

ВЛИЯНИЕ MYCOPLASMA PNEUMONIAE И РЕКОМБИНАНТНОГО CARDS-ТОКСИНА НА КЛЕТКИ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА: ЭФФЕКТЫ ПРОТЕИНА А СУРФАКТАНТА НА ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМА IN VITRO

Глинкина Т. В., Костюк С. А., Руденкова Т. В., Полуян О. С.

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Введение. *M. pneumoniae* и CARDS-токсин взаимодействуют с клетками респираторного эпителия в присутствии протеина А сурфактанта (SP-A).

Цель исследования. Оценить влияние *M. pneumoniae* и CARDS-токсина на экспрессию провоспалительных цитокинов клетками респираторного эпителия *in vitro*, определить роль SP-A в проявлении патогенных свойств *M. pneumoniae*.

Материал и методы. A549 клетки активировали *M. pneumoniae* и рекомбинантным CARDS-токсином (rCARDS), SP-A человека использовали для преинкубирования клеток. Оценивалась экспрессия ФНО-α, ИЛ-6, RANTES и ИЛ-33.

Результаты. Присутствие SP-A сопровождалось усилением экспрессии A549 клетками ФНО-α, ИЛ-6, RANTES и ограничивало продукцию ИЛ-33, ассоциированного с аллергией.

Выводы. SP-A регулирует взаимодействие между *M. pneumoniae*, rCARDS и A549 клетками путем модулирования экспрессии цитокинов.

Ключевые слова: микоплазма пневмонии, альвеолярные эпителиальные клетки, цитокины, легочный сурфактант-ассоциированный белок А.

Для цитирования: Влияние *Mycoplasma pneumoniae* и рекомбинантного CARDS-токсина на клетки альвеолярного эпителия человека: эффекты протеина а сурфактанта на патогенные свойства микроорганизма *in vitro* / Т. В. Глинкина, С. А. Костюк, Т. В. Руденкова, О. С. Полуян // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2019. Т. 17, № 2. С. 176-181. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2019-17-2-176-181>

Введение

Mycoplasma pneumoniae является этиологическим фактором около 40% всех случаев внебольничных пневмоний у взрослых и детей, а также ассоциирована с развитием бронхиальной астмы. Механизм патогенного действия *Mycoplasma pneumoniae* основан 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*, взаимодействует с высокой степенью аффинности с протеином А сурфактанта (SP-A) и оказывает прямое цитопатическое действие [1, 2].

Клетки респираторного эпителия относятся к первому уровню защиты при внедрении в организм *Mycoplasma pneumoniae*. Вырабатываемые ими цитокины иницируют, поддерживают и регулируют реакции видового иммунитета, направленные на элиминирование патогена, а также участвуют во включении в иммунную защиту факторов специфического иммунитета [1].

Ключевыми цитокинами в инициации воспаления и бактерицидных реакций являются цитокины ФНО-α и ИЛ-6, которые вырабатываются разными типами клеток (моноциты, макрофаги, лимфоциты), в том числе и эпителиальными клетками респираторного тракта. Локальная продукция данных цитокинов клетками респираторного эпителия играет существенную роль в

патогенности и исходе микоплазменной инфекции, поэтому исследование их продукции при активизирующем действии *Mycoplasma pneumoniae* и CARDS-токсина может внести существенный вклад в понимание механизмов воспалительных реакций, ассоциированных с инфицированием *Mycoplasma pneumoniae* [3]. Поскольку *Mycoplasma pneumoniae* является астма ассоциированным микроорганизмом [4], а действие CARDS-токсина рассматривается как действие классического аллергена [5], представляет интерес изучение продукции хемокина RANTES и цитокина ИЛ-33, которые вырабатываются клетками респираторного эпителия и ассоциированы с развитием аллергических заболеваний и астмы [6, 7]. RANTES вовлечен в формирование воспалительных реакций, ассоциированных с астмой, через активацию эозинофилов и базофилов [6]. ИЛ-33 обладает способностью индуцировать продукцию цитокинов, стимулирующих Th2 иммунный ответ Тх2 иммунный ответ, которому отводится ключевая роль в возникновении и поддержании аллергического воспаления [7].

