

# Wpływ sonikatów szczepionki *Bacillus Calmette-Gue'rin* na zakażenie koronawirusem 229E ludzkiego śródbłonka naczyń płucnych i rozwój odpowiedzi zapalnej

The effect of *Bacillus Calmette-Guerin* vaccine sonicates on coronavirus 229E infection of human pulmonary endothelium and development of the inflammatory response

JAN FIRADZA<sup>1,2</sup>, ADRIAN GAJEWSKI<sup>1</sup>, ROBERT SZEWCZYK<sup>1</sup>, MATEUSZ GAWRYSIK<sup>1</sup>, IZABELA GULBAS<sup>1</sup>,  
MAGDALENA MIKOŁAJCZYK-CHMIELA<sup>2</sup>, MACIEJ CHAŁUBIŃSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinika Immunologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>2</sup> Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

Fundusze: Praca wykonana w ramach realizacji Studenckiego Grantu Badawczego Uniwersytetu Łódzkiego, pt. „Wpływ BCG na podatność na zakażenie koronawirusem 229E ludzkiego śródbłonka naczyń płuc oraz rozwój odpowiedzi przeciwwirusowej i zapalnej”

## Streszczenie

Postuluje się, iż szczepienia przeciw gruźlicy za pomocą szczepionki *Bacillus Calmette-Gue'rin* (BCG) mogą przekładać się na mniejszą zapadalność na infekcje dróg oddechowych poprzez modulację uwalniania cytokin prozapalnych przez komórki odporności wrodzonej. Modulacja ta może wynikać ze zmian epigenetycznych jakie zachodzą w tych komórkach, powodując zwiększenie wytwarzania cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 $\beta$ , IL-6 czy TNF- $\alpha$ . Nie wiadomo, czy śródbłonek naczyń płucnych wyposażony w receptory rozpoznające wzorce molekularne (PRR) oraz posiadający receptory wejścia dla ludzkich koronawirusów może być infekowany przez nie, ani czy szczepienia BCG mogą modulować jego podatność na infekcje tymi wirusami. W niniejszej pracy dokonano analizy wpływu ludzkiego koronawirusa HCoV 229E na ludzki śródbłonek naczyń płucnych. Oceniono wpływ oddziaływania sonikatów BCG na podatność na zakażenie śródbłonka HCoV 229E oraz generowanie odpowiedzi przeciwwirusowej i zapalnej.

**Słowa kluczowe:** śródbłonek naczyniowy, szczepionka *Bacillus Calmette-Gue'rin* BCG, koronawirus 229E, zapalenie, infekcje dróg oddechowych

## Summary

It is postulated that vaccination against tuberculosis with *Bacillus Calmette-Gue'rin* (BCG) vaccine may translate into lower incidence of respiratory tract infections by modulating the release of pro-inflammatory cytokines by innate immune cells. This modulation may be due to epigenetic changes in these cells resulting in an increase in the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6 or TNF- $\alpha$ . It is not known whether the pulmonary vascular endothelium equipped with molecular pattern recognition receptors (PRRs) and with entry receptors for human coronaviruses can be infected by them, or whether BCG vaccination may modulate its susceptibility to infection with these viruses. This study analyzes the effect of the HCoV 229E human coronavirus on human pulmonary vascular endothelium. Moreover, the influence of BCG sonicates on susceptibility to infection and the generation of antiviral and inflammatory responses was assessed.

**Keywords:** vascular endothelium, *Bacillus Calmette-Gue'rin* (BCG) vaccine, human coronavirus 229E

© *Alergia Astma Immunologia* 2022, 27 (4): 135-142

[www.alergia-astma-immunologia.pl](http://www.alergia-astma-immunologia.pl)



Adres do korespondencji / Address for correspondence

Dr hab. n. med. Maciej Chałubiński,

Klinika Immunologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Ul. Pomorska 251,

-213 Łódź

tel. 42 675 73 09.

[maciej.chalubinski@umed.lodz.pl](mailto:maciej.chalubinski@umed.lodz.pl)

## Wykaz skrótów:

BCG – szczepionki *Bacillus Calmette-Gue'rin*

TNF- $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworów

PRR – receptory rozpoznające wzorce molekularne

HCoV 229E – ludzki koronawirus 229E

TLR – receptory Toll – podobne

**RLR** – receptory RIG – podobne  
**NLR** – receptory NOD – podobne  
**NF-κB** – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- kappa B  
**ISG** – gen stymulowany interferonem  
**NLRP3** – białko NOD-podobne 3 zawierające domenę pirynową  
**RIG-I** – gen indukowany kwasem retinowym 1

## WSTĘP

Szczepionka *Bacillus Calmette-Gue'rin* (BCG) chroni organizm człowieka przed zakażeniem *M. tuberculosis*. Wydaje się, że może ona również wykazywać pewne działanie protekcyjne w stosunku do innych patogenów. Takiej obserwacji dokonał już sam współtwórca szczepionki Albert Calmette, który w 1927 roku zaobserwował zmniejszoną śmiertelność na malarię oraz niższe ryzyko wystąpienia ostrych infekcji dróg oddechowych niezwiązanych z zakażeniem prątkiem gruźlicy [1]. Postuluje się, że BCG może wykazywać ochronne działanie wobec patogenów wirusowych, w tym wirusa opryszki, grypy czy syncytialnego wirusa oddechowego [2,3]. Wykazano, że dwukrotne szczepienie BCG mogło przyczynić się do zmniejszenia zapadalności na infekcje górnych dróg oddechowych w populacji w wieku nastoletnim niezwiązane z zakażeniem *M. tuberculosis*. Podobną zależność odnotowano w populacji osób starszych [4]. W ostatnim czasie pojawiły się doniesienia sugerujące, że kraje, które zrezygnowały z programu szczepień BCG, takie jak Włochy czy Stany Zjednoczone, były istotnie bardziej dotknięte pandemią COVID-19 wywołaną przez koronawirusa SARS-CoV-2 w porównaniu z krajami, w których nadal powszechnie stosuje się szczepienia szczepionką BCG [5].

