

## РОЛЬ СУРФАКТАНТНОГО БЕЛКА А И ЕГО ОКИСЛЕНИЯ В ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ

© 2010 А.Н. Микеров<sup>1,2</sup>, Н.И. Алексеева<sup>1</sup>, С.С. Абрамкина<sup>1</sup>, Ю.Ю. Елисеев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского

<sup>2</sup> Пенсильванский государственный университет, США

Поступила в редакцию 29.09.2010

Сурфактантный белок А (SP-A, Surfactant Protein A) выполняет защитную функцию в лёгких, в частности, повышая фагоцитоз бактерий. Озон тропосферы является одним из факторов антропогенного загрязнения воздуха. Окисление SP-A озоном *in vitro* приводит к снижению его профагоцитарной активности. Целью данной работы было изучение влияния блокирования функции SP-A в лёгких (путём элиминации гена *SP-A* или окисления белка SP-A) на чувствительность самок и самцов мышей к экспериментальной пневмонии в условиях воздействия озоном. В работе были использованы самцы и самки мышей дикого типа (ДТ) линии C57BL/6J или изогенных SP-A (-/-) мышей, лишённых гена *SP-A*. Животные были сначала обработаны озоном (или воздухом в качестве контроля), а затем инфицированы интратрахеально бактериями *K. pneumoniae* (ATCC 43816). Мониторинг выживания мышей после пневмонии проводился в течение 14 дней, а *in vivo* фагоцитоз оценивали спустя 1 час после заражения. Кроме того, с использованием мышей ДТ была анализирована степень окисления SP-A спустя 1 час после введения раствора PBS (вместо бактерий). В ходе исследования было обнаружено: 1) ингаляция озона снижала как уровень выживания SP-A (-/-) мышей, так и уровень *in vivo* фагоцитоза бактерий; данному негативному влиянию озона были более подвержены самки, чем самцы, и SP-A (-/-) мыши по сравнению с мышами ДТ; 2) ингаляция озона повышала степень окисления SP-A в бронхоальвеолярной жидкости лёгких; степень окисления SP-A у самок мышей ДТ была выше, чем у самцов. Данные результаты показали, что блокирование функции SP-A путём элиминации гена *SP-A* в генетически модифицированных SP-A (-/-) мышах или путём снижения функциональной активности белка SP-A вследствие его окисления озоном повышает чувствительность мышей к экспериментальной пневмонии после ингаляции озона, и что в обоих случаях самки более подвержены негативному влиянию озона, чем самцы.

Ключевые слова: *SP-A*, озон, окисление, выживание мышей, фагоцитоз, пневмония

Лёгкие человека находятся в постоянном контакте с вредными компонентами тропосферы и повышенный уровень антропогенного загрязнения воздуха в крупных городах негативно влияет на иммунный статус лёгких населения. Озон – один из основных факторов антропогенного загрязнения воздуха, оказывающих значительный эффект на здоровье человека. Повышенная концентрация озона в приземном слое воздуха вызывает раздражение органов дыхания, кашель, тяжесть в груди, способствует развитию астмы и увеличивает

количество ее приступов, снижает иммунитет к респираторным инфекциям [1, 2]. Для ряда лёгочных заболеваний человека характерен половой диморфизм. Известно, что недоношенные новорожденные мальчики подвержены респираторному дистресс-синдрому чаще, чем девочки [3], а мужчины в большей степени, чем женщины – идиопатическому легочному фиброзу и хроническому обструктивному заболеванию легких [4, 5]. В большинстве случаев мужчины также более подвержены пневмониям, чем женщины и имеют менее благоприятные прогнозы течения заболевания [5,7]. В то же время есть данные о том, что пожилые женщины имеют более выраженные респираторные симптомы в ответ на загрязнение воздуха, чем мужчины [8]. Всё это свидетельствует о комплексном влиянии полового диморфизма и факторов окружающей среды на возникновение лёгочных заболеваний и их течение.

