

Изменение экспрессии провоспалительных цитокинов клетками респираторного эпителия *in vitro* при воздействии *Mycoplasma pneumoniae* и рекомбинантного cards-токсина

Глинкина Т. В., Костюк С. А.

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Локальная продукция цитокинов клетками респираторного эпителия играет существенную роль в патогенности и исходе микоплазменной инфекции, поэтому исследование их продукции при активирующем действии *Mycoplasma pneumoniae* и CARDS-токсина может внести существенный вклад в понимание механизмов воспалительных реакций, ассоциированных с инфицированием *Mycoplasma pneumoniae*.

Ключевые слова: *Mycoplasma pneumoniae*, альвеолярные эпителиальные клетки A549, цитокины, рекомбинантный CARDS-токсин.

Введение. *Mycoplasma pneumoniae* является этиологическим фактором около 40 % всех случаев внебольничных пневмоний у взрослых и детей, а также ассоциирована с развитием бронхиальной астмы. Патогенное действие *Mycoplasma pneumoniae* основано на способности данного микроорганизма устанавливать тесный контакт с клетками респираторного эпителия и выделять токсичные для клеток вещества метаболического действия. Одно из таких веществ — токсин, ассоциированный с респираторным дистресс-синдромом (*Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome Toxin, CARDS*) *Mycoplasma pneumoniae* — оказывает прямое цитопатическое действие [1, 2]. Основными биологическими эффектами CARDS-токсина являются способность индуцировать воспалительные реакции в респираторном тракте и через создание соответствующего цитокинового окружения вызывать гиперреактивность дыхательных путей [2].

В экспериментах *in vivo* было показано, что помимо прямого цитопатического действия, *Mycoplasma pneumoniae* способна инициировать массивный воспалительный ответ в легких, сопровождающийся активацией клеток иммунной системы и выработкой широкого спектра цитокинов. Равновесие между эффективным воспалительным ответом и поддержанием целостности ткани легких, обеспечиваемое факторами видовой иммунологической защиты легких, в значительной степени чувствительно к действию различных факторов, включая инфекционные агенты. При инфицировании *Mycoplasma pneumoniae* запускаются иммунологические реакции, сопровождающиеся процессами деструкции легочной ткани [1, 3].

Клетки респираторного эпителия относятся к первому уровню защиты при внедрении в организм *Mycoplasma pneumoniae*. Вырабатываемые ими цитокины инициируют, поддерживают и регулируют реакции видового иммунитета, направленные на элиминирование патогена, а также участвуют во включении в иммунную защиту факторов специфического иммунитета. Ключевыми цитокинами в инициации воспаления и бактерицидных реакций являются цитокины ФНО- α и ИЛ-6, которые вырабатываются различными типами клеток (моноциты, макрофаги, лимфоциты), в том числе и эпителиальными клетками респираторного тракта [3].

Участие ФНО- α и ИЛ-6 в патогенезе заболеваний, ассоциированных с инфицированием *Mycoplasma pneumoniae*, подтверждается обнаружением значимо высоких концентраций данных цитокинов в секретах респираторного тракта и сыворотке крови пациентов с респираторным микоплазмозом, при этом концентрации ФНО- α и ИЛ-6 положительно коррелируют с тяжестью заболеваний, ассоциированных с инфицированием *Mycoplasma pneumoniae* [3].

Результаты исследований *in vitro*, *in vivo* и клинические данные свидетельствуют о том, что существенную роль в патогенезе заболеваний, ассоциированных с инфицированием *Mycoplasma pneumoniae*, принимают такие цитокины, как ИЛ-33 и RANTES, которые также ассоциированы с развитием аллергических заболеваний и астмы [1, 3].

Хемокин RANTES координирует иммунные реакции. Он не только индуцирует хемотаксис иммунных клеток, но и способен вызывать их активацию, сопровождающуюся синтезом молекул адгезии, повышенной продукцией активных форм кислорода и дегрануляцией. RANTES вовлечен в формирование воспалительных реакций, ассоциированных с астмой, через активацию эозинофилов и базофилов [1].

ИЛ-33 — провоспалительный цитокин семейства ИЛ-1, который конститутивно синтезируется эпителиальными клетками и локализуется в ядре, однако при повреждении барьерных тканей (механическое, действие токсинов бактерий) ИЛ-33 выделяется во внеклеточное пространство для активации факторов врожденного иммунитета [4, 5].

