОЗЛАДІВ ПРИ ІНФІКУВАННІ КОРОНАВІРУСОМ SARS-COV-2

Usova O.M.   Comparative assessment of the role of TMPRSS2 and ACE-2 receptors in the development of olfactory disorders in infection with coronavirus SARS-CoV-2.

Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.


ABSTRACT. Background. Today, evidence of the impact of the SARSCoV-2 coronavirus not only on the cells of the olfactory epithelium, but also on the components of the deeper parts of the olfactory system (olfactory bulbs and the olfactory area of the cerebral cortex), indicates the expression of proteins by the cells of the olfactory epithelium that contribute to further penetration of the virus. An urgent problem is the lack of comprehensive studies of the role of morphological and immunological features of various parts of the olfactory system in the occurrence of olfactory disorders and insufficient understanding of the relationship between their duration and the localization of cells affected by the SARS-CoV-2 coronavirus. The **objective** of the study is to clarify the feasibility of studying the role of TMPRSS2 receptors and comparing it with the role of ACE-2 receptors localized on the components of the olfactory epithelium in the development of olfactory disorders in the Coronavirus Disease 2019 caused by SARS-CoV-2. **Methods.** This study was performed using autopsy material, namely fragments of the mucous membrane of the upper parts of the nasal cavity (olfactory epithelium), obtained from 10 deceased (6 women and 4 men) aged 53 to 79 years with a laboratory-confirmed diagnosis of "Coronavirus Disease 2019" (polymerase chain reaction) and olfactory disorders of various degrees in the anamnesis. Mucosal samples were stained both with hematoxylin and eosin, and using an immunohistochemical method with antibodies to transmembrane serine protease-2 (TMPRSS2) and angiotensin-converting enzyme (ACE-2). **Results.** As a result of this study, the number of OMP-positive cells in sections of the olfactory epithelium was on average 46.5 in the field of view at 200x magnification (35.0-59.0), ACE-2-positive cells - 38.5 in the field of view at magnification 200x (21.0-55.0), TMPRSS2-positive - 81 in the field of view at 200x magnification (63.0-96.0). **Conclusion.** Studying the role of TMPRSS2 and ACE-2 receptors localized on olfactory epithelial cells in the development of olfactory disorders in the 2019 coronavirus disease caused by SARS-CoV-2 will provide a better scientific understanding of the development of disease-specific symptoms.

Key words: odorants, smell, olfactory epithelium, coronavirus disease 2019, COVID-19, coronavirus infection, SARS-CoV-2, TMPRSS2, ACE-2.

Citation:

Usova O.M. [Comparative assessment of the role of TMPRSS2 and ACE-2 receptors in the development of olfactory disorders in infection with coronavirus SARS-CoV-2]. *Morphologia*. 2024;18(1):78-82. Ukrainian. DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.1.78-82>

 Usova O.M. 0000-0001-8505-2309

 dr.olgausova@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

На сьогоднішній день зберігається актуальність розвитку ольфакторних розладів різного ступеня вираженості та тривалості у якості ключової симптоматики коронавірусної хвороби 2019, спричиненої SARS-CoV-2 [1-2]. Наразі є докази впливу коронавірусу SARSCoV-2 не лише на клітини ольфакторного епітелію носової порожнини, але й на складові більш глибоких відділів ольфакторної системи (ольфакторних цибулин та ольфакторної ділянки кори головного мозку), що свідчить про експресію клітинами ольфакторного

епітелію протеїнів, які сприяють проникненню вірусу далі [3]. Нагальною проблемою є брак комплексних досліджень ролі морфологічних та імунологічних особливостей різних відділів ольфакторної системи у виникненні ольфакторних розладів та недостатнє розуміння взаємозв'язку між їх тривалістю та локалізацією клітин, уражених коронавірусом SARS-CoV-2 [4-5].