Arts R. J. W i wsp. wykazali, iż szczepienia przeciw gruźlicy szczepionką *Bacillus Calmette-Gue'rin* (BCG) mogą przekładać się na mniejszą zapadalność na infekcje oddechowe poprzez modulację uwalniania cytokin prozapalnych przez komórki odporności wrodzonej [2]. Modulacja ta może wynikać ze zmian epigenetycznych zachodzących w tych komórkach, powodujących do zwiększenia wytwarzania cytokin prozapalnych, takich jak IL-1β, IL-6 czy TNF-α [1,6]. Niewykluczone, że zmiany te mogą determinować wzmożoną aktywność komórek na inny czynnik zakaźny i wywołać zwiększoną indukcję cytokin prozapalnych. Tak "wytrenowane komórki" mogą powstawać przez pobudzenie receptorów odporności wrodzonej rozpoznających wzorce molekularne związane z patogenami (*Pattern Recognition Receptors*, PRR) [1]. Aktywacja zapalna podczas infekcji komórki patogenami wewnątrzkomórkowymi uwarunkowana jest m.in. oddziaływaniem uniwersalnych struktur patogenów na receptory PRR, do których należą receptory TLR (*Toll-like receptors*), RLR (*RIG-like receptors*) oraz NLR (*NOD-like receptors*). Te prowadzą do aktywacji sygnałowych szlaków wewnątrzkomórkowych (NF-κB, ISG) prowadzących do produkcji cytokin zapalnych i przeciwwirusowych interferonów [7]. Wykazano bowiem, że mykobakteryjne RNA może aktywować receptory PRR obecne w cytozolu: NLRP3, NLR, RIG-I, MDA5, a także OAS-1 i PKR - te same, które rozpoznają wirusowe RNA [8].

Śródbłonek naczyńniewy stanowi barierę między tkankami, a krwią, zbudowaną ze ściśle przylegających do siebie komórek. Śródbłonek wyściełający naczynia układu oddechowego jest nie tylko barierą mechaniczną wspomagającą

**MDA5** – białko różnicowania czerniaka 5  
**OAS-1** – syntaza oligoadenylationu 1  
**PKR** – kinaza białkowa R  
**HMVEC-L** – komórki ludzkiego śródbłonna naczyń płucnych  
**RANTES** – chemokina syntetyzowana przez limfocyty T

cą toczenie i migrację komórek odpornościowych do miejsca infekcji w tkankach płuc, ale również stanowi bogate źródło cytokin i mediatorów pełniących rolę regulacyjną i obronną w procesach zapalnych [8]. Zarówno koronawirusy, jak i drobnoustroje bakteryjne mogą pobudzać receptory rozpoznające wzorce (PRR) obecne w komórkach śródbłonna naczyńniewy, indukując wytwarzanie zapalnych cytokin, podobnie jak to ma miejsce w przypadku pobudzenia komórek odpornościowych czy komórek nabłonka oddechowego [9, 10]. W badaniach prowadzonych w naszym ośrodku zaobserwowaliśmy, iż śródbłonek naczyń płucnych może podlegać infekcji rinowirusem HRV16, indukując w nim silną odpowiedź przeciwwirusową i zapalną, m.in. dzięki aktywacji receptorów TLR, RLR i NLR [9,10,11]. W niniejszej pracy dokonano analizy wpływu ludzkiego koronawirusa HCoV 229E na ludzki śródbłonek naczyń płucnych. Oceniono wpływ oddziaływania sonikatów BCG na podatność na zakażenie śródbłonna HCoV 229E oraz generowanie odpowiedzi przeciwwirusowej i zapalnej.

## MATERIAŁY METODY

### *Hodowla ludzkich mikrowaskularnych komórek śródbłonna naczyń płucnych HMVEC-L*

Komórki ludzkiego śródbłonna naczyń płucnych (HMVEC-L, ang. *Lung Microvascular Endothelial Cell Systems*) przechowywano w oparach ciekłego azotu, w temperaturze około -190°C. Hodowlę komórek HMVEC-L prowadzono w podłożu EBM-2 (ang. *Endothelial Basal Medium-2*, Lonza) z dodatkiem suplementu (EGM-2MV ang. *Endothelial Growth Medium-2*, Lonza) zawierającego: 5% v/v surowicy płodów cielęcych (FBS, ang. *fetal bovine serum*), 0,04% v/v hydrokortyzonu (ang. *hydrocortisone*), 0,4 % v/v ludzkiego czynnika wzrostu fibroblastów β (hFGF-β, ang. *human fibroblast growthfactor β*), 0,1% v/v czynnika wzrostu śródbłonna naczyńniewy (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*), 0,1% v/v insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (R3-IGF, ang. *R3-insulin-likegrowth factor-1*), 0,1% v/v kwasu askorbinowego (ang. *ascorbicacid*), 0,1% v/v ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (hEGF, ang. *human epidermal growth factor*), 0,1% v/v gentamycyny/amfoterycyny B (GA, ang. *gentamicin/amfotericin B*) w naczyniach hodowlanych o powierzchni 75 cm<sup>2</sup>, w warunkach inkubatora hodowlanego (temp. 37°C, podwyższona wilgotność, atmosfera wzbogacona w 5% CO<sub>2</sub>). Do założenia hodowli stosowano zawiesiny komórek o gęstości 5 x 10<sup>5</sup> komórek/mL.

Po osiągnięciu przez komórki konfluencji w zakresie około 90-100%, usuwano podłoże hodowlane, komórki płukano roztworem soli fizjologicznej buforowanym fosforanami (PBS, ang. *phosphate- buffered saline*), następnie traktowano roztworem 0,05% trypsyny w 0,02% roztworze kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA, ang. *ethylenediaminetetraaceticacid*) przez 5 minut w tempe-

raturze 37°C. Po tym czasie aktywność trypsyny blokowano czynnikiem neutralizującym trypsynę (TNS, ang. *Trypsin neutralizing solution*). Zawiesinę komórek wirowano przez 5 minut, 200 x g, supernatant usuwano, a osad komórek zawieszano w świeżym podłożu EGM-2MV. Oceniano gęstość i żywotność komórek w hematocytometrze Bürkera, rozcieńczając zawiesinę komórek w stosunku 1:20, w roztworze wodnym błękitu trypanu (1% w/v). Zawiesinę komórek doprowadzano do gęstości  $2 \times 10^5$  komórek/studzienkę polistyrenowej hodowalnej płytki 24-studzienkowej. Następnie komórki inkubowano przez noc w warunkach: temp. 37°C, podwyższona wilgotność, atmosfera wzbogacona w 5% CO<sub>2</sub>.

### Zakażenie HMVEC-L koronawirusem HCoV-229E

Ludzkie komórki mikrowaskularne śródbłonna naczyń płucnych HMVEC-L zakażano ludzkim koronawirusem 229E (HCoV-229E, ang. *human coronavirus 229E*), który przechowywano w temperaturze -80°C. Do zakażenia komórek zawsze używano świeżej porcji MOI wirusa (ang. *multiplicity of infection*). Współczynnik MOI jest to liczba cząstek wirusa przypadających na jedną komórkę gospodarza, którego wartość określa się na podstawie parametru dawki zakażeniowej TCID<sub>50</sub> (ang. *tissue culture infective dose*). Dla ludzkiego koronawirusa HCoV-229E dawka zakażeniowa wynosi  $1,65 \times 10^7$ .

