

УДК 577.24:616.24:615.015.44

DOI: 10.36604/1998-5029-2020-77-29-33

TRPA1-ОПОСРЕДОВАННАЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ РЕАКЦИЯ КЛЕТОК АЛЬВЕОЛЯРНОГО ЭПИТЕЛИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*

Д.А.Гассан, О.О.Котова, Д.Е.Наумов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

РЕЗЮМЕ. Введение. TRPA1-каналы неоднократно изучались в экспериментальных моделях воспаления. В современной литературе есть данные, подтверждающие экспрессию рецепторов TRPA1 на клетках альвеолярного эпителия. Одним из известных природных агонистов данных каналов является циннамальдегид (СА). **Цель.** Оценка влияния TRPA1-рецепторов на развитие воспалительной реакции в клетках альвеолярного эпителия A549, выступающей в качестве модели воспаления в респираторном тракте *in vitro*. **Материалы и методы.** В качестве материала для исследования был отобран супернатант клеточной культуры аденокарциномы человека A549 после воздействия различных доз СА. В образцах были определены уровни 13 цитокинов. **Результаты.** Было обнаружено, что клетки A549 продуцируют такие цитокины как MCP1, IL6, IL8, IL33. Установлено, что при воздействии СА в низких концентрациях продукция MCP1, IL6 и IL8 увеличивалась, а под воздействием высоких концентраций, напротив, снижалась. В условиях предварительной экспозиции с селективным антагонистом TRPA1 (HC-030031) последующая стимуляция СА 100 мкМ не вызывала увеличения концентрации цитокинов. **Заключение.** Таким образом, были продемонстрированы особенности TRPA1-опосредованного воспалительного ответа на модели альвеолярного эпителия A549 *in vitro*.

Ключевые слова: воспаление, TRPA1, A549, цитокины.

TRPA1-MEDIATED INFLAMMATORY RESPONSE OF ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS IN VITRO EXPERIMENT

D.A.Gassan, O.O.Kotova, D.E.Naumov

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

SUMMARY. Introduction. TRPA1 channels have been repeatedly studied in experimental models of inflammation. There are evidences in the modern literature confirming the expression of TRPA1 receptors on the alveolar epithelial cells. One of the known natural agonists of these channels is cinnamaldehyde (CA). **Aim.** To evaluate the effect of TRPA1 receptors on the development of an inflammatory response in A549 alveolar epithelial cells, as an *in vitro* model of inflammation in the respiratory tract. **Materials and methods.** The supernatant of A549 human adenocarcinoma cell culture was collected after exposure to various doses of CA and the levels of 13 cytokines were determined in the samples. **Results.** It has been found that A549 cells produce such cytokines as MCP-1, IL6 and IL8 and IL33. It was established that, when exposed to CA at low concentrations, the production of MCP-1, IL6 and IL8 increased, but high concentrations of CA conversely decreased production of the cytokines. Under preliminary exposition with TRPA1 selective antagonist (HC-030031) subsequent stimulation with 100 μ M CA did not elicit increase in cytokines concentration. **Conclusion.** Thus, we demonstrated the peculiarities of TRPA1-mediated inflammatory response in *in vitro* model of A549 alveolar epithelium.

Key words: inflammation, TRPA1, A549, cytokines.

Контактная информация

Дина Анатольевна Гассан, канд. мед. наук, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, Россия, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22. E-mail: dani-shi@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Dina A. Gassan, MD, PhD (Med.), Junior Staff Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation. E-mail: dani-shi@mail.ru

Для цитирования:

Гассан Д.А., Котова О.О., Наумов Д.Е. TRPA1-опосредованная воспалительная реакция клеток альвеолярного эпителия в эксперименте *in vitro* // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2020. Вып. 77. С.29–33. DOI: 10.36604/1998-5029-2020-77-29-33

For citation:

