

ВЛИЯНИЕ ОЗОНА НА ПРОФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ СУРФАКТАНТНОГО БЕЛКА А И ЕГО ВАРИАНТОВ

© 2009 А.Н. Микеров^{1,2}, Ю.Ю. Елисеев¹

¹ Саратовский государственный медицинский университет

² Пенсильванский государственный университет, США

Статья получена 08.10.2009 г.

Сурфактантный белок А (SP-A, Surfactant Protein A) - ключевой белок легочного сурфактанта с выраженными иммуномодулирующими свойствами. У человека SP-A кодируется двумя генами - SP-A1 и SP-A2 и соотношение SP-A1/SP-A2 вариантов в легких может быть различным у разных индивидуумов. Выявлено, что SP-A2 стимулирует фагоцитоз более эффективно, чем SP-A1. Озон является одним из основных антропогенных загрязнителей воздуха, оказывающих значительное влияние на здоровье населения. Целью данного исследования было определение влияния озона на профагоцитарную активность SP-A и его вариантов. Белок SP-A, выделенный из сурфактанта легких человека, и рекомбинантные SP-A1 и SP-A2 варианты были сначала обработаны озоном, а затем - использованы для стимулирования фагоцитоза бактерий *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 39018) крысиными альвеолярными макрофагами *in vitro*. В ходе исследования было установлено ($p < 0.05$), что окисление SP-A озоном снижает его способность повышать фагоцитоз бактерий и что озон снижает профагоцитарную активность SP-A2 в большей степени, чем SP-A1. На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что озон негативно влияет на профагоцитарную активность SP-A и что, хотя интактный SP-A2 стимулирует фагоцитоз более эффективно, чем SP-A1, окисление озоном нивелирует это различие, поражая активность SP-A2 в большей степени, чем SP-A1.

Ключевые слова: озон, сурфактантный белок, легкие

Сурфактантный белок А (SP-A, Surfactant Protein A) играет ключевую роль в обеспечении функционирования механизмов врожденного иммунитета в легких. Показано, что SP-A стимулирует хемотаксис макрофагов [1], повышает фагоцитоз бактерий [2-4], модулирует продукцию цитокинов [5-7] и координирует врожденный и приобретенный иммунитет [8]. Показано, что генетически модифицированные мыши, легкие которых не экспрессируют ген SP-A, более чувствительны к экспериментальной пневмонии, чем мыши дикого типа [9]. SP-A человека кодируется двумя генами - *SP-A1* и *SP-A2*. Для *SP-A* охарактеризованы более 30 аллелей, из которых четыре аллели для *SP-A1* ($6A$, $6A^2$, $6A^3$, $6A^4$) и шесть аллелей для *SP-A2* ($1A$, $1A^0$, $1A^1$, $1A^2$, $1A^3$, $1A^5$) встречаются наиболее часто в человеческой популяции [10]. У разных индивидуумов, соотношения SP-A1/SP-A2 вариантов в легких могут быть различными [11]. Выявлено, что SP-A2 варианты в большей степени, чем SP-A1 способны связывать углеводы [12], стимулировать продукцию цитокинов [7, 13] и повышать фагоцитоз [4].

Известно, что озон формирует озоновый экран в стратосфере, защищая планету от губительного влияния ультрафиолетового излучения. В то же время, озон тропосферы – один из

основных антропогенных загрязнителей атмосферного воздуха. Являясь сильным окислителем, он может негативно влиять на функции сурфактанта легких. Показано, что окисление SP-A озоном снижает его способность взаимодействовать с альвеолярными макрофагами [14] и повышать продукцию цитокинов [13]. Хотя одной из наиболее важных функций SP-A является повышение фагоцитоза внедрившихся патогенных микроорганизмов альвеолярными макрофагами, влияние озона на способность SP-A и SP-A вариантов повышать фагоцитоз бактерий альвеолярными макрофагами до сих пор не изучено.

Целью данной работы было исследование влияния озона на профагоцитарную активность SP-A и его вариантов.