Mycoplasma pneumoniae как преимущественно внеклеточный патоген взаимодействует с SP-A легких. SP-A участвует в модуляции иммунных реакций в легких: он способствует поступлению патогенов в фагоциты, стимулирует внутриклеточный лизис, ограничивает активацию дендритных клеток и Т-клеток; эффекты SP-A в отношении продукции провоспалительных цитокинов могут быть как ингибирую-

щие, так и стимулирующие. В исследованиях *in vitro* показано, что SP-A способен связывать *Mycoplasma pneumoniae* и оказывать бактериостатический эффект [8, 9]. Однако немного известно о модулирующем влиянии SP-A на продукцию провоспалительных цитокинов клетками альвеолярного эпителия *in vitro* при инфицировании *Mycoplasma pneumoniae* и действии CARDS-токсина.

Цель исследования – оценить влияние *Mycoplasma pneumoniae* и CARDS-токсина на экспрессию провоспалительных цитокинов клетками респираторного эпителия *in vitro*, определить роль SP-A в проявлении патогенных свойств *Mycoplasma pneumoniae*.

Материал и методы

Исследование выполнено на базе лаборатории иммунологии, ревматологии и аллергологии Медицинского университета в г. Лодзи, Польша.

Культивирование клеток. *In vitro* моделью стала клеточная линия карциномы легких человека A549. Источник: американская коллекция типовых культур ATCC (CCL-185). Клетки выращивали во флаконах с поверхностью для роста 75 см² в минимальной поддерживающей среде (MEM-Eagle, Sigma) с добавлением 10% FBS и 1% раствора антибиотиков пенициллин-стрептомицин (Sigma, с 10000 единицами пенициллина и 10 мг стрептомицина на 1 мл 0,9% NaCl) при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Когда клетки достигали 80-90% конфлюэнтности, их отделяли с поверхности роста путем обработки 0,25% трипсином и субкультивировали.

Подготовка *Mycoplasma pneumoniae* для инфицирования A549 клеток. *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°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Когда среда меняла цвет с красного на желтый, рост *Mycoplasma pneumoniae* считался подтвержденным.

Инфицирование A549 клеток *Mycoplasma pneumoniae*. В экспериментах использовали A549 клетки пассажей 9-10. После того как клетки достигали 80-90% конфлюэнтности в монолоях, их высевали в 24-луночные планшеты в концентрации 5×10⁵ клеток на лунку и инкубировали в течение 24 часов при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ для достижения 100% конфлюэнтности. Для инфицирования A549 клеток использовались суспензии *Mycoplasma pneumoniae*, соответствующие стандартам Мак-Фарланда 0,5 Ед; 0,25 Ед и 0,1 Ед. Продолжительность инфицирования клеток составила 4 часа, затем среду с *Mycoplasma pneumoniae* заменяли на среду без микроорганизма.

Инкубирование A549 клеток с CARDS-токсином. 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 разных доз rCARDS-токсина оценивалась в тесте с трипановым синим.

Инкубирование A549 клеток с SP-A. SP-A человека был любезно предоставлен доктором Аластером Уотсоном, Саутгемптонский университет, Англия. SP-A выделен из БАЛ пациентов с альвеолярным протеинозом методом экстракции с бутанолом согласно Wright et al., 1987. A549 клетки, перенесенные в 24-луночный планшет, инкубировали с 7 мкг SP-A в течение 30 минут при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Концентрация SP-A находилась в пределах физиологических значений его содержания в легких. Затем клетки инфицировали *Mycoplasma pneumoniae* или добавляли rCARDS-токсин.

Через 24, 48 и 72 часа 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.

Выделение РНК и анализ экспрессии генов цитокинов. Суммарную РНК экстрагировали из A549 клеток с использованием набора RNeasy MiniKit (Qiagen, Germantown, MD, USA). Количество и качество выделенной РНК оценивали путем измерения оптической плотности растворов РНК на длинах волн 260 и 280 нм с помощью спектрофотометра NanoDropTM Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific), рассчитывали отношение абсорбций 260 нм/280 нм.

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 кДНК 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) на приборе StepOnePlus Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific), итоговый объем ПЦР-реакции составил 10 мкл. Программа амплификации: 50°C 2 минуты; 95°C 10 минут; 45 циклов при 95°C в течение 15 секунд и 60°C в течение 15 секунд.

Относительную экспрессию генов цитокинов ФНО-α, RANTES, ИЛ-6 и ИЛ-33 оценивали методом сравнения СТ (ΔΔСТ) 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).