Вже встановлено, що провідну роль у розвитку клінічних проявів коронавірусної хвороби 2019 відіграють рецептори TMPRSS2 та ACE-2 [6-7], локалізовані на клітинах тканин внутрішніх

органів, так як вірус SARS-CoV-2 проникає у клітини шляхом взаємодії з клітинними протеїнами: спайковий глікопротеїн на поверхні вірусу спочатку розщеплюється набором клітинних протеаз, включаючи фермент TMPRSS2 [8], а далі перетворюється на S1 і S2 субодиниці, після чого субодиниця S1 зв'язується з рецептором ACE2 на поверхні клітини, тоді як субодиниця S2 прикріплена до клітинної мембрани. Фермент TMPRSS2 також сприяє проникненню вірусу в клітину шляхом розщеплення частини білка рецептора ACE2 [6]. Також відомо, що експресія рецепторів TMPRSS2 в легенях, передміхуровій залозі, шлунково-кишковому тракті, печінці, серці та рогівці вище, ніж в інших тканинах, з чим можна пов'язати розвиток критичних ускладнень коронавірусної хвороби саме в цих органах [9-11]. Та чи є вони вагомим чинником виникнення ольфакторних розладів?

Метою цієї роботи є з'ясування доцільності вивчення ролі рецепторів TMPRSS2 та порівняння її з роллю рецепторів ACE-2, локалізованих на клітинах ольфакторного епітелію, у розвитку ольфакторних розладів при коронавірусній хворобі 2019, спричиненій SARS-CoV-2.

Матеріали та методи

У даній науковій роботі проведено ретроспективний аналіз аутопсійного матеріалу, а саме слизової оболонки верхніх відділів носової порожнини (ольфакторного епітелію), отриманого у 10 померлих (6 жінок та 4 чоловіка) віком від 53 до 79 років з діагнозом «Коронавірусна хвороба 2019», підтвердженим лабораторно (якісне виявлення РНК вірусу SARS-CoV-2 методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛП) у реальному часі (РТ) з детекцією таргетних генів N, E, RdRP за допомогою флуоресцентної мітки) та ольфакторними розладами різного ступеня в анамнезі. Для контролю була створена група з 9 померлих (3 жінки та 6 чоловіків) віком від 59 до 68 років з лабораторно спростованим діагнозом «Коронавірусна хвороба 2019». Дослідження схвалено комісією з біоетики ДДМУ (витяг з протоколу засідання № 7 від 28 жовтня 2020 р.) та проведено відповідно до принципів біоетики, викладених у Гельсінській декларації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людей» та «Загальній декларації про біоетику та права людини (ЮНЕСКО)». Для морфологічного дослідження зразки слизової оболонки фіксували у 10% нейтральному забуференому формаліні, зневоднювали та занурювали у парафін. Морфологічне дослідження проводилося на базі Міжкафедральної морфологічної лабораторії Дніпровського державного медичного університету. З отриманих парафінових блоків з тканиною було зроблено тонкі зрізи товщиною 4 мкм. Далі, після депарафінізації та регідратації, зрізи фарбували стандартно гематоксиліном та еозином та з використанням імуногістохімічного методу згідно з протоколом TermoScientific

(США) з антитілами до трансмембранної серинової протеази-2 (TMPRSS2) та протоколом RnDsystems з антитілами до ольфакторного маркерного протеїну (OMP) та ангіотензин-перетворюючого ензиму (ACE-2). Цифрові фотографії були отримані за допомогою кольорової камери ZEISS AxioCam 512 під мікроскопом Axio Imager.A2 (збільшення $\times 100/200/400$).

Статистичний аналіз та графічна презентація результатів дослідження виконувалися з використанням пакету комп'ютерної програми Microsoft Excel 2016 (Office16ProPlusVL_MAK edition №00339-21520-30133-AA867). Дані описової статистики наведені у форматі «середнє арифметичне \pm стандартне відхилення» ($M \pm SD$) або із значенням медіани та міжквартильного інтервалу ($Me (Q1-Q3)$) залежно від розподілу ознаки [12].

Результати та їх обговорення

Ольфакторні клітини є видозміненими біполярними нейронами, розташованими умовно на поверхні тіла людини. Ці клітини у нормі експресують рецептори до ольфакторного маркерного протеїну (OMP), який є специфічним для них, тому виконання імуногістохімічного дослідження з використанням антитіл до OMP є важливим в цій роботі, так як позитивна реакція є маркером правильного забору саме фрагментів слизової оболонки носової порожнини, вистелених ольфакторним епітелієм [13]. У результаті аналізу кількості OMP-позитивних клітин у зрізах ольфакторного епітелію хворих на коронавірусну хворобу 2019 (якісне виявлення РНК вірусу SARS-CoV-2 методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛП) у реальному часі (РТ) з детекцією таргетних генів N, E, RdRP за допомогою флуоресцентної мітки) у середньому складала 46,5 у полі зору при збільшенні 200x (35,0-59,0) (Рис. 1.Б), що було меншим за кількість клітин в цій ділянці у зразках контролю (померлі з патологіями, не пов'язаними з інфікуванням SARS-CoV-2 та ольфакторними розладами) - 67,56 клітин (63,00-75,00). До складу ольфакторного епітелію також входять ще два види клітин: суспендулярні та базальні. Суспендулярні клітини виконують опорну функцію, а також забезпечують життєздатність та нормальне функціонування ольфакторних нейронів, вони експресують рецептори до ангіотензин-перетворюючого ензиму (ACE-2) [14-15], а кількість ACE-2-позитивних клітин у нашій роботі у середньому становила 38,5 у полі зору при збільшенні 200x (21,0-55,0) (Рис. 1.В), у зразках контролю - 56 клітин (53,00-64,00) (табл. 1).