Микеров Анатолий Николаевич, кандидат биологических наук, доцент. E-mail: am.07@inbox.ru

Алексеева Наталья Ивановна, кандидат медицинских наук, старший преподаватель

Абрамкина Светлана Сергеевна, аспирантка. E-mail: abramkina-svetla@list.ru

Елисеев Юрий Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой. E-mail: yeliseev55@mail.ru

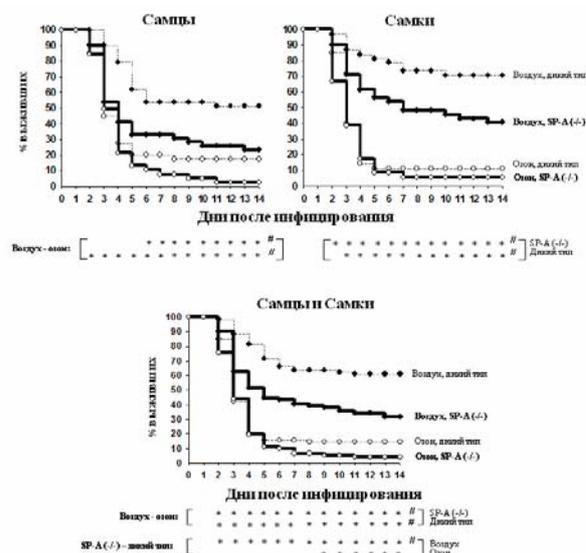
Сурфактантный белок А (SP-A, Surfactant Protein A), обуславливая защитные свойства лёгочного сурфактанта, является фактором, оказывающим влияние на иммунный статус лёгких. Показано, что SP-A повышает хемотаксис макрофагов, фагоцитоз бактерий, пролиферацию клеток иммунной защиты и продукцию провоспалительных цитокинов, а также координирует механизмы врождённого и приобретённого иммунитета [9]. Озон оказывает значительное влияние на функции SP-A. В частности, мы недавно показали, что обработка SP-A *in vitro* озоном снижает способность SP-A стимулировать фагоцитоз грам-положительных и грам-отрицательных бактерий альвеолярными макрофагами [10]. Таким образом, отсутствие экспрессии SP-A (у SP-A (-/-) мышей) или снижение активности SP-A вследствие его окислительной модификации озоном в лёгких (у мышей дикого типа), может быть одним из механизмов, отвечающих за степень чувствительности самок и самцов мышей к пневмонии после ингаляции озола. В представленной работе мы исследовали данное предположение.

**Методы исследования.** Самцы и самки SP-A (-/-) мышей (в возрасте 8-12 недель), лишённые гена SP-A, и созданные на основе мышей дикого типа линии C57BL/6, были разделены на 2 группы по 5 мышей: одна группа была подвергнута ингаляции озола (в дозе 2 ppm в течение 3 часов), а другая – ингаляции фильтрованного воздуха (контроль). Затем все мыши были инфицированы пневмонией, как описано ранее [11]. Всего было проведено 8 независимых экспериментов для каждого пола (5 животных после ингаляции воздуха и 5 – после ингаляции озола в каждом эксперименте). Бактерии *K. pneumoniae* (ATCC 43816) были выращены на питательном бульоне TSB и бактериальная суспензия для заражения была приготовлена в PBS. После ингаляции озола или воздуха, мыши были внутритрахеально инфицированы полученной бактериальной суспензией в дозе 450 КОЕ/мышь. Трахея была освобождена от окружающих мышц, после чего инъекция производилась шприцем, а разрез в коже впоследствии закрывался с помощью 7 мм хирургических клипсов. Анализ выживания мышей от пневмонии проводился ежедневно в течении 14 дней. В качестве контроля уровня выживания SP-A (-/-) мышей использовались самки и самцы мышей дикого типа линии C57BL/6 (11), которые были обработаны таким же образом, как и SP-A (-/-) мыши. Кроме того, с использованием мышей дикого типа (C57BL/6) были анализированы уровень фагоцитоза *in vivo* (в лёгких) и уровень окисления белков (в т.ч. окисление SP-A) в лёгких спустя