Определение концентраций цитокинов в супернатантах клеточных культур. Концентрации ФНО-α, RANTES, ИЛ-6 и ИЛ-33 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) определяли методом ИФА в соответствии с инструкциями к

наборам производителя. Чувствительность анализов составила 5,5 пг/мл, 6,6 пг/мл, 0,7 пг/мл и 1,51 пг/мл, соответственно.

Статистический анализ. 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. Критерий Манна-Уитни применялся 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 обсуждение

Клеточная линия A549 несет все характерные признаки альвеолярных клеток 2-го типа и широко используется для оценки действия разного рода инфекционных агентов и биологически активных веществ на альвеолярный эпителий [10, 11].

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

При исследовании морфологии A549 клеток в экспериментах с *Mycoplasma pneumoniae* и CARDS-токсином не наблюдалось признаков цитопатического действия, таких как округление клеток, увеличение ядер в размерах, вакуолизация цитоплазмы, отсутствовали разрывы в монослоях клеток. A549 клетки при действии выбранных для исследования концентраций *Mycoplasma pneumoniae* и 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 CARDS-токсина при заданных условиях эксперимента, поэтому предложенная модель взаимодействия *Mycoplasma pneumoniae* и CARDS-токсина с A549 клетками использовалась для дальнейшего изучения активирующего действия микроорганизма и его токсина на клетки альвеолярного эпителия.

Показано, что инфицирование A549 клеток *Mycoplasma pneumoniae* и действие 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 часа после активации клеток CARDS-токсином (табл. 1).

При стимулировании клеток токсином в дозах 5 и 20 мкг/мл SP-A не оказывал протективного эффекта, выражающегося в снижении продукции ФНО- α и ИЛ-6. Напротив, экспрессия данных цитокинов в условиях предварительной инкубации клеток с SP-A с последующим добавлением токсина была значимо выше, чем при отсутствии белка (табл. 1). Можно сделать вывод, что SP-A, который способен взаимодействовать с CARDS-токсином, потенцирует его активирующее действие на клетки респираторного эпителия, что сопровождается повышением выработки провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-6.

Наиболее чувствительным маркером инфицирования *Mycoplasma pneumoniae* и действия CARDS-токсина на A549 клетки стал хемокин RANTES. 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 часа после инфицирования и с дозами токсина ($r=0,738-0,963$; $p < 0,05$).

Таблица 1. – Экспрессия (2- $\Delta\Delta Ct$) ФНО- α и ИЛ-6 A549 клетками при действии CARDS-токсина, Me [Q25; Q75]

Table 1. – TNF- α expression (2- $\Delta\Delta Ct$) by A549 cells under CARDS-toxin activation

Условия эксперимента	24 часа	48 часов	72 часа
ФНО- α			
CARDS 5	2,5 [2,4; 2,8]	2,2 [1,85; 2,5]	1,4 [1,3; 1,6]
SP-A+CARDS 5	5,8* [5,6; 6,55]	4,8* [4,95; 4,7]	4,8* [4,15; 4,95]
CARDS 20	6,6 [6,0; 6,9]	4,7 [4,05; 5,0]	3,9 [3,0; 4,15]
SP-A+CARDS 20	41,5* [39,55; 42,0]	31,6* [27,4; 32,9]	29,8* [27,05; 30,0]
ИЛ-6			
CARDS 5	2,3 [1,95; 2,85]	5,3 [5,05; 5,85]	2,2 [1,85; 2,6]
SP-A+CARDS 5	5,2* [4,7; 5,75]	9,1* [8,85; 9,55]	6,6* [6,55; 7,25]
CARDS 20	6,1 [5,9; 6,25]	10,1 [9,9; 10,9]	6,3 [5,9; 6,9]
SP-A+CARDS 20	16,5* [14,45; 17,05]	35,0* [33,25; 37,8]	10,3* [9,6; 11,2]

Примечание: * – различия значимы с уровнем значимости $p < 0,05$

Предварительное добавление SP-A в среду культивирования клеток сопровождалось значимым снижением экспрессии RANTES через 24 часа после инфицирования *Mycoplasma pneumoniae*, действие CARDS-токсина сопровождалось увеличением экспрессии RANTES (табл. 2).

Основные изменения в экспрессии гена и продукции ИЛ-33 наблюдались через 48 ч 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 МакФарланда, 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 ($r=0,949-0,963$; $p<0,05$).