Ilość zawiesiny wirusa potrzebnej do zakażenia komórek dla danego eksperymentu obliczono na podstawie wzoru:

$$MOI = N \times v \times DF$$

gdzie: *N* – liczba studzienek, *v* – końcowa objętość zawiesiny infekcyjnej [ $\mu$ L],

*DF* – współczynnik rozcieńczenia (ang. *dilution factor*)

DF obliczany ze wzoru:

$$DF = \frac{0,7 \times TCID_{50} \times vN}{MOI \times G_k}$$

gdzie: TCID<sub>50</sub> – dawka zakażenia dla HCoV-229E równa  $1,65 \times 10^7$ , *vN* – objętość zawiesiny na dołek [mL], MOI – ilość zawiesiny wirusa na jedną komórkę docelową, *G<sub>k</sub>* – gęstość komórek przypadająca na jeden dołek.

Po przygotowaniu odpowiedniej zawiesiny MOI 1,0 wirusa, z założonej wcześniej hodowli komórek usuwano podłoże hodowlane, a następnie dodawano stałą objętość zawiesiny wirusa w podłożu hodowlanym. Komórki inkubowano przez 3 godziny w warunkach inkubatora hodowlanego (37°C, podwyższona wilgotność, 5% CO<sub>2</sub>). Po inkubacji usuwano zawiesinę wirusa, przepłukiwano dwukrotnie roztworem PBS. Dodawano świeżego podłoża hodowlanego EGM-2MV. Następnie inkubowano w warunkach inkubatora hodowlanego: temp. 37°C, podwyższona wilgotność, 5% CO<sub>2</sub>. W doświadczeniach uwzględniono próbę kontrolną, którą stanowiły komórki hodowane w podłożu EGM-2MV bez obecności HCoV-229E. Po określonym czasie inkubacji zabezpieczano supernatant z nad hodowli, a komórki lizowano buforem lizującym RLT (z zestawu RNeasy Mini Kit 250, Qiagen). Lizaty komórkowe przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych badań.

### Otrzymywanie sonikatu *Mycobacterium bovis* BCG

*Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur strain 117P2; Sztokholm, Szwecja) hodowano w temperaturze 37°C przez 6 tygodni na podłożu Middlebrook 7H10 agar, a następnie w takich samych warunkach na podłożu płynnym Middlebrook 7H9. Zawiesinę bakteryjną wirowano przy prędkości 2500 obr./min., 15 min., w 4°C. Osad bakteryjny zawieszono w 5 mL PBS i zamrożono w temp. -20°C. Po rozmrożeniu zawiesinę bakterii autoklawowano (temp. 120°C, 30 min., 1,5 atm.). Następnie komórki bakteryjne poddano dezintegracji w sonikatorze przez 5 min i wykonano kontrolę stopnia dezintegracji za pomocą barwienia metodą Ziehl – Neelsena. Stężenie białka oceniono metodą spektrofotometryczną z użyciem odczynnika Bio-Rad protein assay. Zawartość białka odczytano z krzywej wzorcowej dla roztworu albuminy bydlęcej – BSA o stężeniu: 10, 50, 100, 150, 200, 250, 500 i 1000  $\mu$ g/mL. Sonikat przechowywano w temp. -20°C. Sonikat *Mycobacterium bovis*, otrzymano w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi.

### Stymulacja sonikatem BCG komórek śródbłonna naczyń płuc HMVEC-L

HMVEC-L stymulowano sonikatem BCG, który przechowywano w temperaturze -80°C. Każdorazowo przygotowano świeże rozcieńczenie sonikatu w podłożu hodowlanym EGM-2MV. W doświadczeniach komórki HMVEC-L poddane były działaniu sonikatu w stężeniu 10  $\mu$ g/mL. Następnie, po przygotowaniu odpowiedniego stężenia sonikatu BCG, z wcześniej założonej hodowli komórek usuwano podłoże hodowlane, a następnie dodawano stałą objętość sonikatu. Komórki inkubowano w warunkach inkubatora hodowlanego: temp. 37°C, podwyższona wilgotność, 5% CO<sub>2</sub>. W doświadczeniach uwzględniano próbę kontrolną, którą stanowiły komórki inkubowane w podłożu EGM-2MV bez sonikatu BCG. Po określonym czasie inkubacji zabezpieczano supernatant z nad hodowli, a komórki lizowano buforem lizującym RLT (z zestawu RNeasy Mini Kit 250, Qiagen). Lizaty komórkowe przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych badań.

### Stymulacja sonikatem BCG śródbłonna naczyń płucnych HMVEC-L i zakażenie koronawirusem HCoV-229E

HMVEC-L zakażano HCoV 229E w środowisku sonikatu BCG. Odpowiednie rozcieńczenie sonikatu BCG oraz zawiesinę wirusa HCoV-229E MOI 1,0 przygotowano zgodnie z opisem. Do odpowiednich studzienek dodawano stałą objętość sonikatu BCG w stężeniu 1, 10 lub 20  $\mu$ g/mL. Komórki inkubowano przez 24 lub 72 godziny w warunkach inkubatora hodowlanego: temp. 37°C, podwyższona wilgotność, 5% CO<sub>2</sub>. Po inkubacji usuwano podłoże hodowlane, po czym do odpowiednich studzienek dodawano zawiesinę wirusa HCoV-229E w dawce MOI 1,0 przygotowanego odpowiednio w roztworze sonikatu BCG lub podłoża EGM-2MV. Komórki inkubowano przez 3 godziny. Po tym czasie usuwano nadsącz z nad komórek, przepłukiwano je dwukrotnie roztworem PBS, a następnie dodawano odpowiednio roztwór sonikatu BCG lub świeże podłoże hodowlane EGM-2MV. Po 72 godzinach



inkubacji zabezpieczano supernatant z nad hodowli, a komórki lizowano buforem lizującym RLT (z zestawu RNeasy Mini Kit 250, Qiagen). Lizaty komórkowe przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do dalszych oznaczeń.

