

КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ НУКЛЕОТИДНЫМИ ЗАМЕНАМИ В ГЕНЕ ГЛИЦЕРОЛ-3-ФОСФАТ ОКСИДАЗЫ, УРОВНЕМ ПРОДУКЦИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬЮ *Mycoplasma pneumoniae*

Т.В. ГЛИНКИНА, С.А. КОСТЮК

Белорусская медицинская академия последипломного образования,
220013 г. Минск, ул. П. Бровки 3, к. 3, Беларусь

E-mail: kuklitsk@mail.ru

Пероксид водорода, один из основных факторов патогенности Mycoplasma pneumoniae, выделяется в реакции, катализируемой ферментом глицерол-3-фосфат (ГЗФ) оксидазой (ЕС 1.1.3.21). В ходе исследования выявлены нуклеотидные замены в гене глицерол-3-фосфат оксидазы клинических изолятов Mycoplasma pneumoniae, наличие которых сопровождалось различными уровнями продукции пероксида водорода и цитотоксичностью изолятов Mycoplasma pneumoniae в отношении клеток респираторного эпителия.

Ключевые слова: *Mycoplasma pneumoniae*, глицерол-3-фосфат оксидаза, нуклеотидные замены, пероксид водорода, цитотоксичность.

Введение. *Mycoplasma pneumoniae* инфицирует респираторный тракт человека и является этиологическим фактором различных нозологических форм респираторной патологии: синусит, фарингит, ларингит, бронхит, пневмония, бронхиальная астма [1]. Среди отличительных особенностей патогена – малый геном, отсутствие клеточной стенки и ограниченные метаболические возможности. Как и у грамположительных стрептококков, от которых произошли микоплазмы, у *Mycoplasma pneumoniae* отсутствуют такие метаболические пути как цикл трикарбоновых кислот и электрон-транспортная цепь с цитохромами. Поэтому основное значение для патогена в обеспечении энергетическими ресурсами приобретает гликолиз [2]. Данный метаболический путь тесно связан с патогенностью *Mycoplasma pneumoniae*, поскольку в ходе реакций гликолиза выделяется пероксид водорода, который помимо бактерицидного действия оказывает цитопатическое действие на клетки респираторного тракта [3].

Пероксид водорода – универсальный патогенетический маркер, который выделяется *Muco-*

plasma pneumoniae в ходе реакции превращения глицерола в дигидроксиацетонфосфат. Данная реакция катализируется ферментом глицерол-3-фосфат (ГЗФ) оксидазой (ЕС 1.1.3.21) [3]. Наличие ГЗФ оксидазы – отличительное свойство *Mycoplasma pneumoniae*, поскольку у большинства микроорганизмов действует ГЗФ дегидрогеназа (ЕС 1.1.1.8), в реакции с которой электроны уходят к никотинамидадениндинуклеотиду (НАД) и пероксид водорода не образуется. ГЗФ оксидаза *Mycoplasma pneumoniae* восстанавливает молекулярный кислород в пероксид водорода. Этот процесс является важным фактором, обуславливающим цитотоксичные свойства возбудителя [4].

Для микоплазменной инфекции характерен различный характер течения инфекционного процесса от легких форм до тяжелых патологий [1, 5]. Гетерогенность гена ГЗФ оксидазы *Mycoplasma pneumoniae* может стать причиной различного уровня продукции пероксида водорода и как следствие, будут формироваться клинические варианты течения микоплазменной инфекции. В настоящее время ГЗФ оксидаза *Mycoplasma pneumoniae* рассматривается как возможная мишень для терапевтического воздействия [3], однако мало известно о структурных особенностях гена фермента у *Mycoplasma pneumoniae*, выявляемой в биологическом материале пациентов с респираторной патологией, а также об особенностях продукции пероксида водорода клиническими изолятами *Mycoplasma pneumoniae*. ГЗФ оксидаза *Mycoplasma pneumoniae* включает флавинадениндинуклеотид (ФАД) связывающий и субстрат связывающий домены, при этом ФАД связывающий домен принимает участие в переносе протона с образованием пероксида водорода [2], поэтому представляет интерес изучение фрагмента гена ГЗФ оксидазы *Mycoplasma pneumoniae*, соответствующего данному домену.