Для оценки фагоцитоза был использован SP-A, очищенный из бронхоальвеолярной жидкости человека, а также человеческие рекомбинантные SP-A1 и SP-A2 варианты ($6A^4$, и $1A^0$, соответственно), экспрессированные *in vitro* в Chinese Hamster Ovary -K1 (CHO) клетках, как описано ранее [13]. Препараты SP-A были обработаны *in vitro* озоном в концентрации 1 ppm в течение 4 часов [15]. Уровень окисления белка был проанализирован с помощью реагентов OxyBlot Oxidized Detection Kit (Chemicon, Temecula, CA, USA). Альвеолярные макрофаги были получены из бронхоальвеолярной жидкости крыс. Бактерии *P. aeruginosa* (штамм ATCC 39018) были выращены в течение 18-20 часов на агаре TSA (Tryptic Soy Agar, Sigma). Макрофаги и бактерии были суспендированы в среде RPMI 1640, смешаны в соотношении 1:10 и SP-A был добавлен к смеси в концентрациях 5, 10 и 20 мкг/мл для инкубации в течении 1 часа при 37°C. Анализ

Микеров Анатолий Николаевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры общей гигиены и экологии. E-mail: am.07@inbox.ru

Елисеев Юрий Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры общей гигиены и экологии. E-mail: yeliseev55@mail.ru

фагоцитоза в присутствии SP-A, SP-A1, или SP-A2 вариантов проводили методом световой микроскопии как описано ранее [4]. Фагоцитарный индекс (ФИ) был определен согласно формуле: процент позитивных макрофагов (т.е., макрофагов, фагоцитировавших по крайней мере одну бактерию) × среднее число бактерий на позитивный макрофаг. Величина ФИ была выражена как процент отрицательного контроля (т.е., фагоцитоз в отсутствие SP-A), который был принят за 100%. Данные 3 независимых экспериментов были анализированы с помощью t-test и различия были признаны статистически достоверными в случае, если $p < 0.05$.

Сравнительный анализ уровня фагоцитоза в присутствии различных концентраций SP-A1 и SP-A2 показан на рисунке 1. ФИ интактного или обработанного фильтрованным воздухом препарата SP-A2 был выше, чем ФИ препарата SP-A1 при использовании в концентрации 5, 10 и 20 мкг/мл, соответственно (SP-A2 > SP-A1). Однако профагоцитарная активность обработанных озонем SP-A1 и SP-A2 при использовании в

концентрации 5 и 10 мкг/мл достоверно не отличалась (SP-A2 = SP-A1). Таким образом, озон нивелирует различия в профагоцитарной активности между SP-A1 и SP-A2 при данных белковых концентрациях. Поскольку интактный SP-A1 обладал более низкой профагоцитарной активностью, чем интактный SP-A2, мы сравнили их активность при концентрациях 20 и 5 мкг/мл, соответственно. Хотя активность SP-A2 и SP-A1 достоверно не отличалась между интактными или обработанными фильтрованным воздухом препаратами, после обработки озонем активность SP-A1 была выше чем SP-A2. Более того, было выявлено, что величина отношения озон / интактный препарат (%) или озон / фильтрованный воздух (%) (характеризующая «чистый эффект» влияния озона на активность SP-A) была достоверно выше для SP-A1, чем для SP-A2: 45 и 57 % для SP-A2 в концентрации 5 мкг/мл, соответственно; 72 и 79 % для SP-A1 в концентрации 20 мкг/мл, соответственно. Таким образом, обработка озонем достоверно снижает активность SP-A2 в большей степени, чем SP-A1.