После инкубации A549 клеток с SP-A и последующего стимулирующего действия *Mycoplasma pneumoniae* и CARDS-токсина выход ИЛ-33 в среду культивирования был значимо снижен в сравнении с экспериментами без преинкубации клеток с SP-A: 4,2 [3,95; 5,0], 8,6 [6,25; 8,65] и 17,6 [15,9; 19,85] пг/мл при инфицировании *Mycoplasma pneumoniae* в концентрациях 0,1; 0,25 и 0,5 ЕД МакФарланда, 9,7 [8,15; 10,25], 17,7 [16,2; 21,95], 23,8 [16,15; 30,9] и 56,0 [55,5; 62,2] пг/мл при действии CARDS-токсина в концентрациях 0,05; 0,5; 5 и 20 мкг/мл, соответственно.

Выводы

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 различались, 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* при отсутствии CARDS-токсина была неспособна индуцировать выработку A549 клетками таких провоспалительных цитокинов, как ФНО- α , ИЛ-6, при этом действие патогена сопровождалось повышенной экспрессией RANTES, ИЛ-33 ($p<0,05$).

Добавление в среду культивирования SP-A, выполняющего роль адьюванта местного иммунитета в легких, и последующее инфицирование *Mycoplasma pneumoniae* приводило к значимому снижению экспрессии хемокина RANTES через 24 часа. Действие CARDS токсина в условиях преинкубирования A549 клеток с SP-A сопровождалось повышением экспрессии цитокинов ФНО- α , ИЛ-6, в то время как продукция ИЛ-33 снижалась ($p<0,05$). Действие *Mycoplasma pneumoniae* в присутствии SP-A также сопровождалось значимым снижением продукции ИЛ-33. Эффект SP-A в отношении ограничения продукции ИЛ-33 при микоплазменной инфекции

Таблица 2. – Экспрессия (2- $\Delta\Delta C_t$) RANTES A549 клетками в экспериментах с *Mycoplasma pneumoniae* и CARDS токсином, Me [Q25; Q75]

Table 2. – RANTES expression (2- $\Delta\Delta C_t$) by A549 cells in experiments with *Mycoplasma pneumoniae* and CARDS-toxin, Me [Q25; Q75]

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]
SP-A+Мр 0,1 Ед	0,2* [0,15; 0,3]	2,8 [2,35; 3,0]	1,8 [1,45; 2,05]
Мр 0,25 Ед	2,2 [1,75; 3,55]	3,2 [2,5; 3,8]	6,8 [3,85; 8]
SP-A+Мр 0,25 Ед	0,4* [0,35; 0,5]	5,7 [3,8; 6,7]	3,3 [2,8; 3,75]
Мр 0,5 Ед	10,3 [9,35; 11,65]	5,2 [4,95; 7,4]	5,4 [4,25; 8,9]
SP-A+Мр 0,5 Ед	0,3* [0,25; 0,4]	3,9 [3,4; 6,15]	6,3 [4,45; 6,6]
CARDS 0,05	6,4 [4,5; 7,7]	1,4 [1,15; 4,2]	2,2 [1,8; 2,55]
SP-A+CARDS 0,05	15,3* [12,85; 18,85]	7,3 [5,05; 10,6]	3,5 [2,85; 4,65]
CARDS 0,5	8,5 [6,6; 10,45]	3,7 [2,9; 6,2]	4,9 [3,8; 5,1]
SP-A+CARDS 0,5	35,4* [29,85; 38,8]	17,4 [10,3; 20,3]	6,4 [5,85; 12,9]
CARDS 5	22,5 [18,95; 24,25]	10,7 [9,75; 12,15]	7,7 [6,8; 8,65]
SP-A+CARDS 5	68,4* [62,55; 71,85]	47,3* [35,95; 51,65]	25,2* [23,9; 33,35]
CARDS 20	53,7 [49,25; 56,35]	32,6 [30,9; 36,95]	16,8 [15,55; 20,15]
SP-A+CARDS 20	164,8* [149,15; 185,55]	143,6* [96,6; 228,9]	57,2* [49,25; 86,25]

Примечание: * – различия значимы с уровнем значимости $p<0,05$

может быть существенным в снижении риска формирования аллергического ответа при инфицировании *Mycoplasma pneumoniae*.

Особую благодарность выражаем профессору Мареку Л. Ковальскому, доктору медицин-

ских наук, заведующему кафедрой иммунологии, ревматологии и аллергологии Медицинского университета в г. Лодзи, Польша, за организационно-методическую поддержку проведения исследований.