Цель исследования: выявить возможные генетические варианты *Mycoplasma pneumoniae* по фрагменту гена глицерол-3-фосфат оксидазы, соответствующему ФАД связывающему домену фермента, и изучить их патогенные свойства.

Материалы и методы. Получение клинических изолятов *Mycoplasma pneumoniae*. Материалом для получения изолятов *Mycoplasma pneumoniae* стали мокрота, соскобы эпителиальных клеток из носоглотки (далее соскобы), трахеобронхиальный секрет 85 детей и подростков с диагнозами бронхит и пневмония (от рождения до 15 лет), у которых была выявлена ДНК *Mycoplasma pneumoniae*.

Для выделения *Mycoplasma pneumoniae* из клинического материала анализируемую пробу биологического материала в объеме 100 мкл помещали в 1 мл среды для микоплазм (бульон основа с добавкой для микоплазм, Thermo Scientific. Oxoid), но без источника энергии – глюкозы и с антибактериальными агентами (пенициллин и талия ацетат) для подавления роста сопутствующей микрофлоры. Посевы выдерживали 30 мин при комнатной температуре, затем переносили в среду культивирования с добавлением глюкозы и инкубировали в течение 2–3 недель при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Наличие роста возбудителя оценивали двумя методами: визуально – по изменению цвета рН-индикатора питательной среды с красной на желтую и с применением метода ПЦР РВ (набор LightMix *Mycoplasma pneumoniae*, TIV MOLBIOL GmbH, Германия). В качестве референсного штамма использовали *Mycoplasma pneumoniae* ATCC 15531.

Изучение гена глицерол-3-фосфат оксидазы Mycoplasma pneumoniae. Выделение ДНК из биологического материала пациентов (соскоб, трахеобронхиальный секрет), культуральной жидкости проводили методом сорбционной экстракции (наборы QIAamp DNA Mini, Qia-Gen, Германия и «РеалБест ДНК-экстракция 1», АО «ВЕКТОР-БЕСТ», Российская Федерация). Осадок клеточных элементов мокроты использовали для выделения ДНК с применением бромистого цетилтриметиламмония [6].

ДНК, выделенную из 54 клинических изолятов *Mycoplasma pneumoniae*, референсного штамма *Mycoplasma pneumoniae*, биологическо-

го материала подвергали амплификации с использованием синтезированных пар праймеров (ОДО «Праймтех», Республика Беларусь), подобранных на основе структуры гена ГЗФ оксидазы *Mycoplasma pneumoniae* штамм M129 (MPN051, номер в GeneBank NC_000912.1, регион 63494...64648):

MPN051-forward – 5'-40-ATAGGCTGTGCCA-CTGCTTA-59-3'

MPN051-reverse – 5'-700-ACTGACCTCGACG-GGTTGT-682-3'

по программе 95 °С 5 мин, 45 циклов 95 °С 60 с, 58 °С 60 с, 72 °С 60 с, 1 цикл 72 °С 10 мин. Ожидаемый размер ПЦР-продукта составил 660 п.о.

Нуклеотидная последовательность полученного фрагмента гена ГЗФ оксидазы *Mycoplasma pneumoniae* изучалась с применением метода секвенирующей ПЦР по Сенгеру. Исследования проводили с использованием набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Applied Biosystems, США). Полученные фрагменты разделялись методом капиллярного электрофореза в полиакриламидном геле на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США). Данные о нуклеотидной последовательности образцов рассматривались с использованием нуклеотид-нуклеотид BLAST поисковой системы (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) для идентификации соответствия последовательности референсному гену. Нуклеотидная последовательность референсного гена была получена из GenBank базы данных и представлена *Mycoplasma pneumoniae* штамм M129 ген MPN051 (NC_000912.1, регион 63494...64648).