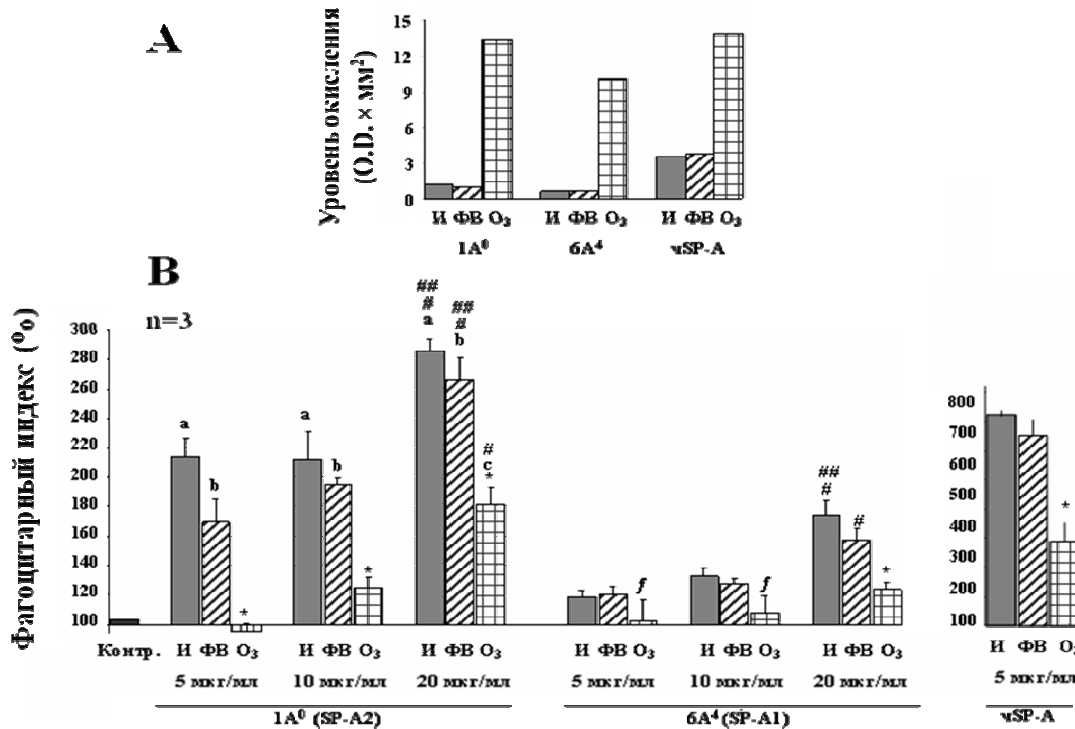


Рис. 1. Фагоцитоз бактерий *P. aeruginosa* крысиными альвеолярными макрофагами в присутствии обработанных озонем человеческого SP-A или SP-A1 и SP-A2 рекомбинантных вариантов
 А: уровень окисления SP-A. В: уровень фагоцитоза в присутствии SP-A (% от контроля). Контр. - контроль (фагоцитоз в отсутствие SP-A, принятый равным 100%); И - интактный SP-A; ФВ - SP-A, обработанный фильтрованным воздухом вместо озона; O₃ - обработанный озонем SP-A; чSP-A - человеческий SP-A. Рекомбинантные SP-A1 и SP-A2 варианты были использованы для стимулирования фагоцитоза в концентрации 5, 10 и 20 мкг/мл, а чSP-A - в концентрации 5 мкг/мл. Статистически достоверные ($p < 0.05$) различия: а, в и с - между активностью И, ФВ и O₃ препаратов SP-A2 и SP-A1, соответственно; * - между O₃ и И или ФВ того же препарата при той же концентрации; # - между 20 и 5 мкг/мл препаратов SP-A2 или SP-A1; ## - между 20 и 10 мкг/мл препаратов SP-A2 или SP-A1; f - недостоверное отличие от контроля (в отсутствие SP-A).

Выводы: в данной работе мы показали, что способность SP-A стимулировать фагоцитоз бактерий *P. aeruginosa* снижается после окисления белка озонем, и что SP-A2 подвергается большему снижению функциональной активности, чем

SP-A1. Таким образом, учитывая важную роль белка SP-A в иммунной защите легких, его окисление может вносить вклад в увеличение риска заболевания пневмонией в условиях повышенного загрязнения воздуха тропосферы

озоном. Более того, различия в геноспецифической активности SP-A в легких также могут проявляться в зависимости от степени загрязнения атмосферного воздуха озоном.