Тобто бачимо зменшення кількості OMP-позитивних та ACE-2-позитивних клітин у зразках слизової оболонки носової порожнини хворих на коронавірусну хворобу 2019 (тест Манна-Уїтні, $p < 0,05$), що може бути пов'язано як з безпосереднім впливом коронавірусу SARS-CoV-2 на ольфакторні рецепторні клітини, їх пошкодженням та загибеллю, так і опосередкованою дією вірусу на

ці клітини шляхом первинного впливу на суспендикулярні клітини та вторинним порушенням опори та трофіки ольфакторних рецепторних клітин [13]. При виконанні дослідження з антитілами до трансмембранної сериної протеази-2 (TMPRSS2) встановлено, що майже всі клітинні елементи ольфакторного епітелію мають рецептори до TMPRSS2 на своїй поверхні (у середньому - 81 у полі зору при збільшенні 200x (63,0-96,0)) (Рис.1.Г), що підтверджує вплив наявності

рецепторів TMPRSS2 на фіксацію коронавірусу SARS-CoV-2 на цих клітинах та його інвазію у глибші відділи ольфакторної системи, іншими словами входними воротами для коронавірусу SARS-CoV-2 у клітини людини можуть бути рецептори ACE2 при додатковому сприянні рецепторів TMPRSS2, тому клітини з наявною експресією рецепторів до ACE2 і TMPRSS2 мають здатність зв'язувати вірус і є особливо чутливими до даної хвороби [7].

Таблиця 1
Кількість OMP-позитивних та ACE-2-позитивних клітин ольфакторного епітелію слизової оболонки верхніх відділів носової порожнини хворих з діагнозом «Коронавірусна хвороба 2019», підтвердженим лабораторно (ПЛР), та контрольної групи

	OMP	ACE-2
Хворі на коронавірусну хворобу 2019	46,5 (35,0-59,0)	38,5 (21,0-55,0)
Контрольна група	67,56 (63,00-75,00)	56 (53,00-64,00)