Gassan D.A., Kotova O.O., Naumov D.E. TRPA1-mediated inflammatory response of alveolar epithelial cells in vitro experiment. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* = Bulletin Physiology and Pathology of Respiration 2020; (77):29–33 (in Russian). DOI: 10.36604/1998-5029-2020-77-29-33

TRPA1-каналы неоднократно изучались в экспериментальных моделях воспаления *in vitro*. У млекопитающих они способны активироваться множеством экзогенных химических соединений-ирритантов, которые обычно вызывают раздражение и боль. Так, к числу известных естественных химических соединений – активаторов TRPA1 относятся циннамальдегид, аллилизотиоцианат и аллицин. TRPA1 активируется большим числом аэрополлютантов (изоцианаты, тяжелые металлы), а также акролеином – компонентом выхлопных газов двигателей внутреннего сгорания, продуктов горения древесины и табачного дыма [1]. Кроме этого, TRPA1 активируется эндогенными воспалительными медиаторами и активными формами кислорода, которые образуются в клетках при их повреждении. Последние способны вызывать перекисное окисление липидов с образованием 4-гидроксиноненаля и 4-оксононеналя, которые опосредуют активацию TRPA1 [2, 3]. Установлена активация TRPA1 при воздействии перекиси водорода [4] и в ходе нитрозативного стресса, под действием активных форм азота и нитратов жирных кислот [5]. Также были проведены исследования, которые указывают на возможность активации TRPA1 при воздействии низких температур (в диапазоне 10-20°C) [6].

Известно, что активация TRPA1, экспрессированных на нервных окончаниях С-типа, сопровождается высвобождением провоспалительных нейропептидов, индуцирующих бронхоконстрикцию, вазодилатацию и инфильтрацию клеточными элементами. При повторных или продолжительных контактах с ирритантами развивается хроническое воспаление, характерное для бронхиальной астмы и сопровождающееся нарушением нормальной реактивности дыхательных путей на различные стимулы.

Однако, помимо нервных волокон, экспрессия TRPA1 была зафиксирована в эпителии дыхательных путей [7], фибробластах [8] и гладкой мускулатуре [9]. В недавних исследованиях было показано, что TRPA1 также экспрессируется в альвеолярных эпителиальных клетках, которые увеличивали продукцию IL-8 в ответ на активацию данного канала [8]. Было установлено, что воздействие холодного воздуха усиливает выработку оксида азота посредством TRPA1 в клетках A549 [10].

Таким образом, к настоящему времени установлена роль TRPA1 каналов, экспрессированных в периферической нервной системе, как рецепторов химических соединений, обладающих раздражающим действием, опосредующих нейрогенный воспалительный ответ. Однако в гораздо меньшей степени изучена роль TRPA1, локализованных вне нервной системы, а именно – на эпителии, фибробластах, гладкомышечных клетках респираторного тракта и клетках воспаления, не исследованы сигнальные механизмы и эффекты активации рецептора.

Целью настоящего исследования было оценить

влияние TRPA1-рецепторов на развитие воспалительной реакции в клетках альвеолярного эпителия A549, выступающей в качестве *in vitro* модели воспаления в респираторном тракте.