Определение in vivo продукции пероксида водорода. Проводили определение продукции пероксида водорода клиническими изолятами и референсным штаммом *Mycoplasma pneumoniae*. Для этого выращенные в среде для микоплазм бактерии ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере до достижения суспензиями *Mycoplasma pneumoniae* оптической плотности 1 о.е. на длине волны 550 нм (OD₅₅₀ = 1). К 1 мл полученных суспензий *Mycoplasma pneumoniae* добавляли глицерол, конечная концентрация которого составила 100 мкмоль/л, что соответствует концентрации глицерола в сыворот-

ке крови [2]. Аликвоты суспензий *Mycoplasma pneumoniae* без добавления глицерола служили в качестве контроля. Продукцию пероксида водорода оценивали через 2 часа с использованием тест-полосок Merckoquant peroxide test (Merck, Германия). Тест-полоски погружали в суспензии *Mycoplasma pneumoniae* на 1 сек, по изменению цвета тест-полосок судили о количестве образованного пероксида водорода. Диапазон измерения пероксида водорода 0,5–25 мг/л. Оценку продукции пероксида водорода проводили в трех параллельных экспериментах для каждого изолята и референсного штамма *Mycoplasma pneumoniae*. Медиана (Me) и интерквартильный размах (IQR) использовались для характеристики данных.

Оценка цитотоксичности *Mycoplasma pneumoniae* в культуре клеток. *In vitro* моделью стала клеточная линия карциномы легких человека A549. Источник: американская коллекция типовых культур ATCC (CCL-185). Клетки высевали в 24-луночные планшеты в концентрации 5×10^5 клеток на лунку и инкубировали в течение 24 часов при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ для достижения 100 % конфлюэнтности. Для оценки цитотоксичности клинических изолятов и референсного штамма *Mycoplasma pneumoniae* достигшие конфлюэнтности A549 клетки инфицировали суспензиями *Mycoplasma pneumoniae*, соответствующими

стандарту МакФарланда 2 Ед. Через 24, 48 и 72 ч цитотоксичность при действии *Mycoplasma pneumoniae* оценивалась после окрашивания трипановым синим [7] как относительное количество нежизнеспособных клеток. Для этого A549 клетки отделяли с поверхности роста путем обработки 0,25 % трипсином, 20 мкл клеточной суспензии смешивали с 20 мкл 0,4 % раствора трипанового синего, в камере Горяева производили подсчет светлых клеток (не содержащих трипановый синий, жизнеспособных) и темных клеток (содержащих включения трипанового синего, нежизнеспособных). Расчет показателя цитотоксичности (%) проводили по формуле: [количество темных клеток/(количество темных клеток + количество светлых)]. Тест на цитотоксичность выполнялся в триплетях для оценки воспроизводимости результатов исследования. Медиана (Me), первый квартиль (Q₂₅) и третий квартиль (Q₇₅) использовались для характеристики данных в группах изолятов *Mycoplasma pneumoniae*.

Результаты исследований и их обсуждение.

В ходе генетического анализа структуры фрагмента гена ГЗФ оксидазы, соответствующего ФАД связывающему домену, 54 клинических изолятов *Mycoplasma pneumoniae* впервые выявлены синонимичные и несинонимичные нуклеотидные замены (табл. 1). Полученные данные соответствовали результатам прямого сек-

Таблица 1. Генетический анализ последовательности гена ГЗФ оксидазы *Mycoplasma pneumoniae*

№ изолята	Позиция в гене MPN051, (NC_000912.1, регион 63494...64648)						Изменение в полипептидной цепи	Продукция пероксида водорода, Me, мг/л
	99	152	163	181	391	432		
3	–	A→T	–	–	T→C	–	His51Leu	5
17	A→G	–	–	–	–	A→G	-	10
26, 33	–	A→T	–	–	–	–	His51Leu	5
29, 46, 50	–	–	G→C	–	–	–	Asp55His	25
35	A→G	–	–	–	–	–	-	10
39	–	–	–	T→G	–	–	Leu61Val	10
41	A→G	–	G→C	–	–	–	Asp55His	25
У референсного штамма и у клинических изолятов <i>Mycoplasma pneumoniae</i> 1–2, 4–16, 18–25, 27, 28, 30–32, 34, 36–38, 40, 42–54 не были выявлены нуклеотидные замены в исследуемом фрагменте гена ГЗФ оксидазы								10

Примечание: ^a – IQR был равен нулю для каждого изолята и референсного штамма *Mycoplasma pneumoniae*

венирования ДНК патогена при выделении непосредственно из биологического материала, минуя стадию культивирования *in vitro*, что позволяет исключить влияние процесса культивирования на вероятность образования выявленных нуклеотидных замен в гене ГЗФ оксидазы *Mycoplasma pneumoniae*.