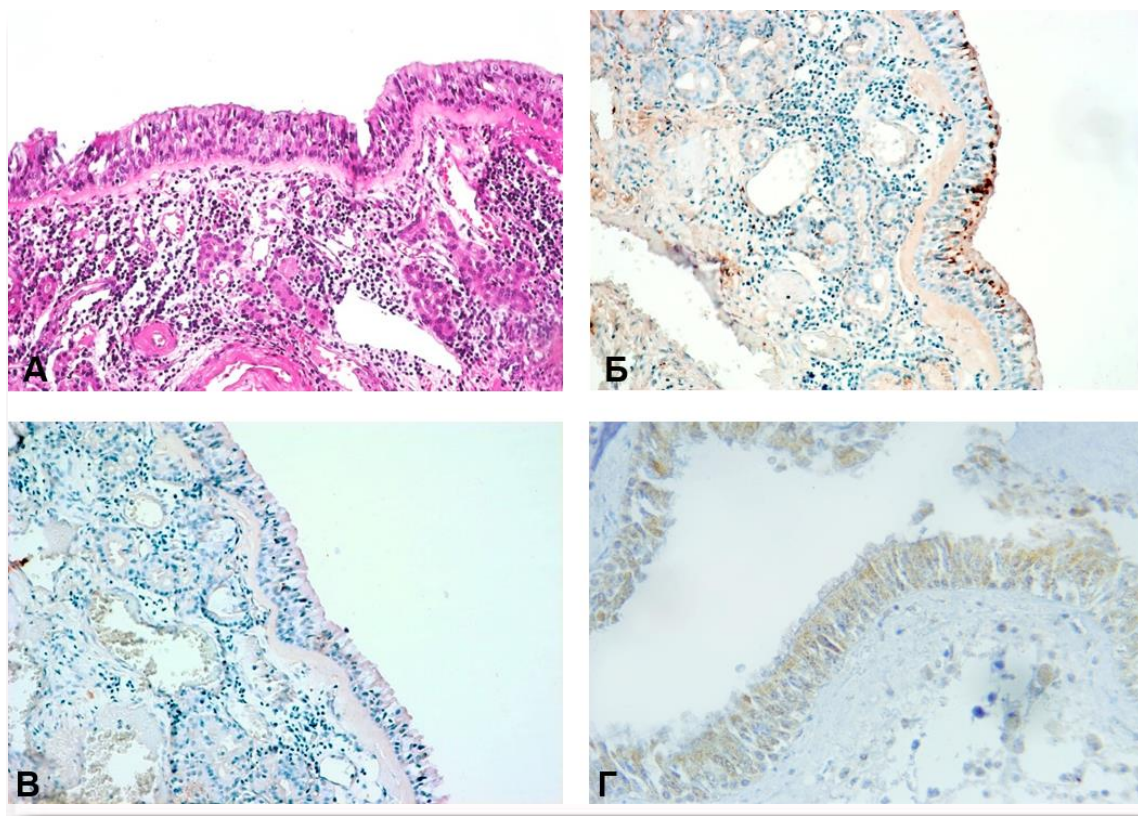


Рис. 1. А. Зразок слизової оболонки верхніх відділів носової порожнини, вистеленої ольфакторним епітелієм, з загальними ознаками гострих запальних змін; матеріал хворого на коронавірусну хворобу 2019, Г+Е, 200x. Б. Експресія рецепторів до ольфакторного маркерного протеїну (OMP) ольфакторними рецепторними клітинами хворого на коронавірусну хворобу 2019, OMP, 200x. В. Експресія рецепторів до ангіотензин-перетворюючого ензиму (ACE-2) суспендикулярними клітинами ольфакторної ділянки хворого на коронавірусну хворобу 2019, ACE-2, 200x. Г. Експресія рецепторів до трансмембранної сериної протеази-2 (TMPRSS2) клітинами ольфакторної ділянки хворого на коронавірусну хворобу 2019, TMPRSS2. ×400.

Також у ході морфологічного дослідження було виявлено загальні риси гострих респіраторних вірусних інфекцій: ознаки запальних змін слизової оболонки верхніх дихальних шляхів з вираженою інфільтрацією слизової оболонки та

підслизового шару мононуклеарними клітинами, розширенням та повнокров'ям кровоносних судин, потовщенням підслизового шару за рахунок набряку та вогнищевою десквамацією епітелію

(Рис.1.А). Тож слід враховувати, що набряк тканин, підвищена секреторна функція та десквамація епітеліальних клітин також відіграють певну роль у виникненні ольфакторних розладів, як спричиняючи їх самостійно та і підсилюючи вже існуючий ефект впливу коронавірусу SARS-CoV-2. При обмірковуванні та опрацюванні результатів дослідження варто враховувати, що середній вік померлих з лабораторно підтвердженим діагнозом «Коронавірусна хвороба 2019» та ольфакторними розладами в анамнезі складав $66,1 \pm 8,14$ років, що свідчить про наявність супутньої патології, яка також може впливати на порушення нюху (ішемічні, склеротичні та метастатичні зміни ольфакторної ділянки слизової оболонки верхніх відділів носової порожнини).

Висновки

1. Виникнення ольфакторних розладів за умов інфікування коронавірусом SARS-CoV-2 є специфічним саме для цього інфекційного агенту та може бути спричиненим або первинним зруйнуванням ольфакторних рецепторних клітин (ОМР-позитивних), або початковим зруйнуванням суспендулярних клітин ольфакторного епітелію (АСЕ-2-позитивних) з наступною дисфункцією вже ольфакторних клітин.

2. Рецептори до ангіотензин-перетворюючого ензиму (АСЕ-2) на поверхні клітинних складових ольфакторного епітелію виступають мішенню для коронавірусу SARS-CoV-2 та відіграють

значну роль у патогенезі виникнення ольфакторних розладів.