Литература

1. Parrott, G. L. A compendium for *Mycoplasma pneumoniae* / G. L. Parrott, T. Kinjo, J. Fujita // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 513. – doi: 10.3389/fmicb.2016.00513.
2. Structure of CARDS toxin, a unique ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin from *Mycoplasma pneumoniae* / A. Becker [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – Vol. 112 (16). – P. 5165-5170. – doi: 10.1073/pnas.1420308112.
3. Bai, D. The effect of down-regulation of CCL5 on lipopolysaccharide-induced WI-38 fibroblast injury: a potential role for infantile pneumoniae / D. Bai, A. Han, S. Cong // *Iranian journal of basic medical sciences*. – 2018. – Vol. 21 (5). – P. 449-454. – doi: 10.22038/IJBMS.2018.27165.6640.
4. Yin, S. S. Association of *Mycoplasma pneumoniae* infection with increased risk of asthma in children / S. S. Yin, F. L. Ma, X. Gao // *Experimental and therapeutic medicine*. – 2017. – Vol. 13 (5). – P. 1813-1819. – doi: 10.3892/etm.2017.4219.
5. *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin induces pulmonary eosinophilic and lymphocytic inflammation / J. L. Medina [et al.] // *American journal of respiratory cell and molecular biology*. – 2012. – Vol. 46 (6). – P. 815-822. – doi: 10.1165/rcmb.2011-0135OC.
6. Differential chemokine expression patterns in tonsillar disease / M. Mandapathil [et al.] // *Acta otorhinolaryngologica Italica*. – 2018. – Vol. 38 (4). – P. 316-322. – doi: 10.14639/0392-100X-1743.
7. 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. – doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.006.
8. Surfactant protein-A inhibits *Mycoplasma*-induced dendritic cell maturation through regulation of HMGB-1 cytokine activity / J. G. Ledford [et al.] // *Journal of immunology*. – 2010. – Vol. 185 (7). – P. 3884-3894. – doi: 10.4049/jimmunol.1000387.
9. Mast cell TNF receptors regulate responses to *Mycoplasma pneumoniae* in surfactant protein A (SP-A) ^{-/-} mice / B. J. Hsia [et al.] // *The Journal of allergy and clinical immunology*. – 2012. – Vol. 130 (1). – P. 205-214. – doi: 10.1016/j.jaci.2012.03.002.
10. 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.] // *International forum of allergy & rhinology*. – 2016. – Vol. 6 (9). – P. 973-980. – doi: 10.1002/alr.21761.
11. Global secretome characterization of A549 human alveolar epithelial carcinoma cells during *Mycoplasma pneumoniae* infection / S. Li [et al.] // *BMC Microbiology*. – 2014. – Vol. 14. – P. 27. – doi: 10.1186/1471-2180-14-27.