Mycoplasma pneumoniae продуцировала пероксид водорода исключительно в присутствии субстрата – глицерола, уровень продукции пероксида водорода референсным штаммом *Mycoplasma pneumoniae* составил 10 мг/л, что согласуется с ранее полученными данными по исследованию продукции пероксида водорода *Mycoplasma pneumoniae* [4, 8].

По данным табл. 1 для изолятов *Mycoplasma pneumoniae* с синонимичными нуклеотидными заменами A99G, T391C и A432G и несинонимичной нуклеотидной заменой T181G уровень продукции пероксида водорода составил 10 мг/л и соответствовал значению данного показателя для изолятов *Mycoplasma pneumoniae*, у которых не были выявлены нуклеотидные замены, включая референсный штамм *Mycoplasma pneumoniae*.

В свою очередь две несинонимичные замены: A152T (His51Leu) и G163C (Asp55His), выявленные в гене ГЗФ оксидазы клинических изолятов *Mycoplasma pneumoniae*, были ассоциированы с низким (5 мг/л) и высоким (25 мг/л)

Таблица 2. Значения цитотоксичности (%) для группы изолятов *Mycoplasma pneumoniae* с определенным уровнем продукции пероксида водорода по отношению к культурам клеток A549, Me [Q₂₅; Q₇₅]

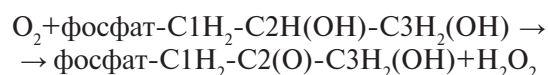
Время инкубации, ч	Продукция пероксида водорода <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , мг/л		
	5	10	25
24	20* [18,5;26]	37 [30,25;45]	51* [48,5; 54,75]
48	31* [27;32,5]	53 [37,75; 62,25]	84* [77,75; 88,75]
72	68* [67;71]	85 [76,5;90,5]	96* [92,25; 7,5]

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

уровнями продукции пероксида водорода соответственно.

Аминокислотные замены His51Leu и Asp55His могут быть значимыми для реализации патогенного потенциала изолятов *Mycoplasma pneumoniae*, связанного с продукцией пероксида водорода.

Пероксид водорода образуется в результате реакции, катализируемой ГЗФ оксидазой:



His в позиции 51 полипептидной цепи ГЗФ оксидазы является существенным для образования пероксида водорода: атом протона от C2 атома субстрата (глицерол-3-фосфата) переносится на атом азота имидазольного кольца гистидина, далее на N5 атом ФАД и затем на конечный акцептор – молекулярный кислород, в результате чего образуется пероксид водорода [2]. Замена His51Leu может замедлить или даже прервать реакцию образования пероксида водорода, поскольку Leu не содержит атома азота, способного принять протон. Клинические изоляты *Mycoplasma pneumoniae* с нуклеотидной заменой A152T, приводящей к замене His51Leu, характеризовались снижением патогенных свойств, что выражалось в снижении продукции пероксида водорода: 5 мг/л в сравнении с результатами определения продукции пероксида водорода изолятами *Mycoplasma pneumoniae* без нуклеотидных замен (10 мг/л).

Высокий уровень продукции пероксида водорода (25 мг/л), выявленный у 4 изолятов *Mycoplasma pneumoniae* с заменой G163C (Asp55His), может быть обусловлен тем, что появившийся в результате замены His55 вблизи His51 принимает на себя функцию дополнительного переносчика протона для образования молекулы пероксида водорода. Повышенная продукция пероксида водорода изолятами *Mycoplasma pneumoniae* с заменой G163C (Asp55His) может рассматриваться как усиление патогенных свойств микроорганизма в результате появления нуклеотидной замены.

Метаболизм глицерола *Mycoplasma pneumoniae* приводит к продукции пероксида водорода – одного из основных факторов патогенности микроорганизма, оказывающего цитоток-

сический эффект в отношении клеток респираторного эпителия.

Для оценки цитотоксичности клинических изолятов *Mycoplasma pneumoniae* проводили инфицирование A549 клеток культурами *Mycoplasma pneumoniae*. Клеточная линия A549 несет все характерные признаки альвеолярных клеток 2-го типа и широко используется для оценки действия различных инфекционных агентов на респираторный эпителий [9]. Инфицирование A549 клеток *Mycoplasma pneumoniae* было подтверждено через 24, 48 и 72 часа обнаружением ДНК микроорганизма методом ПЦР, в контрольных клетках ДНК *Mycoplasma pneumoniae* не была обнаружена. Выявленными признаками цитопатического действия *Mycoplasma pneumoniae* в отношении A549 клеток стали: разрывы в монослоях клеток, округление клеток, увеличение в размерах ядер, вакуолизация цитоплазмы.