3. Рецептори до трансмембранної серинової протеази-2 (TMPRSS2) знаходяться на поверхні клітинних складових ольфакторного епітелію (як ольфакторних рецепторних клітин, так і суспендулярних клітин) і мають вплив на фіксацію коронавірусу SARS-CoV-2 та його інвазію у більш глибокі відділи ольфакторної системи, а тому мають значення у розвитку ольфакторних розладів та потребують подальшого більш детального вивчення.

Перспективи подальших розробок полягають у вивченні структурно-функціональних особливостей елементів ольфакторного епітелію в умовах інфікування коронавірусом SARS-CoV-2.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Роботу виконано в рамках науково-дослідної теми «Клінічні, морфологічні та молекулярно-генетичні підходи у діагностиці та лікуванні коронавірусної хвороби (COVID-19) та її ускладнень, оцінка ризиків прогресування та вивчення особливостей постморбідної реабілітації хворих: мультисистемний аналіз» (номер державної реєстрації 0120U105652) за рахунок власних коштів, а також за підтримки наукової діяльності здобувачів Дніпровським державним медичним університетом.

Літературні джерела References

1. Williams FMK, Freidin MB, Mangino M. Self-reported symptoms of COVID-19 including symptoms most predictive of SARS-CoV2 infection, are heritable. Med Rxiv preprint. 2020;23:316-321. doi:10.1101/2020.04.22.20072124.

2. Tong JY, Wong A, Zhu D. The prevalence of olfactory and gustatory dysfunction in COVID-19 patients: a systematic review and metaanalysis. Otolaryngol Head Neck Surg. 2020;163:3-11. doi:10.1177/0194599820926473.

3. Xydakis MS, Dehgani-Mobaraki P, Holbrook EH. Smell and taste dysfunction in patients with COVID-19. Lancet Infect Dis. 2020;20:1015-1016. doi:10.1016/S1473-3099(20)30293-0.

4. Mosaad AA, Noha A. Dysosmia in Recovered COVID-19 Patients. J Craniofac Surg. 2023;34:843-844. doi: 10.1097/SCS.00000000000009008.

5. Vaira LA, Salzano G, Fois AG. Potential pathogenesis of ageusia and anosmia in COVID-19 patients. Int Forum Allergy Rhinol. 2020;10:1103-1104. doi:10.1002/alr.22593.

6. Yaghoobi A, Lord JS, Rezaiezhadeh JS, Yeka-

ninejad MS, Amini M, Izadi P. TMPRSS2 polymorphism (rs12329760) and the severity of the COVID-19 in Iranian population. Plos One. 2023;18(2):e0281750. doi: 10.1371/journal.pone.0281750.

7. Bilinska K, Jakubowska P, Von Bartheld C. Expression of the SARS-CoV-2 Entry Proteins, ACE2 and TMPRSS2, in Cells of the Olfactory Epithelium: Identification of Cell Types and Trends with Age. ACS Chemical Neuroscience. 2020;11:1555-1562. doi: 10.1021/acscchemneuro.0c00210.

8. David A, Parkinson N, Peacock TP, Pairo-Castineira E, Khanna T, Cobat A, Tenesa A, Sancho-Shimizu V. A common TMPRSS2 variant has a protective effect against severe COVID-19. Curr Res Transl Med. 2022;70(2):103333. doi:10.1016/j.retram.2022.103333.

9. Singh H, Choudhari R, Nema V, Khan AA. ACE2 and TMPRSS2 polymorphisms in various diseases with special reference to its impact on COVID-19 disease. Microb Pathog. 2021;150:104621. doi:10.1016/j.micpath.2020.104621.

10. Senapati S, Banerjee P, Bhagavatula S,

Kushwaha PP, Kumar S. Contributions of human ACE2 and TMPRSS2 in determining host-pathogen interaction of COVID-19. *J Genet.* 2021;100(1):12. doi:10.1007/s12041-021-01262-w.

11. Zhang Y, Sun S, Du C, Hu K, Zhang C, Liu M, Wu Q, Dong N. Transmembrane serine protease TMPRSS2 implicated in SARS-CoV-2 infection is autoactivated intracellularly and requires N-glycosylation for regulation. *J Biol Chem.* 2022;298(12):102643. doi:10.1016/j.jbc.2022.102643.

12. Strahova OP, Androsov OI. [Statistical methods of processing the results of medical and biological research]. Lviv; 2021. 164 p. Ukrainian.