### Izolacja mRNA

Z zabezpieczonych lizatów komórkowych izolowano mRNA używając komercyjnego zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen), zgodnie z procedurą producenta. Do lizatu komórkowego w objętości  $350\ \mu\text{L}$  dodawano taką samą objętość 70% roztworu alkoholu etylowego. Zawartość próbówki mieszano poprzez pipetowanie. Przeniesiono zawartość próbówki do kolumny, wirowano przez 15 sekund przy prędkości  $10\ 000\ \times\ \text{g}$ . Usuwano przesącz spod kolumny, dodawano  $700\ \mu\text{L}$  buforu RW1 następnie wirowano przez 15 sekund przy prędkości  $10\ 000\ \times\ \text{g}$ . Po wirowaniu usuwano przesącz spod kolumny, a następnie dodawano  $500\ \mu\text{L}$  buforu RPE i wirowano przez 15 sekund przy prędkości  $10\ 000\ \times\ \text{g}$ . Po odwirowaniu usuwano przesącz, dodawano  $500\ \mu\text{L}$  buforu RPE i wirowano przez 2 minuty przy prędkości  $10\ 000\ \times\ \text{g}$ . Kolumnę przenoszono do nowej próbówki ponownie wirowano przez 1 minutę przy maksymalnych obrotach. Następnie kolumnę umieszczono w próbówce typu eppendorf o pojemności  $1,5\ \text{mL}$ , a bezpośrednio na membranę kolumny dodawano  $30\ \mu\text{L}$  wody wolnej od nukleaz (ang. *RNAse-free water*). Wirowano przez 1 minutę przy prędkości  $14\ 500\ \times\ \text{g}$ . Stężenie wyizolowanego mRNA oceniano przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

### Odwrotna Transkrypcja

Mieszaninę reakcyjną do reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR, ang. *reverse transcription polymerase chain reaction*) przygotowano na lodzie z użyciem gotowego zestawu RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Stężenie mRNA prób badanych doprowadzono do  $385\ \text{ng}$  mRNA w  $11\ \mu\text{L}$  wody wolnej od nukleaz, na pojedynczą reakcję. Probówki typu eppendorf wraz z mieszaniną reakcyjną szczelnie zamknięto, odwirowano, a następnie umieszczono w termocyklerze. Po skończonej reakcji odwrotnej transkrypcji próbki przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Ocena ekspresji genów za pomocą real time PCR

Do oceny ekspresji poszczególnych genów w badanych próbkach wykorzystano łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym – real-time PCR. Mieszaninę reakcyjną przygotowano w probówkach typu eppendorf i umieszczano w termocyklerze real-time PCR System StepOnePlus™. Po zakończeniu reakcji amplifikacji otrzymywano wartości Ct (Ct – cykl graniczny, w którym reakcja amplifikacji wchodzi w fazę logarytmicznego wzrostu produktu) analizowanych genów, w postaci danych liczbowych z wykorzystaniem programu komputerowego arkusza kalkulacyjnego Excel. Do analizy wykorzystano, średnie wartości Ct dla genu referencyjnego GAPDH (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego). Obliczono współczynnik  $\Delta\text{Ct}$  poprzez odjęcie ich od wartości Ct dla genu badanego w danej próbce. W kolejnym etapie, do uzyskania  $\Delta\Delta\text{Ct}$  odjęto średnią wartość Ct prób kontrolnych od  $\Delta\text{Ct}$  prób badanych dla tego samego genu. Ostateczne wyniki względnej zmiany ekspresji mRNA obliczono podnosząc liczbę 2 do uzyskanej wartości  $\Delta\Delta\text{Ct}$  ze zmienionym znakiem ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ).

Wynik, którego wartość przekraczała 1, traktowany był za wzrost ekspresji danego genu. Wartość mniejsza niż 1 uznawana natomiast była za zmniejszenie lub brak ekspresji badanego genu.

### Oznaczenie liczby kopii wirusa HCoV-229E

Liczba kopii wirusa HCoV-229E w komórkach docelowych oceniano z wykorzystaniem reakcji qRT-PCR (ang. *quantitative reverse transcriptase real-time PCR*) oraz handlowego zestawu „Standard Real Time PCR detection kit for HCoV\_Gp1”, (Genesig, Primerdesign LTD, Wielka Brytania). Mieszaninę reakcyjną przygotowano na lodzie w probówkach do reakcji PCR. Mieszaninę reakcyjną przygotowano w probówkach typu eppendorf i umieszczano w termocyklerze real-time PCR System StepOnePlus™, wybierając odpowiedni program. Po przeprowadzeniu reakcji qPCR otrzymywano ilość kopii wirusa w danej próbce badanej w odniesieniu do przygotowanej krzywej wzorcowej.

### Cytometria przepływowa

Ekspresję powierzchniową aminopeptydazy N (AP-N) na HMVEC-L oceniano metodą cytometrii przepływowej (cytometr przepływowy BD LSR Fortessa). Komórki HMVEC-L inkubowano ze specyficznymi przeciwciałami anti- AP-N (FITC, anti-human CD13, NBP2-47892F, Novous Biologicals, Centennial, CO, USA) oraz przeciwciałami kontroli izotypowej (FITC Mouse IgG1,  $\kappa$  isotype, AB\_11043278, Novous Biologicals, Centennial, CO, USA) przez 30 minut na lodzie. Po inkubacji komórki przemyto buforowanym roztworem soli fizjologicznej HEPES. Następnie komórki zablokowano 1% albuminą surowicy bydlęcej (BSA) (A790650G, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) w PBS. Po tych etapach komórki analizowano metodą cytometrii przepływowej. Dane analizowano przy użyciu oprogramowania BD FACSDiva.

### Mikroskopia konfokalna

Monowarstwy HMVEC-L utrwalano w 4% paraformaldehydzie (PFA) przez 15 min. w temperaturze pokojowej i przemyto trzy razy w PBS. Następnie komórki blokowano 4% albuminą surowicy bydlęcej (BSA) (A790650G, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) w PBS przez 1 godzinę i płukano trzykrotnie w PBS. Przeciwciała rozcieńczono w 1% albuminie surowicy bydlęcej (BSA) w PBS. Probki inkubowano z przeciwciałami przez noc w  $4^{\circ}\text{C}$ . Następnie komórki przemyto trzykrotnie PBS, a jądra komórkowe wybarwiono DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol) (1:2000, 15 minut w temperaturze pokojowej) (D1306, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Do oceny stanu międzykomórkowych białek złączowych wykorzystano mikroskop konfokalny Leica TCS SP8 (Leica-Microsystems, Wetzlar, Niemcy) z soczewką  $63\times/1,40$  (HC PL APO CS2 OilImmersion). Do wizualizacji komórek wykorzystano laser ze wzbudzeniami  $488\ \text{nm}$  i emisją  $488\ \text{nm}$  dla AP-N. W przypadku jąder barwionych DAPI parametry wzbudzenia i emisji wynosiły odpowiednio  $405\ \text{nm}$  i  $460\text{--}480\ \text{nm}$ . Do analizy danych wykorzystano oprogramowanie Leica (Wetzlar, Niemcy).