Клинические изоляты *Mycoplasma pneumoniae*, продуцирующие пероксид водорода наравне с референсным штаммом *Mycoplasma pneumoniae* (10 мг/л), вызывали практически полный лизис A549 клеток к третьему дню инфицирования (цитотоксичность 85 %, табл. 2).

Изоляты *Mycoplasma pneumoniae*, продуцирующие пероксид водорода в концентрации 5 мг/л, характеризовались значимо сниженной цитотоксичностью (табл. 2) в сравнении с изолятами, продуцирующими пероксида водорода в концентрации 10 мг/л, что выражалось в присутствии большего количества жизнеспособных клеток в каждом временном периоде. Все изоляты *Mycoplasma pneumoniae*, продуцирующие пероксид водорода в концентрации 5 мг/л, являлись носителями нуклеотидной замены A152T, в результате которой значимый для активности фермента ГЗФ оксидазы His51 заменялся на Leu. Изоляты *Mycoplasma pneumoniae* с данной нуклеотидной заменой продуцировали меньше пероксида водорода, чем изоляты *Mycoplasma pneumoniae*, в гене ГЗФ оксидазы которых отсутствовала нуклеотидная замена A152T, и проявляли сниженную цитотоксичность по отношению к клеткам респираторного эпителия. Изоляты *Mycoplasma pneumoniae*, продуцирующие пероксид водорода в концентрации 25 мг/л и несущие замену G163C (Asp55His), проявляли самую высокую цитотоксичность: A549 клетки были практиче-

ски полностью лизированы спустя 48 часов после их инфицирования *Mycoplasma pneumoniae*.

Выводы. Активность ГЗФ оксидазы *Mycoplasma pneumoniae* определяет проявление патогенных свойств *Mycoplasma pneumoniae* вследствие продукции в ходе работы фермента пероксида водорода, который оказывает разрушающее действие на клетки респираторного эпителия. В гене ГЗФ оксидазы изолятов *Mycoplasma pneumoniae*, полученных из биологического материала пациентов с бронхитами и пневмониями микоплазменной этиологии, выявлены замены A152T (His51Leu) и G163C (Asp55His), наличие которых сопровождалось вариабельностью активности фермента, выражавшейся в продукции пероксида водорода в разных концентрациях в сравнении с референсным штаммом *Mycoplasma pneumoniae*, клиническими изолятами *Mycoplasma pneumoniae* без нуклеотидных замен и клиническими изолятами *Mycoplasma pneumoniae*, у которых были выявлены иные нуклеотидные замены в гене ГЗФ оксидазы.

Изоляты *Mycoplasma pneumoniae*, несущие замену A152T (His51Leu), продуцировали пероксид водорода значимо ниже уровня продукции референсным штаммом и проявляли сниженную цитотоксичность по отношению к клеткам респираторного эпителия, тогда как изоляты *Mycoplasma pneumoniae*, несущие замену G163C (Asp55His), характеризовались усиленным патогенными свойствами, что проявлялось в повышенной продукции пероксида водорода и более выраженной цитотоксичности по отношению к клеткам респираторного эпителия. В данном исследовании 3 из 4 изолятов *Mycoplasma pneumoniae* с заменой G163C (Asp55His) были выделены из клинического материала пациентов со смешанным хламидийно-микоплазменным инфицированием. Можно предполагать, что данные изоляты *Mycoplasma pneumoniae* с усиленными патогенными свойствами могут стать причиной развития более тяжелых форм микоплазменной инфекции, ассоциированных с инфицированием другими микроорганизмами.

Соответствие этическим стандартам. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стан-

дартами институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Это исследование не получало какого-либо конкретного гранта от финансирующих учреждений в государственном, коммерческом или некоммерческом секторах.