Материалы и методы исследования

Клеточную линию человеческого альвеолярного эпителия A549 (Биолот, Россия) культивировали в среде DMEM-High glucose (Biowest, Франция) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Клетки росли до достижения конfluence 70-80%, после чего открепляли раствором, содержащим 0,1% коллагеназы, 0,01% ЭДТА и 0,25% бычьего сывороточного альбумина, и переносили в 96-луночный планшет в количестве 8×10³ клеток на лунку в 100 мкл культуральной среды. По истечении 24 часов культуральную среду заменяли на бессывороточную и инкубировали клетки в течение 2 часов. После этого среду заменяли на свежую, и начинали эксперимент. Все экспериментальные воздействия проводили в тройных повторях. Для блокирования TRPA1 в соответствующие лунки вносили селективный антагонист HC-030031 (Sigma-Aldrich, H4415), растворенный в безводном диметилсульфоксиде, до конечной концентрации 100 мкМ, и выдерживали в течение 30 минут. Затем в соответствующие лунки добавляли различные концентрации циннамальдегида (CA) (Sigma-Aldrich, C80687), растворенного в 50% этаноле. Конечные концентрации CA составляли 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ, 500 мкМ, 1000 мкМ, растворителя (этанола) – 0,5%. В лунки с селективным блокатором внесен CA в конечной концентрации 100 мкМ. Для оценки жизнеспособности клеток, в лунки вносили флуоресцентный индикатор пролиферации йодид в конечной концентрации 2,5 мкг/мл, в качестве положительного контроля использовали клетки, пермеабелизованные 0,5% Triton X-100. Анализ жизнеспособности производили на мультимодальном планшетном ридере CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия) в течение 4-х часов с интервалом 15 минут. По истечении этого времени из лунок отбирали клеточный супернатант, который немедленно замораживали при температуре -80°C до момента проведения анализа. Измерение концентрации цитокинов производили методом мультиплексного анализа с использованием коммерческого набора LEG-ENDplex Multi-Analyte Flow Assay Kit Human Inflammation Panel (13-plex) (BioLegend, Канада) на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II (Becton Dickinson, США) согласно протоколу производителя.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате исследования дозозависимого эффекта CA на жизнеспособность клеток альвеолярного эпителия A549 в течение 4-х часовой инкубации отрицательного воздействия выявлено не было, при этом 0,5% Triton X-100 вызывал выраженную гибель эпителиаль-

ных клеток. Этанол в концентрации 0,5% не оказывал губительного действия на клетки (рис. 1).

В клеточном супернатанте были проанализированы уровни 13 цитокинов: IL-1b, IFN α , IFN γ , TNF α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, IL-23, IL-33. Полученные данные свидетельствуют, что клетки A549 продуцируют такие цитокины как MCP-1, IL-6, IL-8, IL-33, причем концентрации последнего были крайне низкими (30-50 пг/мл). В отношении провоспалительных цитокинов MCP-1, IL-6, IL-8 было установлено, что при воздействии СА в концентрациях 10-100 мкМ уровни IL-6 и IL-8 были выше по сравнению с контрольными образцами. При этом уровень MCP-1 уве-

личивался только при стимуляции СА в самой низкой концентрации. После блокирования рецепторов TRPA1 селективным антагонистом HC-030031 и последующей стимуляции СА в дозе 100 мкМ отмечались более низкие концентрации цитокинов, по сравнению с клетками, которые подверглись действию СА в той же концентрации, но в отсутствии HC-030031. Интересным является факт, что при добавлении к клеткам СА в концентрации выше 100 мкМ происходило резкое снижение продукции данных провоспалительных цитокинов. При этом, наблюдаемый эффект был дозозависимым: чем выше была концентрация агониста, тем ниже падал уровень цитокинов (рис. 2).

