

УДК [616.24-002:616.153.96:612.014.464:612.112.3]-092.6

## ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ПНЕВМОНИИ У МЫШЕЙ ДИКОГО ТИПА И МЫШЕЙ, ЛИШЁННЫХ ГЕНА СУРФАКТАНТНОГО БЕЛКА А (SP-A), ПОСЛЕ ИНГАЛЯЦИИ ОЗОНА

© 2011 А.Н. Микеров, Н.И. Алексеева, М.Н. Иванченко, Ю.Ю. Елисеев

Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского

Поступила в редакцию 03.10.2011

Тропосферный озон является одним из факторов антропогенного загрязнения воздуха, оказывающих значительное влияние на здоровье населения. Сурфактантный белок А (SP-A, Surfactant Protein A) выполняет защитную функцию в лёгких. Мы показали ранее, что самки мышей были более устойчивы к пневмонии, чем самцы в отсутствие ингаляции озона, тогда как после ингаляции озона тренд менялся на противоположный – выживание самок было на более низком уровне, чем выживание самцов после пневмонии. Мы также ранее показали, что мыши, лишённые гена белка SP-A, были более чувствительны к пневмонии, чем мыши дикого типа. Цель данной работы: изучение причин различного уровня выживаемости мышей после пневмонии путём анализа динамики развития лёгочной инфекции после ингаляции озона. Полученные результаты свидетельствуют о том, что более высокие уровни размножения бактерий в лёгких и сниженный иммунный ответ селезёнки у инфицированных пневмонией самок после ингаляции озона, и более высокий уровень диссеминации инфекции у самцов в отсутствие обработки озоном, являются факторами, определяющими уровень выживания мышей от пневмонии в присутствии или отсутствии окислительного стресса, вызванного ингаляцией озона.

Ключевые слова: озон, пневмония, половые различия, селезёнка, лёгкие

Благоприятный исход лёгочной инфекции зависит от уровня иммунной защиты, в т.ч. эффективного элиминирования патогенных микроорганизмов из лёгких и ограничения диссеминации инфекции. Кроме защитных механизмов другие факторы, такие как загрязнение воздушной среды и пол, могут оказывать значительное влияние на течение и исход лёгочного заболевания. Загрязнение атмосферного воздуха является общемировой проблемой. Озон в тропосфере является вторичным фотохимическим загрязнителем воздуха и активным окислителем. В последние годы озону во всём мире уделяется много внимания в связи с его значительным воздействием на здоровье населения. Установлено, что ингаляция озона приводит к гипофункции лёгких, вызывает кашель, провоцирует приступы астмы, и снижает иммунный статус лёгких [1, 2]. Более того, как

негативный эффект озона, так и иммунный статус лёгких, в свою очередь, подвержены влиянию половой принадлежности. Известно, что представители мужского пола более чувствительны к заболеваниям лёгких, чем представители женского пола [3-5]. Более того, недавно мы показали на экспериментальных моделях, что, несмотря на то, что самки мышей были изначально более устойчивы к пневмонии, чем самцы, после ингаляции озона тренд менялся на противоположный и самки становились более чувствительными к пневмонии, чем самцы [6]. Таким образом, изначально преимущество самок перед самцами в отношении смертности от лёгочной инфекции элиминировалось и оказывалось фактором риска в случае ингаляции озона перед заражением пневмонией.

Сурфактантный белок А (SP-A, Surfactant Protein A) выполняет защитную функцию в лёгких, в частности, повышая фагоцитоз бактерий. Ранее мы показали, что окисление SP-A озоном *in vitro* приводит к снижению его профагоцитарной активности [7, 8]. Кроме того, блокирование функции SP-A путём элиминации гена SP-A в генетически модифицированных SP-A (-/-) мышцах или путём снижения функциональной активности белка SP-A вследствие его окисления озоном повышает чувствительность мышей к экспериментальной

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

Алексеева Наталья Ивановна, кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры общей гигиены и экологии

Иванченко Маргарита Николаевна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры общей гигиены и экологии