References

1. Parrott GL, Kinjo T, Fujita J. A compendium for *Mycoplasma pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:513. doi: 10.3389/fmicb.2016.00513.
2. Becker A, Kannan TR, Taylor AB, Pakhomova ON, Zhang Y, Somarajan SR, Galaleldeen A, Holloway SP, Baseman JB, Hart PJ. Structure of CARDS toxin, a unique ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin from *Mycoplasma pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(16):5165-5170. doi: 10.1073/pnas.1420308112.
3. Bai D, Han A, Cong S. The effect of down-regulation of CCL5 on lipopolysaccharide-induced WI-38 fibroblast injury: a potential role for infantile pneumonia. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2018;21(5):449-454. doi: 10.22038/IJBMS.2018.27165.6640.
4. Yin SS, Ma FL, Gao X. Association of *Mycoplasma pneumoniae* infection with increased risk of asthma in children. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017;13(5):1813-1819. doi: 10.3892/etm.2017.4219.
5. Medina JL, Coalson JJ, Brooks EG, Winter VT, Chaparro A, Principe MFR, Kannan TR, Baweman JB, Dube PH. *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin induces pulmonary eosinophilic and lymphocytic inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2012;46(6):815-822. doi: 10.1165/rcmb.2011-0135OC.
6. Mandapathil M, Beler UH, Graefe H, Kröger B, Hedderich J, Maune S, Meyer J E. Differential chemokine expression patterns in tonsillar disease. *Acta otorhinolaryngologica Italica*. 2018;38(4):316-322. doi: 10.14639/0392-100X-1743.
7. Molofsky AB, Savage AK, Lockley RM. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury and inflammation. *Immunity*. 2015;42(6):1005-1019. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.006.
8. Ledford JG, Lo B, Kislan MM, Thomas JM, Evans K, Cain DW, Kraft M, Williams KL, Wright JR. Surfactant protein-A inhibits *Mycoplasma*-induced dendritic cell maturation through regulation of HMGB-1 cytokine activity. *Journal of immunology*. 2010;185(7):3884-3894. doi: 10.4049/jimmunol.1000387.
9. Hsia BJ, Ledford JG, Potts-Kant EN, Nikam VS, Lugogo NL, Foster WM, Kraft M, Abraham SN, Wright JR. Mast cell TNF receptors regulate responses to *Mycoplasma pneumoniae* in surfactant protein A (SP-A) ^{-/-} mice. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;130(1):205-214. doi: 10.1016/j.jaci.2012.03.002.
10. Park IH, Park JH, Shin JM, Lee HM. Tumor necrosis factor- α regulates interleukin-33 expression through extracellular signal-regulated kinase, p38, and nuclear factor- κ B pathways in airway epithelial cells. *International forum of allergy & rhinology*. 2016;6(9):973-980. doi: 10.1002/alr.21761.
11. Li S, Li X, Wang Y, Yang J, Chen Zh, Shan Sh. Global secretome characterization of A549 human alveolar epithelial carcinoma cells during *Mycoplasma pneumoniae* infection. *BMC Microbiology*. 2014;14:27. doi: 10.1186/1471-2180-14-27.

THE INFLUENCE OF MYCOPLASMA PNEUMONIAE AND RECOMBINANT CARDS TOXIN ON THE HUMAN LUNG EPITHELIAL CELLS: THE EFFECT OF SURFACTANT PROTEIN A ON THE MICROORGANISM PATHOGENICITY IN VITRO

Hlinkina T. V., Kostiuk S. A., Rudenkova T. V., Poluyan O. S.

Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Background: M. pneumoniae and CARDS toxin interact with respiratory epithelium in the presence of surfactant protein A (SP-A).

Objective of the study was to estimate the production of proinflammatory cytokines from human lung epithelial cells activated with M. pneumoniae and CARDS toxin as well as to study the influence of SP-A on M. pneumoniae pathogenicity.

Material and Method: SP-A treated and not-treated A549 cells were activated with M. pneumoniae and recombinant CARDS (rCARDS) toxin. TNF- α , IL-6, RANTES and IL-33 were analyzed.

Results: Pre-treatment with SP-A enhanced RANTES, TNF- α and IL-6 production and prevented cells from increased release of the allergy associated cytokine IL-33.

Conclusion: SP-A regulates the interaction between M. pneumoniae, rCARDS and A549 cells by modulating the cytokine release.

Keywords: *Mycoplasma pneumoniae, respiratory epithelium, cytokines, pulmonary surfactant-associated protein A*

For citation: *Hlinkina TV, Kostiuk SA, Rudenkova TV, Poluyan OS. The influence of Mycoplasma pneumoniae and recombinant CARDS-toxin on the human lung epithelial cells: the effect of surfactant protein a on the microorganism pathogenicity in vitro. Journal of the Grodno State Medical University. 2019;17(2):176-181. <https://doi.org/10.2598/2221-8785-2019-17-2-176-181>*

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках программы научных стипендий для молодых ученых Европейской Академии по аллергологии и клинической иммунологии.

Financing. The study was carried out within the framework of the program of scientific scholarships for young scientists of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Об авторах / About the authors

Глинкина Татьяна Владимировна / Hlinkina Tatsiana, e-mail: kuklitsk@mail.ru

Костюк Светлана Андреевна / Kostiuk Svetlana, e-mail: s.kostiuk@mail.ru, ORCID: 0000-0002-3252-2626

*Руденкова Татьяна Владимировна / Rudenkova Tatsiana, e-mail: t.rudenkova@mail.ru, ORCID: 0000-0002-8917-6816

Полуян Ольга Сергеевна / Poluyan Olga, e-mail: ol_chic@mail.ru

* – автор, ответственный за переписку / corresponding author

Поступила / Received: 14.12.2018

Принята к публикации / Accepted for publication: 22.03.2019