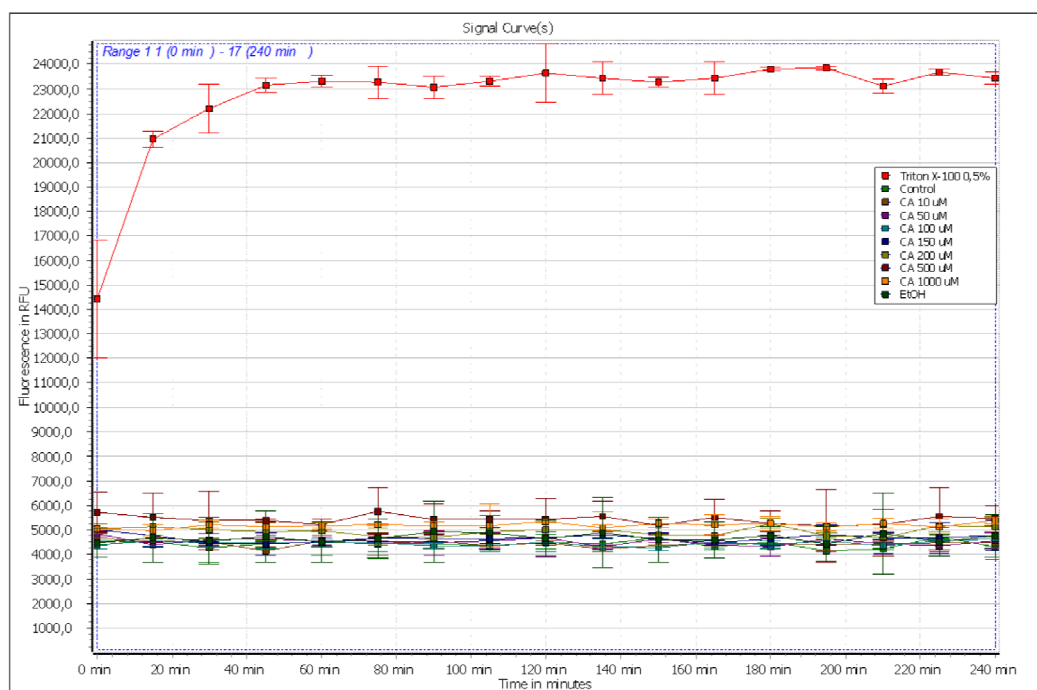


Рис. 1. График зависимости жизнеспособности клеток A549 от различных концентраций СА (10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ, 500 мкМ, 1000 мкМ), 0,5% этанола (EtOH), 0,5 % Triton X-100.

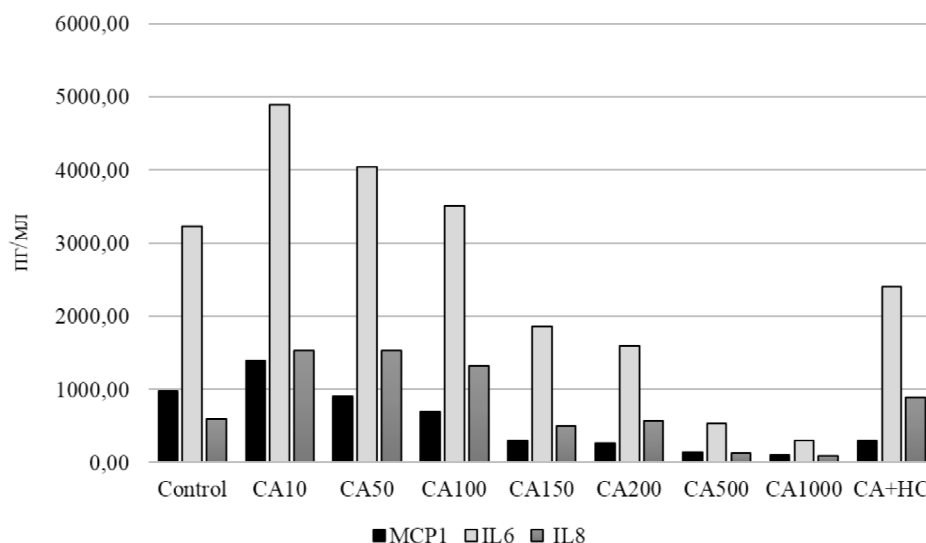


Рис. 2. Уровни цитокинов в зависимости от концентрации СА.

В экспериментах с альвеолярным эпителием A549 нами была продемонстрирована модель воспалительного ответа респираторного тракта человека *in vitro* с вовлечением TRPA1-каналов. Выявлено, что при активации данных рецепторов селективным агонистом, происходит выброс провоспалительных цитокинов, таких как MCP-1, IL-6, IL-8.

Нами были подтверждены данные мировой литературы о бимодальном эффекте селективного агониста TRPA1 – CA, в зависимости от его концентрации [11, 12]. Данный феномен не имеет объяснения на сегодняшний день и требует дальнейшего изучения.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Источники финансирования

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-315-00214).