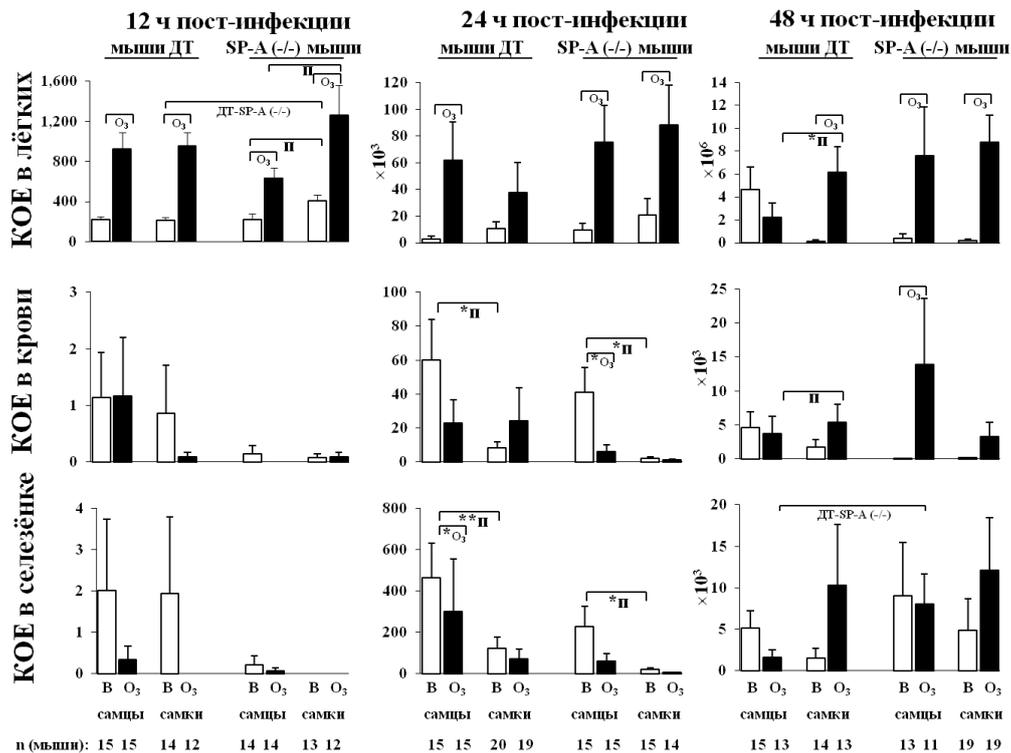
Елисеев Юрий Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей гигиены и экологии. E-mail: yeliseev55@mail.ru

пневмонии после ингаляции озона, и в обоих случаях самки более подвержены негативному влиянию озона, чем самцы [6, 9].

Поскольку исход лёгочного заболевания критически зависит от событий, происходящих в организме на начальных стадиях инфекции, в данной работе мы изучили развитие пневмонии в течение первых двух дней пост-инфекции у самок и самцов мышей дикого типа и SP-A (-/-) мышей, чтобы определить различия в динамике заболевания у мышей обоих типов и полов в присутствии и отсутствии окислительного стресса, вызванного ингаляцией озона.

**Методы исследования.** Самцы и самки мышей дикого типа линии C57BL/6 и изогенных SP-A (-/-) мышей (в возрасте 8-12 недель), лишённые гена SP-A, были разделены на 2 группы по 5 мышей: одна группа была подвергнута ингаляции озона (в дозе 2 ppm в течение 3 часов), а другая – ингаляции фильтрованного воздуха (контроль). Затем все мыши были инфицированы пневмонией, как описано ранее [6]. Всего было проведено 3 или 4 независимых эксперимента для каждого пола (5

животных после ингаляции воздуха и 5 – после ингаляции озона 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 озона или воздуха, мыши были внутритрахеально инфицированы полученной бактериальной суспензией в дозе 450 КОЕ/мышь. Количество бактерий в лёгких, крови и селезёнке после 12, 24 и 48 часов пост-инфекции было установлено путём подсчёта КОЕ. Для этого лёгкие или селезёнка от каждого животного были гомогенизированы в PBS. Затем гомогенат лёгких или селезёнки, а также образцы цельной крови были серийно разведены 1:10 в PBS и аликвоты из приготовленных разведений были нанесены на плотную питательную среду TSA для подсчёта выросших колоний. Кроме того, вес лёгких и селезёнки были также анализированы. Статистическую обработку данных проводили с помощью t-теста. Результаты были признаны статистически достоверными в случае, если  $p < 0,05$ .

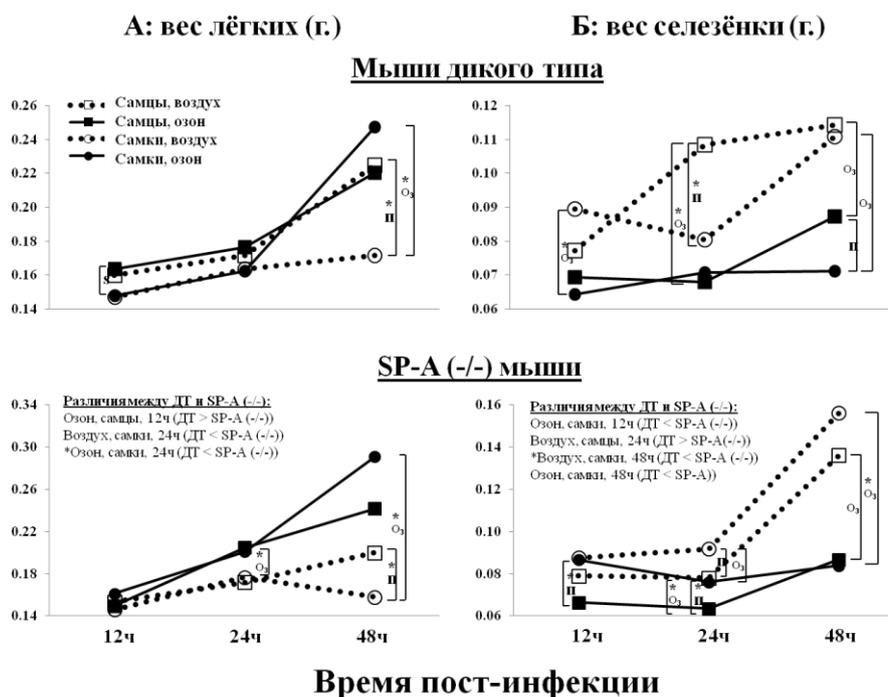


**Рис. 1.** Колониеобразующие единицы, подсчитанные в гомогенатах лёгких, селезёнки и в крови у мышей после ингаляции воздуха или озона и последующей пневмонии.