CORRELATION BETWEEN NUCLEOTIDE SUBSTITUTIONS IN THE GLYCEROL-3-PHOSPHATE OXIDASE GENE, THE LEVEL OF HYDROGEN PEROXIDE PRODUCTION AND CYTOTOXICITY OF *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

T.V. Hlinkina, S.A. Kastsyuk

State Educational Establishment «Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education»,
220013, Minsk, P. Brovki Str. 3, 3, Belarus

E-mail: kuklitsk@mail.ru

Mycoplasma pneumoniae is the etiological agent of various forms of human respiratory pathology: sinusitis, pharyngitis, laryngitis, bronchitis, pneumonia, bronchial asthma. One of the main pathogenic factors of *Mycoplasma pneumoniae*, hydrogen peroxide, is released in the enzymatic reaction catalyzed by glycerol-3-phosphate (G3P) oxidase. In the G3P oxidase gene of *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates, obtained from the biological material of patients with bronchitis and pneumonia of mycoplasma etiology, A152T (His51Leu) and G163C (Asp55His) substitutions have been identified, associated with the variations in enzyme activity. *Mycoplasma pneumoniae* isolates, carrying the A152T substitution (His51Leu), produced hydrogen peroxide significantly lower (5 mg/l) in comparison with the reference strain (10 mg/l) and had reduced cytotoxicity to respiratory epithelial cells. While *Mycoplasma pneumoniae* isolates, carrying substitution G163C (Asp55His), were characterized by enhanced pathogenic properties, such as increased production of hydrogen peroxide (25 mg/l) and more pronounced cytotoxicity to respiratory epithelial cells.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saraya, T., Kurai, D., Nakagaki, K., Sasaki, Y., Niwa, S., Tsukagoshi, H., Nunokawa, H., Ohkuma, K.,

- Tsujimoto, N., Hirao, S., Wada, H., Ishii, H., Nakata, K., Kimura, H., Kozawa, K., Takizawa, H., and Goto, H., Novel aspects on the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* and therapeutic implications, *Front Microbiol.*, 2014, vol. 5, article 410.
2. Elkhail, C. K., Kean, K. M., Parsonage, D., Maenpuen, S., Chaiyen, P., Claiborne, A. and Karpus, P.A., Structure and proposed mechanism of L- α -glycerophosphate oxidase from *Mycoplasma pneumoniae*, *FEBS Journal*, 2015, vol. 282, pp. 3030–42.
3. Balish, M.F., Distelhorst, S.L., Potential molecular targets for narrow-spectrum agents to combat *Mycoplasma pneumoniae* infection and disease, *Front Microbiol.*, 2016, vol. 7, article 205.
4. Großhennig, S., Schmidl, S. R., Schmeisky, G., Busse, J., and Stülke, J., Implication of glycerol and phospholipid transporters in *Mycoplasma pneumoniae* growth and virulence, *Infect. Immun.*, 2013, vol. 81, no. 3, pp. 896–904.
5. Wang, M., Wang, Y., Yan, Y., Zhu, C., Huang, L., Shao, X., Xu, J., Zhu, H., Sun, X., Ji, W., and Chen, Z. Clinical and laboratory profiles of refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children, *Int. J. Infect. Dis.*, 2014, vol. 29, pp. 18–23.
6. Willner, D., Daly, J., Whiley, D., Grimwood, K., Wainwright C., and Hugenholtz, Ph., Comparison of DNA extraction methods for microbial community profiling with an application to pediatric bronchoalveolar lavage samples, *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.003460.5>
7. Mitroshina, E.V., Mischenko, T.A., and Vedunova, M.V., *Detection of viability of cell cultures* (in Russian), Nizhni Novgorod: Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 2015, 21 p.
8. Schmidl, S.R., Otto, A., Lluch-Senar, M., Picol, J., Busse, J., Becher, D., and Stülke, J., A trigger enzyme in *Mycoplasma pneumoniae*: impact of the glycerophosphodiesterase GlpQ on virulence and gene expression, *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 9, no. 7. doi:10.1371/journal.ppat.1002263.
9. Li, S., Li, X., Wang, Y., Yang, J., Chen, Z., and Shan, S., Global secretome characterization of A549 human alveolar epithelial carcinoma cells during *Mycoplasma pneumoniae* infection, *BMC Microbiol.*, 2014, vol. 14, article 27.

Поступила в редакцию 26.04.19

После доработки 10.06.19

Принята к публикации 18.01.20