Funding Sources

This study was supported by Russian Foundation for Basic Research (project No18-315-00214).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bautista D.M., Jordt S.E., Nikai T., Tsuruda P.R., Read A.J., Poblete J., Yamoah E.N., Basbaum A.I., Julius D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents // *Cell*. 2006. Vol.124. №6. P.1269–1282. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.023
2. Trevisani M., Siemens J., Materazzi S., Bautista D.M., Nassini R., Campi B., Imamachi N., André E., Patacchini R., Cottrell G.S., Gatti R., Basbaum A.I., Bunnett N.W., Julius D., Geppetti P. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1 // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007. Vol.104, №33. P.13519–13524. doi: 10.1073/pnas.0705923104
3. Taylor-Clark T.E., McAlexander M.A., Nassenstein C., Sheardown S.A., Wilson S., Thornton J., Carr M.J., Undem B.J. Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4-oxononenal // *J. Physiol*. 2008. Vol.586. №14. P.3447–3459. doi: 10.1113/jphysiol.2008.153585
4. Sawada Y., Hosokawa H., Matsumura K., Kobayashi S. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide // *Eur. J. Neurosci*. 2008. Vol.27, №5. P.1131–1142. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06093.x
5. Taylor-Clark T.E., Ghatta S., Bettner W., Undem B.J. Nitrooleic Acid, an Endogenous Product of nitrative stress, activates nociceptive sensory nerves via the direct activation of TRPA1 // *Mol. Pharmacol*. 2009. Vol.75, №4. P.820–829. doi: 10.1124/mol.108.054445
6. Moparthy L., Survery S., Kreir M., Simonsen C., Kjellbom P., Högestätt E.D., Johanson U., Zygmunt P.M. Human TRPA1 is intrinsically cold- and chemosensitive with and without its N-terminal ankyrin repeat domain // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2014. Vol.111, №47. P.16901–16906. doi: 10.1073/pnas.1412689111
7. Büch T.R., Schäfer E.A., Demmel M.T., Boekhoff I., Thiermann H., Gudermann T., Steinritz D., Schmidt A. Functional expression of the transient receptor potential channel TRPA1, a sensor for toxic lung inhalants, in pulmonary epithelial cells // *Chem. Biol. Interact*. 2013. Vol.206. №3. P.462–471. doi: 10.1016/j.cbi.2013.08.012
8. Mukhopadhyay I., Gomes P., Aranake S., Shetty M., Karnik P., Damle M., Kuruganti S., Thorat S., Khairatkar-Joshi N. Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells // *J. Recept. Signal Transduct. Res*. 2011. Vol.31, №5. P.350–358. doi: 10.3109/10799893.2011.602413
9. Earley S. TRPA1 channels in the vasculature // *Br. J. Pharmacol*. 2012. Vol.167, №1. P.13–22. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02018.x
10. Sun W., Wang Z., Cao J., Wang X., Han Y., Ma Z. Enhanced production of nitric oxide in A549 cells through activation of TRPA1 ion channel by cold stress // *Nitric Oxide*. 2014. Vol.40. P.31–35. doi:10.1016/j.niox.2014.04.009
11. Alpizar Y.A., Gees M., Sanchez A., Apetrei A., Voets T., Nilius B., Talavera K. Bimodal effects of cinnamaldehyde and camphor on mouse TRPA1 // *Pflugers Arch*. 2013. Vol.465, №6. P.853–864. doi: 10.1007/s00424-012-1204-x
12. Schulze A., Oehler B., Urban N., Schaefer M., Hill K. Apomorphine is a bimodal modulator of TRPA1 channels // *Mol. Pharmacol*. 2013. Vol. 83, №2. P.542–551. doi: 10.1124/mol.112.081976