13. Butowt R, Von Bartheld C. Anosmia in COVID-19: Underlying Mechanisms and Assessment of an Olfactory Route to Brain Infection. *The Neuroscientist.* 2021;27:582-603. doi:10.1177%2F1073858420956905.

14. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, Li T, Chen Q. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa.

Int J Oral Sci. 2020;12:8. doi:10.1038/s41368-020-0074-x.

15. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Mbanjo IM, Miao VN, Tzouanas CN, Cao Y, Yousif AS, Bals J, Hauser BM, Feldman J, Muus C, Wadsworth MH 2nd, Kazer SW, Hughes TK, Doran B, Gatter GJ, Vukovic M, Taliaferro F, Mead BE, Guo Z, Wang JP, Gras D, Plaisant M, Ansari M, Angelidis I, Adler H, Sucre JMS, Taylor CJ, Lin B, Waghay A, Mitsialis V, Dwyer DF, Buchheit KM, Boyce JA, Barrett NA, Laidlaw TM, Carroll SL, Colonna L, Tkachev V, Peterson CW, Yu A, Zheng HB, Gideon HP, Winchell CG, Lin PL, Bingle CD, Snapper SB, Kropski JA, Theis FJ, Schiller HB, Zaragosi LE, Barbry P, Leslie A, Kiem HP, Flynn JL, Fortune SM, Berger B, Finberg RW, Kean LS, Garber M, Schmidt AG, Lingwood D, Shalek AK, Ordovas-Montanes J. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell.* 2020;181:1016-35. doi:10.1016/j.cell.2020.04.035.

Усова О.М. Порівняльна оцінка ролі рецепторів TMPRSS2 та ACE-2 у розвитку ольфакторних розладів при інфікуванні коронавірусом SARS-CoV-2.

РЕФЕРАТ. Актуальність. На сьогоднішній день докази впливу коронавірусу SARS-CoV-2 не лише на клітини ольфакторного епітелію носової порожнини, але й на складові більш глибоких відділів ольфакторної системи (ольфакторних цибулин та ольфакторної ділянки кори головного мозку), свідчать про експресію клітинами ольфакторного епітелію протеїнів, які сприяють проникненню вірусу далі. Нагальною проблемою є брак комплексних досліджень ролі морфологічних та імунологічних особливостей різних відділів ольфакторної системи у виникненні ольфакторних розладів та недостатнє розуміння взаємозв'язку між їх тривалістю та локалізацією клітин, уражених коронавірусом SARS-CoV-2. **Метою** дослідження є з'ясування доцільності вивчення ролі рецепторів TMPRSS2 та порівняння її з роллю рецепторів ACE-2, локалізованих на клітинах ольфакторного епітелію, у розвитку ольфакторних розладів при коронавірусній хворобі 2019, спричиненій SARS-CoV-2. **Методи.** Для дослідження використано аутопсійний матеріал, а саме фрагменти слизової оболонки верхніх відділів носової порожнини (ольфакторного епітелію), отримані у 10 померлих (6 жінок та 4 чоловіків) віком від 53 до 79 років з діагнозом «Коронавірусна хвороба 2019», підтвердженим лабораторно (полімеразна ланцюгова реакція) та ольфакторними розладами різного ступеня в анамнезі. Зразки слизової оболонки фарбували стандартно гематоксиліном та еозином та з використанням імуногістохімічного методу з антитілами до трансмембранної сериної протеази-2 (TMPRSS2) і ангіотензин-перетворюючого ензиму (ACE-2). **Результати.** В результаті проведеної роботи кількість OMP-позитивних клітин у зрізах ольфакторного епітелію у середньому складала 46,5 у полі зору при збільшенні 200x (35,0-59,0), ACE-2-позитивних клітин - 38,5 у полі зору при збільшенні 200x (21,0-55,0), TMPRSS2-позитивних - 81 у полі зору при збільшенні 200x (63,0-96,0). **Підсумок.** Вивчення ролі рецепторів TMPRSS2 та ACE-2, локалізованих на клітинах ольфакторного епітелію, у розвитку ольфакторних розладів при коронавірусній хворобі 2019, спричиненій SARS-CoV-2, дасть краще наукове розуміння виникнення специфічної для даної хвороби симптоматики.

Ключові слова: одоранти, нюх, ольфакторний епітелій, коронавірусна хвороба 2019, COVID-19, коронавірусна інфекція, SARS-CoV-2, TMPRSS2, ACE-2.