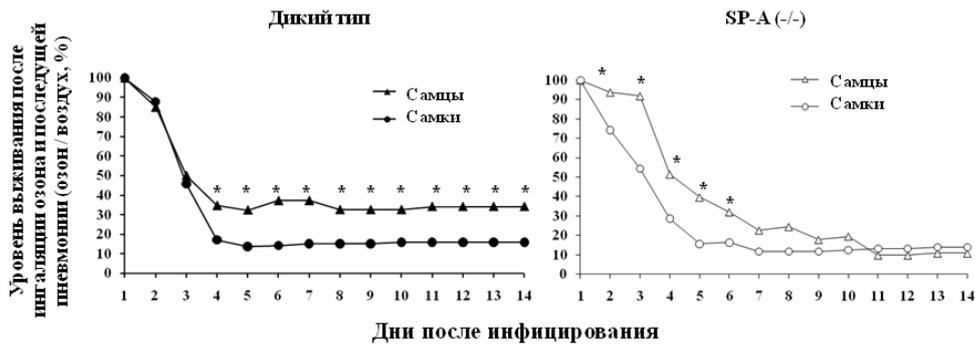
1 час после введения суспензии бактерий *K. pneumoniae* (в дозе  $1,2 \times 10^7$  КОЕ/мышь) или PBS, соответственно. Было проведено 4-5 независимых экспериментов для каждого пола и для каждого анализа, а один эксперимент включал в себя использование 3 мышей для обработки озоном и 3 мышей – воздухом. Подготовка бактерий, обработка животных озоном и инфицирование пневмонией проводилось также, как описано выше для исследования уровня выживания мышей. Для анализа выживаемости, был использован log-rank тест, Fisher's exact test, и z-тест. В остальных случаях, данные были анализированы с помощью t-теста. Результаты были признаны статистически достоверными в случае, если  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** В ходе исследования было обнаружено:

- 1) ингаляция озола снижала как уровень выживания SP-A (-/-) мышей (рис. 1 и 2), так и уровень фагоцитоза бактерий в условиях *in vivo* (рис. 3) у SP-A (-/-) мышей после экспериментальной пневмонии ( $p < 0,05$ ); данному негативному влиянию озола были более подвержены самки, чем самцы, и SP-A (-/-) мыши по сравнению с мышами дикого типа ( $p < 0,05$ );
- 2) ингаляция озола повышала уровень окисления SP-A в бронхоальвеолярной жидкости лёгких ( $p < 0,05$ ); окисление SP-A было в большей степени у самок мышей дикого типа, чем у самцов ( $p < 0,05$ ) (рис. 4).

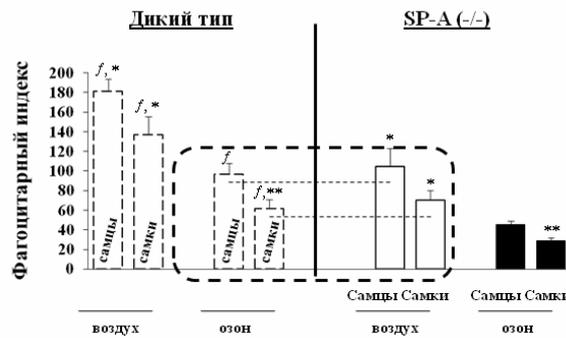


**Рис. 1.** Влияние озола на выживание SP-A (-/-) мышей после пневмонии. Данные, полученные с использованием мышей дикого типа представлены с целью сравнения с данными по SP-A (-/-) мышам. #: статистически достоверные данные по результатам log-rank test (кумулятивное выживание на протяжении всех 14 дней); \*: статистически достоверные данные по результатам Fisher's exact test (подневное выживание)



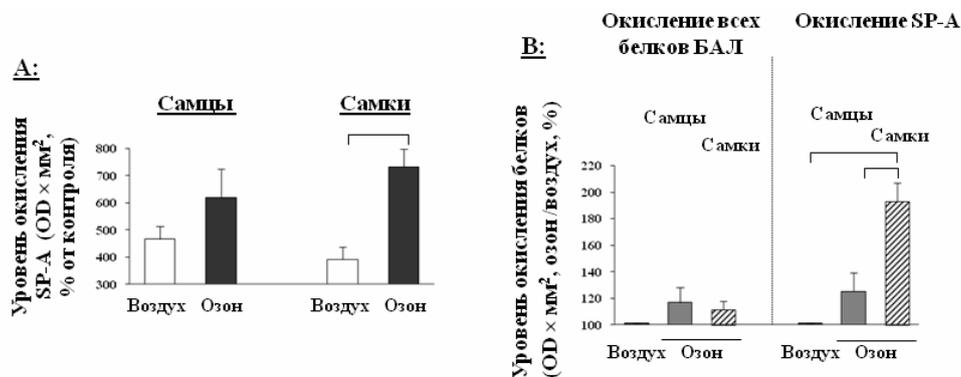
**Рис. 2.** Подневное сравнение уровня выживания самок и самцов SP-A (-/-) мышей после обработки озоном и последующей пневмонии.