Данная работа была сделана Микеровым А.Н. и соавт. в лаборатории проф. Жоанна Флорос в Колледже Медицины Пенсильванского государственного университета США (Hershey, PA 17033, USA) и данные были ранее опубликованы на английском языке (Mikero AN, Umstead TM, Gan X, Huang W, Guo X, Wang G, Phelps DS, Floros J: Impact of ozone exposure on the phagocytic activity of human surfactant protein A (SP-A) and SP-A variants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, 294:L121-L130).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Wright, J.R. Pulmonary surfactant protein A stimulates chemotaxis of alveolar macrophage / J.R. Wright, D.C. Youmans // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 1993. – 264(4 Pt 1). – P. L338-344.
2. Khubchandani, K.R. Effects of surfactant protein A and NaCl concentration on the uptake of *Pseudomonas aeruginosa* by THP-1 cells / K.R. Khubchandani, R.E. Oberley, J.M. Snyder // *Am J Respir Cell Mol Biol*. – 2001. – 25(6). – P. 699-706.
3. Mariencheck, W.I. Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of a live, mucoid strain of *P. aeruginosa* / W.L. Mariencheck et al. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 1999. – 277(4 Pt 1). – P. L777-786.
4. Mikerov, A.N. Surfactant protein A2 (SP-A2) variants expressed in CHO cells stimulate phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* more than Do SP-A1 variants / A.N. Mikerov et al. // *Infect.Immun.* – 2007. – 75(3). – P. 1403-1412.
5. Borron, P. Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production in vivo / P. Borron et al. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2000. – 278(4). – P. L840-847.
6. Kremlev, S.G. Surfactant protein A stimulation of inflammatory cytokine and immunoglobulin production / S.G. Kremlev, D.S. Phelps // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 1994. – 267(6 Pt 1). – P. L712-719.
7. Wang, G. Human SP-A protein variants derived from one or both genes stimulate TNF-alpha production in the THP-1 cell line / G. Wang et al. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2000. – 278(5). – P. L946-954.
8. Brinker, K.G. Surfactant protein A modulates the differentiation of murine bone marrow-derived dendritic cells / K.G. Brinker, H. Garner, J.R. Wright // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2003. – 284(1). – P. L232-41.
9. LeVine, A.M. Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection / A.M. LeVine et al. // *Am J Respir Cell Mol Biol*. – 1998. – 19(4). – P. 700-708.
10. DiAngelo, S. Novel, non-radioactive, simple and multiplex PCR-cRFLP methods for genotyping human SP-A and SP-D marker alleles / S. DiAngelo et al. // *Dis Markers*. – 1999. – 15(4). – P. 269-281.
11. Tagaram, H.R. Characterization of a human surfactant protein A1 (SP-A1) gene-specific antibody; SP-A1 content variation among individuals of varying age and pulmonary health / H.R. Tagaram et al. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2007. – 292(5). – P. L1052-1063.
12. Oberley, R.E. Recombinant human SP-A1 and SP-A2 proteins have different carbohydrate-binding characteristics / R.E. Oberley, J.M. Snyder // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2003. – 284(5). – P. L871-881.
13. Wang, G. The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant protein A variants to stimulate cytokine production / G. Wang et al. // *Environ. Health Perspect.* – 2002. – 110(1). – P. 79-84.
14. Oosting, R.S. Exposure of surfactant protein A to ozone in vitro and in vivo impairs its interactions with alveolar cells / R.S. Oosting et al. // *Am J Physiol*. – 1992. – 262 (1 Pt 1). – P. L63-68.

IMPACT OF OZONE ON THE PHAGOCYTTIC ACTIVITY OF SURFACTANT PROTEIN A AND ITS VARIANTS

© 2009 A.N. Mikerov^{1,2}, Yu.Yu. Eliseev¹

¹ Saratov State Medical University

² Pennsylvania State University, Hershey, PA, USA

Article is received 2009/10/08

Surfactant Protein A (SP-A, Surfactant Protein A) is the key protein of the lung surfactant that has the immunomodulating activity. In human, SP-A is encoded by two genes, SP-A1 and SP-A2, and the ratio of SP-A1/SP-A2 can be different in the lungs of different individuals. As it was shown before, SP-A2 stimulates phagocytosis more effectively than SP-A1. Ozone is one of the most important anthropogenic air pollutants that considerably influence the health of the human population. The purpose of this study was to investigate the impact of ozone on the phagocytic activity of SP-A and its variants. Human SP-A purified from human lung surfactant, and recombinant SP-A1 and SP-A2 variants were first exposed to ozone and then used for *in vitro* phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 39018) bacteria by rat alveolar macrophages. It was found that ($p < 0.05$), ozone-induced oxidation of SP-A reduces its phagocytic activity and that ozone reduces the phagocytic activity of SP-A2 more dramatically than that of SP-A1. Based on the results, it was concluded that ozone negatively influences the phagocytic activity of SP-A and that although non-exposed intact SP-A2 stimulates phagocytosis more effectively than SP-A1, ozone-induced oxidation eliminates this difference, affecting the SP-A2 activity more than the activity of SP-A1.

Key words: ozone, surfactant protein, lungs

Anatoliy Mikerov, Candidate of Biology, Associate Professor at the Common Hygiene and Ecology Department. E-mail: am.07@inbox.ru

Yuriy Eliseev, Doctor of Biology, Professor at the Common Hygiene and Ecology Department. E-mail: yeliseev55@mail.ru