Показано, что бронхиальный эпителий является важным резервуаром ИЛ-33 в легких. ИЛ-33 обладает способностью индуцировать продукцию цитокинов, стимулирующих Th2 иммунный ответ (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13), который вовлечен в патогенез аллергических заболеваний и астмы [4, 5].

Поскольку *Mycoplasma pneumoniae* является астма ассоциированным микроорганизмом, а действие CARDS-токсина рассматривается как действие классического аллергена, то представляет интерес изучение продукции хемокина RANTES и цитокина ИЛ-33, которые вырабатываются клетками респираторного эпителия и ассоциированы с развитием аллергических заболеваний и астмы.

Локальная продукция данных цитокинов клетками респираторного эпителия играет существенную роль в патогенности и исходе микоплазменной инфекции, поэтому исследование их продукции при активирующем действии *Mycoplasma pneumoniae* и CARDS-токсина может внести существенный вклад в понимание механизмов данных воспалительных реакций.

Цель работы — оценка влияния *Mycoplasma pneumoniae* и рекомбинантного CARDS-токсина на экспрессию провоспалительных цитокинов клетками респираторного эпителия в эксперименте *in vitro*.

Материалы и методы. *In vitro* моделью культивирования клеток явилась клеточная линия карциномы легкого человека A549. Клетки выращивали во флаконах с поверхностью для роста 75 см² в минимальной поддерживающей среде (MEM-Eagle, *Sigma*) с добавлением 10 % FBS и 1%-ного раствора антибиотиков пенициллин-стрептомицин (*Sigma*, с 10000 единицами пенициллина и 10 мг стрептомицина на 1 мл 0,9 % NaCl) при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂.

Mycoplasma pneumoniae ATCC 15531 выращивали в среде для микоплазм (бульон — основа с добавкой для микоплазм, *Thermo Scientific. Oxoid*) в течение 2–3 недель при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂. Когда среда меняла цвет с красного на желтый, рост *Mycoplasma pneumoniae* считался подтвержденным. Для инфицирования A549 клеток использовались суспензии *Mycoplasma pneumoniae*, соответствующие стандартам МакФарланда 0,5 Ед; 0,25 Ед и 0,1 Ед. Продолжительность составила 4 ч.

Оценивали действие рекомбинантного CARDS-токсина (rCARDS, *MyBioSource*, США) в концентрациях 0,05; 0,5; 5 и 20 мкг на 1 мл среды в лунке планшета с клетками.

Выживаемость клеток при действии различных доз rCARDS-токсина оценивалась в тесте с трипановым синим как относительное количество жизнеспособных клеток. Для этого A549 клетки отделяли с поверхности роста путем обработки 0,25 % трипсином, 20 мкл клеточной суспензии смешивали с 20 мкл 0,4%-ного раствора трипанового синего, в камере Горяева производили подсчет светлых клеток (не содержащие трипановый синий, жизнеспособные) и темных клеток (содержащие включения трипанового синего, нежизнеспособные). Расчет показателя выживаемости (%) проводили по формуле: [количество светлых клеток / (количество темных клеток + количество светлых)].

Через 24, 48 и 72 ч после инфицирования A549 клеток *Mycoplasma pneumoniae* или инкубирования с rCARDS-токсином супернатанты клеточных культур собирали для оценки синтеза провоспалительных цитокинов методом ИФА. RLT лизирующий буфер (*Qiagen*) добавляли в каждую лунку 24-луночных планшетов для лизиса клеток, последующей экстракции РНК и проведения молекулярно-генетического анализа экспрессии генов провоспалительных цитокинов. Суммарную РНК экстрагировали с использованием набора *RNeasy MiniKit* (*Qiagen, Germantown, MD, USA*) равные количества РНК (330 нг) подвергались обратной транскрипции с использованием набора *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (*ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA*). Аликвоты полученных растворов одноцепочечных к ДНК в объеме 1 мкл (16,5 нг) использовали для проведения ПЦР в режиме реального времени (ПЦР РВ) с применением набора *TaqMan Universal PCR Master Mix* (*ThermoFisher Scientific*), итоговый объем ПЦР-реакции составил 10 мкл. Программа амплификации: 50 °С 2 мин, 95 °С 10 мин, 45 циклов при 95 °С в течение 15 с и 60 °С в течение 15 с.