Данные, полученные с использованием мышей дикого типа представлены с целью сравнения с данными по SP-A (-/-) мышам. Уровень выживания после пневмонии в контрольной группе мышей (экспозиция воздухом) был принят за 100 %, и для сравнения «чистого» эффекта озона использовалось сравнение пропорций озон / воздух (%), вычисленных на каждый день наблюдения после инфекции. \*: статистически достоверные данные по результатам Z-test (подневное выживание)



**Рис. 3.** Уровень *in vivo* фагоцитоза бактерий *K. pneumoniae* альвеолярными макрофагами выделенными из лёгких мышей после обработки озоном или воздухом.

Данные, полученные с использованием мышей дикого типа представлены с целью сравнения с данными по SP-A (-/-) мышам. Пунктирной линией обозначен схожий уровень фагоцитоза. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью t-test. \*достоверные различия между мышами одного пола, обработанных озоном или воздухом; \*\*достоверные различия между самцами и самками после ингаляции озона; f, достоверные различия между мышами дикого типа и SP-A (-/-) мышами одного пола и после одной и той же обработки (либо воздухом, либо озоном)



**Рис. 4.** Влияние озона на уровень окисления SP-A и белков бронхоальвеолярной жидкости (БАЛ). А: Данные представлены как процент от контроля (SP-A с известной концентрацией на том же иммуноблоте). Б: Данные для мышей, обработанных озоном, представлены как процент от контроля (воздух) для каждого эксперимента. Достоверные различия (t-test) обозначены скобками поверх столбиков

Данные результаты показали, что блокирование функции SP-A путём элиминации гена SP-A в генетически модифицированных SP-A (-/-) мышах или путём снижения функциональной активности SP-A вследствие его окисления озоном может повышать чувствительность мышей к экспериментальной пневмонии после ингаляции озона, и что в обоих случаях самки более подвержены негативному влиянию озона, чем самцы. Более того, результаты свидетельствуют о важной роли SP-A в ответе лёгких на окислительный стресс.

**Выводы:** данное исследование свидетельствует о том, что снижение функциональной активности или количества SP-A в лёгких может быть одним из факторов, который вносит вклад в повышение риска госпитализации больных пневмонией в случае высокого уровня озона в воздухе. Данное исследование также показало, что половые различия существуют относительно фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов и уровня резистентности к пневмонии в ответ на окислительный стресс, вызванный ингаляцией озона, и представители женского пола находятся в большей зоне риска, чем мужского. Поэтому дальнейшие исследования влияния антропогенного загрязнения воздуха городов на здоровье населения должны учитывать гендерные различия. Полученные данные позволяют предполагать, что подрыв механизмов иммунной защиты в лёгких, связанных с действием сурфактантного белка А, особенно в лёгких представителей женского пола, может обуславливать повышенную чувствительность к пневмонии в условиях окислительного стресса, вызванного антропогенным загрязнением атмосферного воздуха.

Данная работа была сделана Микеровым А.Н. и соавт. в лаборатории проф. Жоанна Флорос в Колледже Медицины Пенсильванского государственного университета США (Hershey, PA, USA) и данные были ранее опубликованы в США на английском языке (Mikero AN, Haque R, Gan X, Guo X, Phelps DS, and Floros J. Ablation of SP-A has a negative impact on the