### Analiza statystyczna uzyskanych wyników

Wszystkie wyniki zostały opracowane statystycznie z zastosowaniem oprogramowania GraphPadPrime 9.1.1. Istotność statystyczną wyznaczono w nieparametrycznym

teście U Mann-Whitney, który pozwala na porównanie ze sobą dwóch niezależnych wobec siebie grup, bez równoliczności grup i rozkładu normalnego. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej arytmetycznej  $\pm$  odchylenie standardowe (SD ang. *Standard deviation*). Istotnie statystycznie przyjęto różnice przy współczynniku prawdopodobieństwa mniejszym niż 0,05 ( $p \leq 0,05$ )

Średnia arytmetyczna - suma liczb podzielona przez ich liczbę

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

gdzie:

$x_1$  – wartość pojedynczej próby

$n$  – liczba prób

Test U Mann-Whitney - dla małej liczności próby

$$U = n_1 n_2 + \frac{(n_1(n_1+1))}{2} - R_1$$

gdzie:

$n_1$  – liczba prób dla grupy pierwszej

$n_2$  – liczba prób dla grupy drugiej

$R_1$  – suma rang wartości

## WYNIKI

### Ocena ekspresji AP-N na HMVEC-L

Obecność AP-N na powierzchni komórek śródbłonna naczyń płucnych zanalizowano metodą cytometrii przepływowo. MFI dla AP-N był znacznie większy w porównaniu do MFI kontroli izotypowej. (Ryc. 1A). Ekspresję AP-N potwierdzono za pomocą mikroskopii konfokalnej. (Ryc.1B)

### Ocena wpływu infekcji HCoV 229E na HMVEC-L

W HMVEC-L indukowanych wirusem HCoV 229E MOI 1,0 stwierdzono obecność kopii wirusa w 72 godzinie po 3-godzinnej ekspozycji komórek, co świadczy, że do-

szło do aktywnego zakażenia. (Ryc. 2A) Obecności wirusa w komórkach towarzyszył istotnie statystyczny wzrost ekspresji mRNA dla MDA5 oraz IP-10 (odpowiednio  $p < 0,05$  i  $0,01$ ,) (Ryc. 2B,C). Nie zaobserwowano istotnego wpływu na ekspresję mRNA dla IFN- $\beta$  i IL-6 w 72 godzinie inkubacji ( $p > 0,05$ ) (Ryc. 2D,E).

### Ocena wpływu sonikatów BCG na HMVEC-L

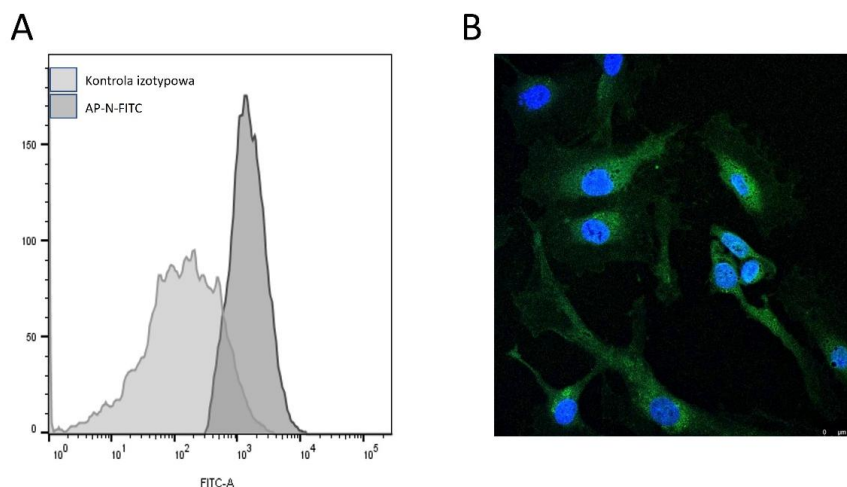
Nie zaobserwowano istotnie statystycznego wpływu BCG w stężeniach 1, 10 i 20  $\mu\text{g/ml}$  ani na ekspresję mRNA dla AP-N (Ryc. 3A), TLR3 (Ryc. 3B) i MDA5 (Ryc. 3C,I), jak również IFN- $\beta$  (Ryc. 3D,G) oraz IP-10 (Ryc. 3E,H) zarówno w 24, jak i 72 godzinie inkubacji ( $p > 0,05$ ). Odnotowano istotnie statystyczny spadek ekspresji mRNA dla IL-6 w 72 godzinie inkubacji z BCG w stężeniu 1  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ) (Ryc. 3F).

### Ocena wpływu sonikatów BCG na zakażenie komórek HMVEC-L koronawirusem HCoV 229E na odpowiedź przeciwwirusową i zapalną

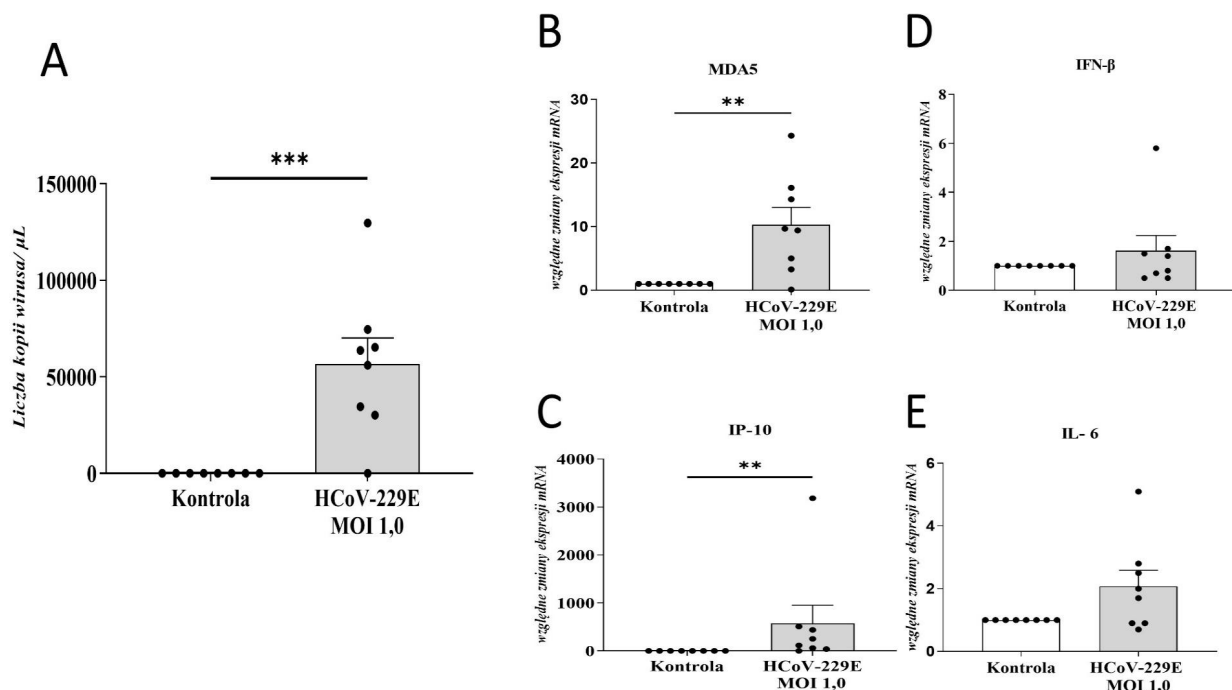
Na tym etapie badań komórki HMVEC-L były prestymulowane BCG w stężeniu 1  $\mu\text{g/ml}$  przez 24 godziny, a następnie poddane inkubacji z HCoV 229E MOI 1,0 przez 3 godziny, po czym komórki były hodowane przez kolejne 72 godziny. Liczba kopii HCoV 229E w HMVEC-L poddanych i niepoddanych ekspozycji na BCG była porównywalna ( $p > 0,05$ ) (Ryc. 4A). Podobnie nie wykazano wpływu uprzedniej ekspozycji HMVEC-L na BCG na ekspresję MDA5 i IP-10 indukowaną przez HCoV 229E ( $p > 0,05$ ), jak również nie odnotowana wpływu na ekspresję mRNA dla IFN- $\beta$  i IL-6 ( $p > 0,05$ ) (Ryc. 4B, C, D, E).