Относительную экспрессию генов цитокинов ФНО- α , RANTES, ИЛ-6 и ИЛ-33 оценивали методом сравнения C_T ($\Delta\Delta C_T$) с использованием GAPDH в качестве референсного гена. ПЦР РВ проводилась с использованием специфических праймеров и проб для каждого гена: ФНО- α Hs01113624_g1 (*Life Technologies*), RANTES Hs00982282_m1 (*Life Technologies*), IL6 Hs00985639_m1 (*Life Technologies*), IL-33 Hs04931857_m1 (*Life Technologies*), GAPDH Hs02786624_g1 (*Life Technologies*).

Концентрации цитокинов ФНО- α , RANTES, ИЛ-6 и ИЛ-33 (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*) в супернатантах клеточных культур определяли методом ИФА в соответствии с инструкциями производителя. Чувствительность анализов составила 5,5 пг/мл, 6,6 пг/мл, 0,7 пг/мл и 1,51 пг/мл соответственно.

Все варианты экспериментального воздействия на A549 клетки были повторены трижды для оценки воспроизводимости результатов исследования. Статистический анализ выполнялся с использованием пакета прикладных программ *Statistica 9*. Медиана и интерквартильный размах использовались для характеристики данных. Критерии Манна – Уитни использовался для определения достоверности различий между группами. Корреляция анализировалась с использованием метода Спирмена. Значения $p < 0,05$ определяли статистическую значимость различий показателей между группами.

Результаты и их обсуждение. Клеточная линия A549 несет характерные признаки альвеолярных клеток 2-го типа и используется для оценки действия инфекционных агентов и биологически активных веществ на альвеолярный эпителий [6, 7].

Инфицирование A549 клеток *Mycoplasma pneumoniae* было подтверждено обнаружением ДНК микроорганизма методом ПЦР в A549 клетках через 24, 48 и 72 ч после замены среды, в контрольных клетках ДНК *Mycoplasma pneumoniae* не была выявлена. Выживаемость A549 клеток спустя 24, 48 и 72 ч после действия CARDS-токсина в различных концентрациях (0,05; 0,5; 5 и 20 мкг) составила 80 % и выше (таблица 1).

Таблица 1 — Значения выживаемости (%) A549 клеток при действии CARDS-токсина, Me [Q₂₅; Q₇₅]

Время инкубации	Контроль	Концентрация CARDS токсина (мкг/мл)			
		0,05	0,5	5	20
24 часа	93,2 [92,6;93,4]	96,3 [95,7;96,7]	95,8 [95,1;96,7]	93,8 [93,3;94,6]	89,4 [88,8;89,8]
48 часов	94,0 [93,6;94,8]	87,9 [86,5;88,4]	91,1 [90,7;91,8]	87,3 [86,9;88,4]	92,9 [91,4;93,4]
72 часа	89,6 [89,0;89,9]	85,6 [85,0;86,1]	86,5 [85,8;87,0]	86,6 [85,7;87,4]	79,9 [79,4;81,2]

При исследовании морфологии A549 клеток в экспериментах с *Mycoplasma pneumoniae* и рекомбинантного CARDS-токсином не наблюдалось признаков цитопатического действия, таких как округление клеток, увеличение в размерах ядер, вакуолизация цитоплазмы, отсутствовали разрывы в монослоях клеток. A549 клетки при действии выбранных для исследования концентраций *Mycoplasma pneumoniae* и рекомбинантного CARDS-токсина сохраняли характерную для них морфологию кубического эпителия (форма гальки) с плотными межклеточными контактами.

По совокупности данных морфологического исследования A549 клеток и оценки их выживаемости можно сделать вывод об отсутствии цитопатического действия *Mycoplasma pneumoniae* и рекомбинантный CARDS-токсина при заданных условиях эксперимента, поэтому предложенная модель использовалась для дальнейшего изучения активирующего действия микроорганизма и его токсина на клетки альвеолярного эпителия *in vitro*.

Было показано, что *Mycoplasma pneumoniae* и CARDS-токсин способны оказывать активирующее действие на A549 клетки и индуцировать экспрессию провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-33, хемокина RANTES как на уровне мРНК, так и белка.

ФНО- α и ИЛ-6 являются важными регуляторами иммунных реакций, локальная выработка которых значима для эффективного элиминирования инфекционных агентов.

Показано, что инфицирование A549 клеток *Mycoplasma pneumoniae* и действие рекомбинантного CARDS-токсина в концентрациях 0,05 и 0,5 мкг/мл не сопровождалось экспрессией ФНО- α и ИЛ-6. В свою очередь стимулирование A549 клеток CARDS-токсином в концентрациях 5 и 20 мкг/мл приводило к увеличению экспрессии ФНО- α в сравнении с контрольными клетками во всех временных промежутках с максимумом через 24 ч после активации клеток CARDS-токсином (таблица 2).