susceptibility of mice to *Klebsiella pneumoniae* infection after ozone exposure: sex differences. *Respir Res* 2008., Dec 4, 9(1):77).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Bernstein, J.A. Health effects of air pollution / J.A. Bernstein, N. Alexis, C. Barnes et al. // *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004. 114. P. 1116-1123.
2. Hollingsworth, J.W. Ozone and pulmonary innate immunity / J.W. Hollingsworth, S.R. Kleeberger, W.M. Foster // *Proc.Am.Thorac.Soc.* 2007. 4. P. 240-246.
3. Nielsen, HC. Testosterone regulation of sex differences in fetal lung development. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1992. 199. P.446-452.
4. Caracta, CF. Gender differences in pulmonary disease. *Mt.Sinai. J.Med.* 2003. 70. P. 215-224.
5. Gordon, H.S. The relationship of gender and in-hospital death: increased risk of death in men / H.S. Gordon, G.E. Rosenthal // *Med. Care.* 1999. 37. P. 318-324
6. Gannon, C.J. Male gender is associated with increased risk for postinjury pneumonia / C.J. Gannon, M. Pasquale, J.K. Tracy et al. // *Shock.* 2004. 21. P. 410-414.
7. Loeb, M. Risk factors for pneumonia and other lower respiratory tract infections in elderly residents of long-term care facilities / M. Loeb, A. McGeer, M. McArthur et al. // *Arch. Intern. Med.* 1999. 159. P. 2058-2064.
8. Annesi-Maesano, I. Subpopulations at increased risk of adverse health outcomes from air pollution / I. Annesi-Maesano, N. Agabiti, R. Pistelli et al. // *Eur.RespirJ.Suppl.* 2003. 40. P. 57-63.
9. Pastva, A.M. Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease / A.M. Pastva, J.R. Wright, K.L. Williams // *Proceedings of the American Thoracic Society.* 2007. 4. P. 252-257.
10. Mikerov, A.N. Impact of ozone exposure on the phagocytic activity of human surfactant protein A (SP-A) and SP-A variants / A.N. Mikerov, T.M. Umstead, X. Gan et al. // *Am.J.Physiol. Lung Cell Mol.Physiol.* 2008. 294. P.121-130.
11. Mikerov, A.N. Sex differences in the impact of ozone on survival and alveolar macrophage function of mice after *Klebsiella pneumoniae* infection / A.N. Mikerov, X. Gan, T.M. Umstead et al. // *Respir. Res.* 2008. 9. P. 24.

## ROLE OF SURFACTANT PROTEIN A AND ITS OXIDATION IN THE SUSCEPTIBILITY TO EXPERIMENTAL PNEUMONIA

© 2010 A.N. Mikerov<sup>1,2</sup>, N.I. Alekseyeva<sup>1</sup>, S.S. Abramkina<sup>1</sup>, Yu.Yu. Eliseev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Saratov State Medical University

<sup>2</sup> Pennsylvania State University, Hershey, PA, USA

Surfactant protein A (SP-A) plays a host-defense function in the lung, increasing bacterial phagocytosis. Tropospheric ozone is one of the factors of anthropogenic air pollution. SP-A oxidation *in vitro* reduces its phagocytic activity. The purpose of this work was to study the influence of SP-A blocking (by elimination of SP-A gene in SP-A (-/-) mice or by SP-A oxidation) on susceptibility of male and female mice to experimental pneumonia after ozone exposure. Wild type C57BL/6J and SP-A knockout male and female

mice were used. Animals were first exposed to ozone (or air, as a control), and then infected intratracheally with *K. pneumoniae* bacteria (ATCC 43816). Mouse survival after pneumonia was analyzed during 14 days, and *in vivo* phagocytosis was assessed after 1 h followed by infection. Also, using wild type mice, the level of SP-A oxidation was analyzed after 1 h followed by injection of PBS (as a sham control). Results showed that: 1) ozone exposure reduced both survival of SP-A (-/-) mice and *in vivo* phagocytosis level; females were more affected than males, and SP-A (-/-) mice were affected more than wild type mice; 2) ozone exposure increased SP-A oxidation in BAL; SP-A oxidation level was higher in females compared to males. Thus, these results demonstrated that blocking of SP-A function in SP-A (-/-) mice or reducing of functional activity of SP-A due to its oxidation by ozone increases susceptibility of mice to pneumonia, and in both cases females are more affected than males.

Key words: *SP-A, ozone, oxidation, mouse survival, phagocytosis, pneumonia*

---

Anatoliy Mikerov, Candidate of Biology, Associate Professor.

E-mail: am.07@inbox.ru

Nataliya Alekseeva, Candidate of Medicine, Senior Lecturer

Svetlana Abramkina, Post-graduate Student. E-mail:

abramkina-svetla@list.ru

Yuriy Eliseev, Doctor of Medicine, Professor, Head of the

Department. E-mail: yeliseev55@mail.ru