## DYSKUSJA

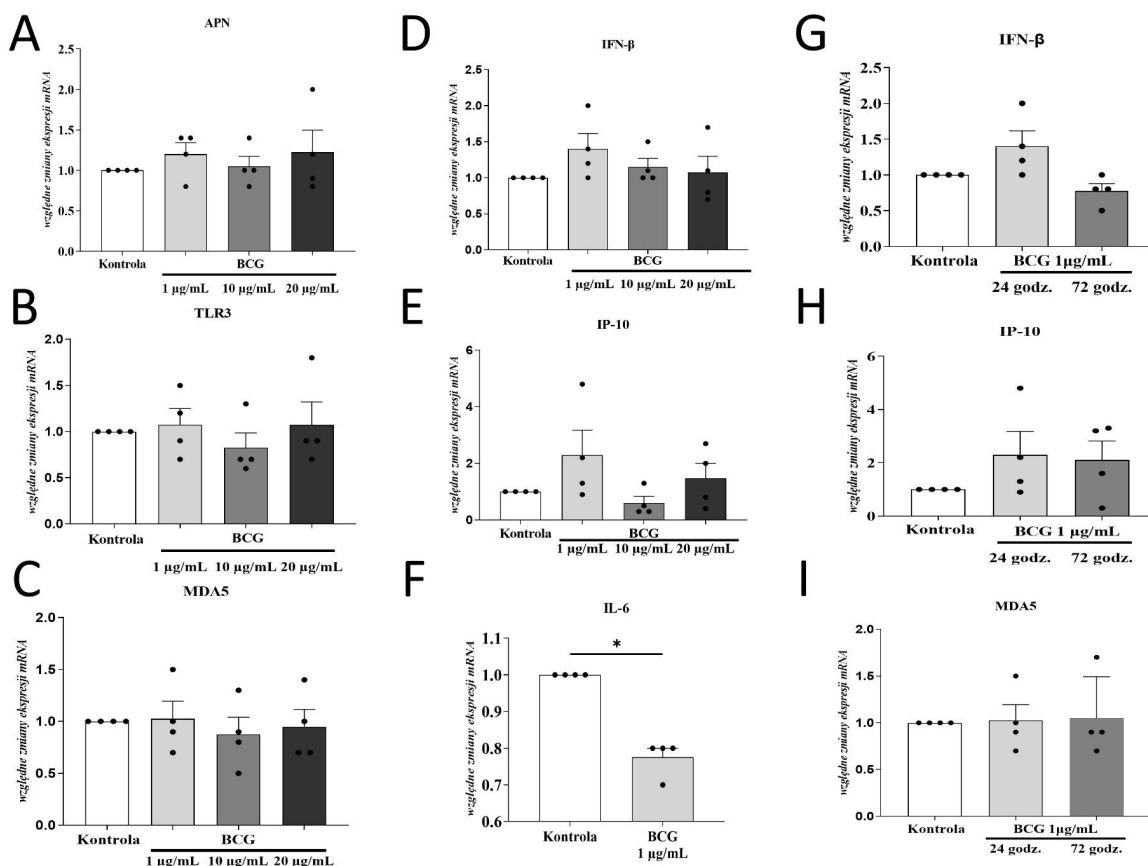
W literaturze pojawiają się doniesienia sugerujące, iż szczepienia przeciwko gruźlicy mogą wykazywać działanie ochronne wobec infekcji wirusem SARS-CoV-2 oraz zmniejszać ryzyko ciężkiego przebiegu choroby COVID19 [12,13,14]. Uważa się, że to zjawisko może być związane m.in. z procesem „treningu immunologicznego” komórek



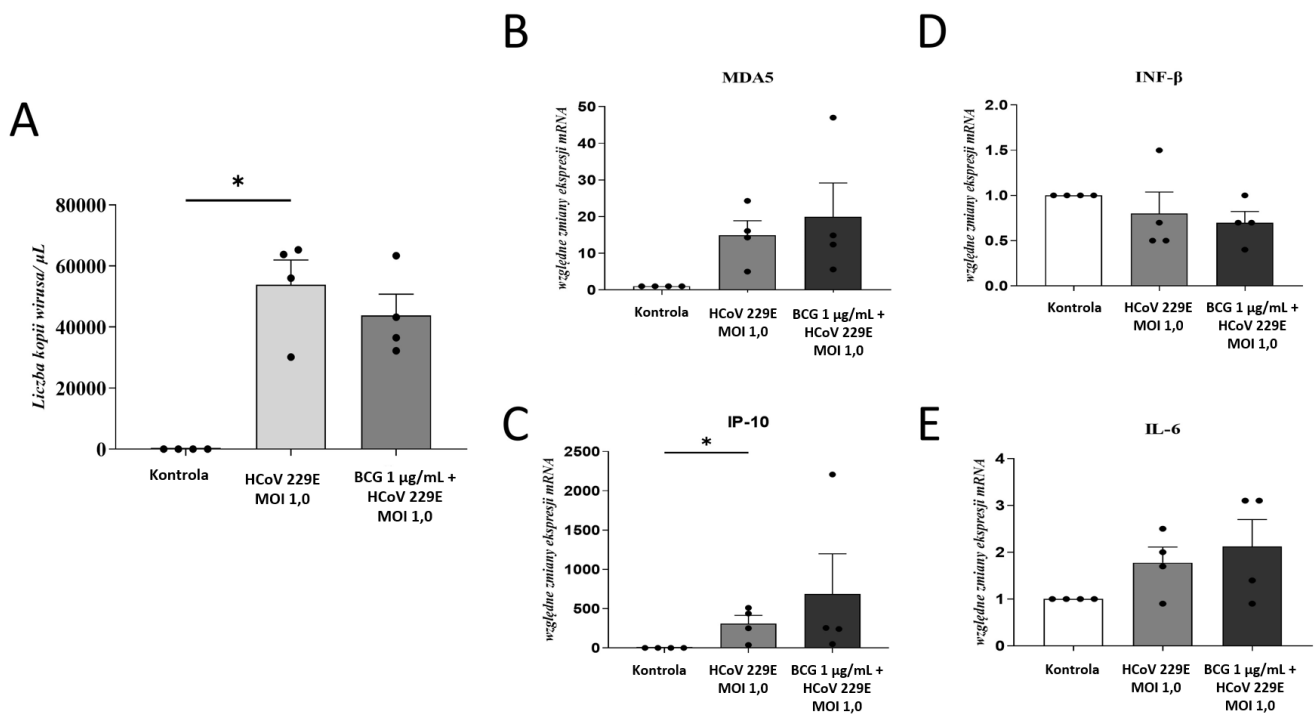
Ryc. 1. Ekspresja powierzchniowa aminopeptydazy N (AP-N) na komórkach śródbłonna HMVEC-L w cytometrii przepływowo (histogram jasno szary – kontrola izotypowa, ciemno szary AP-N-FITC) (A) oraz w mikroskopii konfokalnym (zielone – AP-N-FITC, niebieskie – jądra komórkowe DAPI) (powiększenie) (B).