Таблица 2 — Экспрессия (2^{- $\Delta\Delta C_t$}) ФНО- α и ИЛ-6 A549 клетками при действии CARDS-токсина, Me [Q₂₅; Q₇₅]

Условия эксперимента	24 ч	48 ч	72 ч
ФНО- α			
CARDS 5	2,5 [2,4;2,8]	2,2 [1,85;2,5]	1,4 [1,3;1,6]
CARDS 20	6,6 [6,0;6,9]	4,7 [4,05;5,0]	3,9 [3,0;4,15]
ИЛ-6			
CARDS 5	2,3 [1,95;2,85]	5,3 [5,05;5,85]	2,2 [1,85;2,6]
CARDS 20	6,1 [5,9;6,25]	10,1 [9,9;10,9]	6,3 [5,9;6,9]

Поскольку ФНО- α способен через систему транскрипционных факторов инициировать экспрессию гена ИЛ-6, то закономерным результатом стало обнаружение повышенной экспрессии ИЛ-6 при действии CARDS-токсина в концентрациях 5 и 20 мкг/мл (таблица 2). Экспрессия ИЛ-6 являлась максимальной через 48 часов после активации A549 клеток CARDS-токсином.

Наиболее чувствительным маркером инфицирования *Mycoplasma pneumoniae* и действия CARDS-токсина на A549 клетки стал хемокин RANTES (таблица 3). Экспрессия гена RANTES и продукция белка повышались при действии патогена и его токсина. Уровни RANTES положительно коррелировали с концентрацией *Mycoplasma pneumoniae* во временном промежутке 24 ч после инфицирования и с дозами токсина ($r = 0,738-0,963$; $p < 0,05$).

Полученные нами результаты соответствуют результатам экспериментов *in vitro* и *in vivo*, в которых анализировалась продукция RANTES в ответ на инфицирование *Mycoplasma pneumoniae*. Также у детей с микоплазменной пневмонией наблюдалось повышенное содержание RANTES в сыворотке крови, при этом концентрация хемокина RANTES коррелировала с тяжестью заболевания [1, 2].

Таблица 3 — Экспрессия ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) RANTES A549 клетками в экспериментах с *Mycoplasma pneumoniae* и CARDS токсином, Me [Q_{25} ; Q_{75}]

Условия эксперимента	24 часа	48 часов	72 часа
Мр 0,1 Ед	1,5 [1,3;2,8]	2,7 [2,2;4,5]	2,1 [1,75;3,25]
Мр 0,25 Ед	2,2 [1,75;3,55]	3,2 [2,5;3,8]	6,8 [3,85;8]
Мр 0,5 Ед	10,3 [9,35;11,65]	5,2 [4,95;7,4]	5,4 [4,25;8,9]
CARDS 0,05	6,4 [4,5;7,7]	1,4 [1,15;4,2]	2,2 [1,8;2,55]
CARDS 0,5	8,5 [6,6;10,45]	3,7 [2,9;6,2]	4,9 [3,8;5,1]
CARDS 5	22,5 [18,95;24,25]	10,7 [9,75;12,15]	7,7 [6,8;8,65]
CARDS 20	53,7 [49,25;56,35]	32,6 [30,9;36,95]	16,8 [15,55;20,15]

Таким образом, поскольку основные изменения в экспрессии цитокинов ФНО- α , ИЛ-6, хемокина RANTES наблюдались в первые сутки после инфицирования, то данные цитокины можно рассматривать как маркеры раннего ответа клеток альвеолярного эпителия на инфицирование *Mycoplasma pneumoniae* и действие CARDS-токсина.

Основные изменения в экспрессии гена и продукции ИЛ-33 наблюдались через 48 часов после инфицирования *Mycoplasma pneumoniae* и действия CARDS-токсина. Выход ИЛ-33 в клеточные супернатанты составил: 10,5 [9,75;13,75], 24,4 [22,2;30,0] и 60,0 [56,8;61,35] пг/мл при инфицировании *Mycoplasma pneumoniae* в концентрациях 0,1; 0,25 и 0,5 ЕД Мак Фарланда, 18,5 [15,5;21,0], 34,6 [31,25;40,1], 68,0 [60,0;76,5] и 105,4 [90,45;129,7] пг/мл при действии CARDS-токсина в концентрациях 0,05; 0,5; 5 и 20 мкг/мл соответственно. Концентрации ИЛ-33 положительно коррелировали с концентрациями *Mycoplasma pneumoniae* и CARDS-токсина ($r = 0,949-0,963$; $p < 0,05$).