REFERENCES

1. Bautista D.M., Jordt S.E., Nikai T., Tsuruda P.R., Read A.J., Poblete J., Yamoah E.N., Basbaum A.I., Julius D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 2006; 124(6):1269–1282. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.023
2. Trevisani M., Siemens J., Materazzi S., Bautista D.M., Nassini R., Campi B., Imamachi N., André E., Patacchini R., Cottrell G.S., Gatti R., Basbaum A.I., Bunnett N.W., Julius D., Geppetti P. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007; 104(33):13519–13524. doi: 10.1073/pnas.0705923104
3. Taylor-Clark T.E., McAlexander M.A., Nassenstein C., Sheardown S.A., Wilson S., Thornton J., Carr M.J., Undem

- B.J. Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4-oxononanal. *J. Physiol.* 2008; 586(14):3447–3459. doi: 10.1113/jphysiol.2008.153585
4. Sawada Y., Hosokawa H., Matsumura K., Kobayashi S. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur. J. Neurosci.* 2008; 27(5):1131–1142. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06093.x
5. Taylor-Clark T.E., Ghatta S., Bettner W., Undem B.J. Nitrooleic Acid, an Endogenous Product of nitrative stress, activates nociceptive sensory nerves via the direct activation of TRPA1. *Mol. Pharmacol.* 2009; 75(4):820–829. doi: 10.1124/mol.108.054445
6. Moparthy L., Survery S., Kreir M., Simonsen C., Kjellbom P., Högestätt E.D., Johanson U., Zygmunt P.M. Human TRPA1 is intrinsically cold- and chemosensitive with and without its N-terminal ankyrin repeat domain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2014; 111(47):16901–16906. doi: 10.1073/pnas.1412689111
7. Büch T.R., Schäfer E.A., Demmel M.T., Boekhoff I., Thiermann H., Gudermann T., Steinritz D., Schmidt A. Functional expression of the transient receptor potential channel TRPA1, a sensor for toxic lung inhalants, in pulmonary epithelial cells. *Chem. Biol. Interact.* 2013; 206(3):462–471. doi: 10.1016/j.cbi.2013.08.012
8. Mukhopadhyay I., Gomes P., Aranake S., Shetty M., Karnik P., Damle M., Kuruganti S., Thorat S., Khairatkar-Joshi N. Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 2011; 31(5):350–358. doi: 10.3109/10799893.2011.602413
9. Earley S. TRPA1 channels in the vasculature. *Br. J. Pharmacol.* 2012; 167(1):13–22. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02018.x
10. Sun W., Wang Z., Cao J., Wang X., Han Y., Ma Z. Enhanced production of nitric oxide in A549 cells through activation of TRPA1 ion channel by cold stress. *Nitric Oxide* 2014; 40:31–35. doi:10.1016/j.niox.2014.04.009
11. Alpizar Y.A., Gees M., Sanchez A., Apetrei A., Voets T., Nilius B., Talavera K. Bimodal effects of cinnamaldehyde and camphor on mouse TRPA1. *Pflugers Arch.* 2013; 465(6):853–864. doi: 10.1007/s00424-012-1204-x
12. Schulze A., Oehler B., Urban N., Schaefer M., Hill K. Apomorphine is a bimodal modulator of TRPA1 channels. *Mol. Pharmacol.* 2013; 83(2):542–551. doi: 10.1124/mol.112.081976

Информация об авторах:

Дина Анатольевна Гассан, канд. мед. наук, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: dani-shi@mail.ru

Олеся Олеговна Котова, лаборант-исследователь, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: foxy_voxy_on@mail.ru

Денис Евгеньевич Наумов, канд. мед. наук, зав. лабораторией молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: denn1985@bk.ru

Author information:

Dina A. Gassan, MD, PhD (Med.), Junior Staff Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: dani-shi@mail.ru

Olesya O. Kotova, MD, Assistant Researcher, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: foxy_voxy_on@mail.ru

Denis E. Naumov, MD, PhD (Med.), Head of Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: denn1985@bk.ru

Поступила 22.07.2020
Принята к печати 05.08.2020

Received July 22, 2020
Accepted August 05, 2020