Ryc.2. Wpływ koronawirusa HCoV 229E na komórki śródbłonna HMVEC-L. Liczba kopii wirusa HCoV-229E w komórkach HMVEC-L, po inkubacji 3-godzinnej z wirusem, w 72 godzinie po zakończeniu hodowli (A); Ekspresja mRNA dla MDA5 (B), IP-10 (C), IFN- $\beta$  (D) oraz IL-6 (E) w komórkach HMVEC-L zakażonych koronawirusem HCoV-229E, w dawce MOI 1,0; wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SD; istotność statystyczna \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  w porównaniu do kontroli w teście U Manna-Whitneya,  $n = 8$ .



Ryc.3. Wpływ sonikatu BCG na komórki śródbłonna HMVEC-L. Ekspresja mRNA dla AP-N (A), TLR3 (B), MDA5 (C,I), IFN- $\beta$  (D,G), IP-10 (E,H) i IL-6 (F) w hodowlach komórek HMVEC-L z sonikatem BCG o stężeniach 1,10 i 20  $\mu$ g/mL, inkubowanych przez 24 i 72 godzinny; wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SD, istotność statystyczna \* $p < 0,05$  w porównaniu do kontroli w teście U Manna-Whitneya,  $n = 4$ .



Ryc. 4 Wpływ prestymulacji komórek śródbłonna HMVEC-L sonikatem BCG (1 µg/mL) na infekcję koronawirusem HCoV 229E (MOI 1,0). Liczba kopii wirusa HCoV-229E w komórkach HMVEC-L w 72 godzinie po zakończeniu hodowli (A); Ekspresja mRNA dla MDA5 (B), IP-10 (C), INF-β (D) oraz IL-6 (E) w komórkach HMVEC-L zakażonych koronawirusem HCoV-229E, w dawce MOI 1,0; wyniki przedstawiono jako średnie ± SD; n = 4.

wrodzonej odporności - oddziałując na szereg receptorów rozpoznających wzorce molekularne PRRs, takich jak TLR2, TLR3 czy TLR6 oraz wspólne wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe. BCG może indukować w komórkach zmiany na poziomie epigenetycznym prowadząc do „optymalizacji” wytwarzania cytokin prozapalnych i interferonów podczas późniejszych infekcji wirusowych [6,15,16]. Dlatego w pracy podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, czy preparat BCG w postaci sonikatu stosowany w szczepieniach ochronnych przeciwko gruźlicy może modyfikować podatność na infekcję koronawirusem 229E (HCoV 229E) ludzkiego śródbłonna naczyń płucnych oraz generowaną wobec niego odpowiedź przeciwwirusową i zapalną *in vitro*.

W pierwszym etapie badania wykazaliśmy, że śródbłonek naczyń płucnych wykazuje powierzchniową ekspresję aminopeptydazy N (AP-N), która pełni funkcję receptora wejścia dla HCoV 229E. Stwierdziliśmy, iż HCoV 229E może infekować śródbłonek naczyń płucnych, ponieważ w 72 godzinie po ekspozycji na wirusa odnotowaliśmy jego obecność w materiale komórkowym. Obecności wirusa w śródbłonce nie towarzyszył wzrost ekspresji mRNA dla INF-β, jednakże zaobserwowaliśmy zwiększenie ekspresji mRNA dla cytokin i chemokin zapalnych: IL-6 oraz IP-10, jak również MDA5 należącego do rodziny receptorów RLR, którego zadaniem jest wychwytywanie nici podwójnego wirusowego RNA. Powyższe wyniki wskazują na efektywne zakażenie śródbłonna naczyniowego HCoV 229E, któremu towarzyszy aktywacja zapalna w postaci nasilenia produkcji cytokin prozapalnych wraz z aktywacją aparatu sensorycznego receptorów PRR, w tym RLR. Jest to pierwsze doniesienie ukazujące, że śródbłonek naczyń płucnych może podlegać infekcji koronawirusem 229E. Podobnie w badaniach *ex vivo* wykazano, że śródbłonek naczyniowy może

być zakażony przez koronawirusa SARS-CoV-2 w przebiegu COVID19 [16].

W drugim etapie badania dokonaliśmy oceny wpływu sonikatu BCG na podatność na zakażenie HCoV 229E oraz zdolność do generowania potencjału przeciwwirusowego i zapalnego przez komórki śródbłonna naczyniowego. Uzyskany w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego sonikat BCG posłużył jako źródło komponentów prątków *M. bovis*, które zostały użyte do stymulacji komórek w hodowlach *in vitro*. Zaobserwowaliśmy, że BCG nie wpłynęło na ekspresję mRNA dla AP-N - receptora wejścia dla HCoV 229E. Podobnie BCG nie zmieniło ekspresji mRNA dla TLR3 i MDA5. Nie odnotowano również istotnego statystycznie wpływu BCG na ekspresję mRNA dla INF-β oraz IP-10 zarówno w 24 jak i 72 godzinie stymulacji. Co ciekawe, śródbłonek poddany ekspozycji BCG zmniejszył ekspresję mRNA dla IL-6 w 72 godzinie. Wyniki badań z zastosowaniem żywych prątków *Mycobacterium* sugerują możliwość aktywacji wewnątrzkomórkowych receptorów, takich jak TLR3/7/8 i RLR [8,17,18]. Ponadto wykazano, iż *Mycobacterium bovis* nasila produkcję cytokin zapalnych, w tym IL-6 i RANTES przez makrofagi, co mogło wiązać się z naturalnym przedostaniem się żywych prątków do wnętrza komórek [19]. Co więcej, wykazano, że żywe BCG mogą nasilać uwalnianie zapalnych cytokin przez komórki nabłonka oddechowego [20]. W literaturze nie ma prac wykazujących wpływ BCG czy innych prątków *Mycobacterium* na komórki śródbłonna naczyniowego. Wyniki naszych badań nie wskazują, aby BCG przygotowywało komórki śródbłonna naczyniowego na infekcję koronawirusem HCoV 229E w zakresie ekspresji powierzchniowej AP-N, jak również receptorów PRR.