ИЛ-33 является важным регулятором как врожденного, так и приобретенного иммунитета, участвует в формировании аллергических реакций, астмы, поэтому повышение экспрессии гена и продукции данного цитокина может играть существенную роль в формировании аллергического ответа при инфицировании *Mycoplasma pneumoniae*. В свою очередь *Mycoplasma pneumoniae* как преимущественно внеклеточный патоген взаимодействует с сурфактантом легких, поэтому представляет интерес изучение модулирующего влияния компонентов сурфактанта легких на продукцию ИЛ-33 клетками альвеолярного эпителия при инфицировании *Mycoplasma pneumoniae* и действии CARDS-токсина.

Заключение. Таким образом, A549 клетки реагируют на инфицирование *Mycoplasma pneumoniae* и действие CARDS-токсина выработкой цитокинов, которые принимают участие в регуляции воспаления и иммунного ответа.

Спектр и динамика выработки цитокинов в параллельных экспериментах с *Mycoplasma pneumoniae* и CARDS отличались, что может свидетельствовать о том, что для реализации патогенного потенциала *Mycoplasma pneumoniae* значимо не только присутствие жизнеспособного патогена, но и выделение в биотоп инфицирования основного фактора патогенности *Mycoplasma pneumoniae* — CARDS-токсина.

Действие CARDS-токсина оказывало наиболее существенное активирующее влияние в отношении продукции провоспалительных цитокинов A549 клетками. Присутствие в среде культивирования CARDS-токсина в концентрациях 5 и 20 мкг/мл сопровождалось увеличением экспрессии ФНО- α , ИЛ-6, хемокина RANTES, ИЛ-33 ($p < 0,05$). *Mycoplasma pneumoniae* в отсутствие CARDS-токсина была не способна индуцировать выработку A549 клетками таких провоспалительных цитокинов, как ФНО- α , ИЛ-6, при этом действие патогена сопровождалось повышенной экспрессией RANTES, ИЛ-33 ($p < 0,05$).

Литература

1. Parrott, G. L. A compendium for *Mycoplasma pneumoniae* [Electronic resource] / G. L. Parrott, T. Kinjo, J. Fujita // Front Microbiol. — 2016. — Vol. 7. — Art. 513.
2. Structure of CARDS toxin, a unique ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin from *Mycoplasma pneumoniae* / A. Becker [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2015. — Vol. 112, № 16. — P. 5165–5170.
3. *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin induces pulmonary eosinophilic and lymphocytic inflammation / J. L. Medina [et al.] // Am J Respir Cell Mol Biol. — 2012. — Vol. 46, № 6. — P. 815–822.
4. Differential chemokine expression patterns in tonsillar disease / M. Mandapathil [et al.] // Acta Otorhinolaryngol Ital. — 2018. — Vol. 38, № 4. — P. 316–322.

5. Molofsky, A. B. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury and inflammation / A. B. Molofsky, A. Savage, R. M. Lockley // *Immunity*. — 2015. — Vol.42, № 6. — P. 1005–1019.
6. Tumor necrosis factor- α regulates interleukin-33 expression through extracellular signal-regulated kinase, p38, and nuclear factor- κ B pathways in airway epithelial cells / I. H. Park [et al.] // *Int Forum Allergy Rhinol*. — 2016. — Vol. 6, № 9. — P. 973–980.
7. Global secretome characterization of A549 human alveolar epithelial carcinoma cells during *Mycoplasma pneumoniae* infection [Electronic resource] / S. Li [et al.] // *BMC Microbiol*. — 2014. — Vol. 14. — Art. 27.

Changes in expression of inflammatory cytokines by respiratory epithelial cells activated with mycoplasma pneumoniae and recombinant cards-toxin in vitro

Hlinkina T. V., Kastsjuk S. A.

*State Educational Institution “The Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education”,
Minsk, Republic of Belarus*

The local production of cytokines by respiratory epithelial cells plays a significant role in the pathogenicity and outcome of *Mycoplasma pneumoniae* infection. The study of cytokines release in response to *Mycoplasma pneumoniae* and CARDS-toxin activation can greatly contribute to understanding of the mechanisms of inflammatory reactions associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection.

Keywords: *Mycoplasma pneumoniae*, alveolar epithelial cells A549, cytokines, recombinant CARDS-toxin.

Поступила 23.09.2019