Celem ostatniego etapu pracy była odpowiedź na pytanie czy ekspozycja śród błonka naczyń płucnych na BCG poprzedzająca infekcję koronawirusem HCoV 229E może wpływać na zakażenie oraz generowanie odpowiedzi przeciwwirusowej i zapalnej. Nie wykazaliśmy, aby uprzednia ekspozycja komórek na BCG w postaci sonikatu wpłynęła na absorpcję wirusa oraz tempo jego replikacji. Sonikat BCG nie modyfikował ekspresji mRNA ani dla MDA5, ani dla IFN- $\beta$ , IL-6 czy IP-10.

Podsumowując, w niniejszej pracy wykazaliśmy, iż koronawirus HCoV 229E może infekować śród błonek naczyń i tym samym prowadzić do jego aktywacji zapalnej. Jednakże ekspozycja komórek śród błonka naczyniowego na sonikat BCG poprzedzająca infekcję nie ma wpływu ani na podatność oraz stopień infekcji wirusem HCoV 229E, jak również na generowanie wrodzonych mechanizmów przeciwwirusowych i zapalnych.

## Piśmiennictwo

- Covián C., Fernández-Fierro A., Retamal-Díaz A., Díaz F. E., Vasquez A. E., Lay M. K., Riedel C. A., González P. A., Bueno S. M., Kalergis A. M. 2019. BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design. *Front in Immunol*, 10:2806:1–14
- Arts R. J. W., Moorlag Simone J. C. F. M., Novakovic B., Li Y., Wang S-Y., Oosting M., Kumar V., Xavier R.J., Wijmenga C., Joosten L. A. B., Reusken Ch. B. E. M. B., Christine S., Aaby P., Koopmans, M. P., Stunnenberg H. G. van Crevel R., Netea M. G. 2018. BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host & Microbe*, 23(1), 89–100.e5
- Charoenlap S., Piromsopa K., Charoenlap C. 2020. Potential role of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination in COVID-19 pandemic mortality: Epidemiological and Immunological aspects. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 38(3):150–161.
- Pasco S. T., Anguita J. 2020. Lessons from Bacillus Calmette-Guérin: Harnessing Trained Immunity for Vaccine. *Development Cells*. 16;9(9):2109.
- Yitbarek K, Abraham G, Girma T, Tilahun T, Woldie M. 2020. The effect of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination in preventing severe infectious respiratory diseases other than TB: Implications for the COVID-19 pandemic. *Vaccine*, 38(41):6374–6380.
- Rusek P, Wala M., Druszczyńska M., Fol M. 2018. Infectious Agents as Stimuli of Trained Innate Immunity. *Int J Mol Sci*, 19(2):456.
- Chałubiński M., Gajewski A., Kowalski M. L. 2020. The relationship between human coronaviruses, asthma and allergy-An unresolved dilemma. *Clin Exp Allergy*, 50(10):1122–1126.
- Burkert S., Schumann R. R. 2020. RNA Sensing of Mycobacterium tuberculosis and Its Impact on TB Vaccination Strategies. *Vaccines (Basel)*, 4;8(1):67.
- IL-33 augments the effect of rhinovirus HRV16 on inflammatory activity of human lung vascular endothelium-possible implications for rhinoviral asthma exacerbations. Gajewski A, Gawrysiak M, Szewczyk R, Gulbas I, Likońska A, Michlewska S, Kowalski ML, Chałubiński M. *Allergy*. 2021 Jul;76(7):2282-2285.
- Chałubiński M, Szulc A, Pawełczyk M, et al. Human rhinovirus 16 induces antiviral and inflammatory response in the human vascular endothelium. *Apmis*. 2021;129(3):143-151.
- Gawrysiak M, Human rhinovirus HRV16 impairs barrier functions and regeneration of human lung vascular endothelium. *Allergy*. 2020 Nov 28.
- Miyasaka M. 2020. Is BCG vaccination causally related to reduced COVID-19 mortality EMBO Mol Med, 12(6): e12661.
- Charoenlap S., Piromsopa K., Charoenlap C. 2020. Potential role of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination in COVID-19 pandemic mortality: Epidemiological and Immunological aspects. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 38(3):150–161.
- Wannigama D. L, Jacquet A. 2020. NOD2-dependent BCG-induced trained immunity: A way to regulate innate responses to SARS-CoV2? *Int J Infect Dis*, 101:52–55.
- Fol M., Włodarczyk M., Druszczyńska M. 2020. Host Epigenetics in Intracellular Pathogen Infections. *Int J Mol Sci*, 21(13):4573
- Bernard I., Limonta D., Mahal L. K., Hobman T. C. 2020. Endothelium Infection and Dysregulation by SARS-CoV-2: Evidence and Caveats in COVID-19. *Viruses*. 26;13(1):29.
- Gupta N., Kumar R., Agrawal B. 2018. New Players in Immunity to Tuberculosis: The Host Microbiome, Lung Epithelium, and Innate Immune Cells. *Front Immunol*, 9:709–719.
- Ranjbar S., Haridas V., Nambu A., Jasenosky L. D., Sadhukhan S., Ebert T. S., Hornung V., Cassell G. H., Falvo J. V., Goldfeld A. E. 2019. Cytoplasmic RNA Sensor Pathways and Nitazoxanide Broadly Inhibit Intracellular Mycobacterium tuberculosis Growth. *iScience*, 22:299–313
- Stevens MT, Nagaria BD, Britton WJ, Saunders BM. Immunol Macrophages of different tissue origin exhibit distinct inflammatory responses to mycobacterial infection. *Cell Biol*. 2021 Nov;99(10):1085-1092.
- Chuquimia OD, Petursdottir DH, Rahman MJ, Hartl K, Singh M, Fernández C. The role of alveolar epithelial cells in initiating and shaping pulmonary immune responses: communication between innate and adaptive immune systems. *PLoS One*. 2012;7(2):e32125. doi: 10.1371/journal.pone.0032125. Epub 2012 Feb 29.