Мыши дикого типа (ДТ) и SP-A (-/-) мыши обоих полов были обработаны озоном (чёрные столбики) или воздухом (белые столбики, контроль) перед инфицированием. КОЕ рассчитывали на 20 мкл цельного гомогената лёгких или селезёнки, или цельной крови (т.е., до серийного разведения). “O<sub>3</sub>”, “П”, и «ДТ-SP-A (-/-)»: эффект озона, пола, и SP-A, соответственно. Для статистических целей, сравнивались данные, трансформированные в log<sub>10</sub>, используя t-тест (или Mann-Whitney Rank Sum тест, \*). Различия были признаны достоверными, в случае  $p < 0.05$  (показаны скобами).

**Результаты и обсуждение.** В ходе исследования схожая закономерность была обнаружена для мышей дикого типа и для SP-A (-/-) мышей. У обоих типов мышей было выявлено: 1) ингаляция озона приводила к снижению способности животных уничтожить патогенные бактерии в лёгких, при этом лёгкие самок были подвержены колонизации бактериями *K. pneumoniae* в большей степени, чем лёгкие самцов (рис. 1); 2) в отсутствие обработки озоном, самцы были подвержены более высокому уровню диссеминации инфекции в кровь и селезёнку, чем самки (рис. 1); 3) после ингаляции озона и последующей пневмонии наблюдался противоположный тренд относительно веса лёгких и селезёнки у обоих полов: вес лёгких повышался, а вес селезёнки понижался, и в обоих случаях изменения были более выраженными у самок по сравнению с самцами (рис. 2).

Таким образом, данные показали, что сниженная способность мышей уничтожить бактерии в лёгких (количество КОЕ значительно возрастало в ходе инфекции) и неэффективный иммунный ответ в селезёнке (отсутствие способности селезёнки повышать вес в ответ на прогрессирование и генерализацию инфекции) могут быть среди факторов, вносящих значительный вклад в более низкую выживаемость самок по сравнению с самцами после пневмонии в условиях ингаляции озона. Однако повышенная диссеминация бактерий из лёгких в кровь и селезёнку может являться одним из значимых факторов, обуславливающих более низкий уровень выживанию самцов по сравнению с самками после пневмонии в отсутствие ингаляции озона. Данное исследование свидетельствует о том, что существуют половые различия в динамике пневмонии после ингаляции воздуха или озона в течение первых двух дней пост-инфекции.



**Рис. 2.** Вес лёгких и селезёнки у мышей после ингаляции воздухом или озоном и последующей пневмонии.

Дизайн эксперимента описан в подписи к рис. 1. Пунктирными линиями обозначены данные, полученные от мышей после ингаляции воздуха, а сплошными линиями – после ингаляции озона. Самцы и самки обозначены квадратами и кружками на линиях, соответственно. “O<sub>3</sub>”, “П”: эффект озона или пола, соответственно. Достоверные различия между мышами дикого типа и SP-A (-/-) мышами показаны в панелях для SP-A (-/-) мышей. Данные сравнивались с помощью t-тест (или Mann-Whitney Rank Sum тест, \*). Различия были признаны достоверными, в случае  $p < 0.05$  (показаны скобами).

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:**

1. Yang, W. Air pollutants, oxidative stress and human health / W. Yang, S.T. Omaye // *Mutat. Res.* 2009. 674. P.45-54.
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. Caracta, C.F. Gender differences in pulmonary disease // *Mt. Sinai J.Med.* 2003. 70. P. 215-224.

4. *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.
5. *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.
6. *Mikero, A.N.* Ablation of SP-A has a negative impact on the susceptibility of mice to *Klebsiella pneumoniae* infection after ozone exposure: sex differences / *A.N. Mikero, R. Haque, X. Gan* // *Respir. Res.* 2008. 9 P. 77.
7. *Mikero, A.N.* Impact of ozone exposure on the phagocytic activity of human surfactant protein A (SP-A) and SP-A variants / *A.N. Mikero, T.M. Umstead, X. Gan* // *Am. J. Physiol/ Lung Cell Mol. Physiol.* 2008. 294 L121-L130.
8. *Микеров, А.Н.* Влияние озона на профагоцитарную активность сурфактантного белка А и его вариантов / *А.Н. Микеров, Ю.Ю. Елисеев* // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* 2009. 11. С. 994-996.
9. *Микеров, А.Н.* Роль сурфактантного белка А и его окисления в чувствительности к экспериментальной пневмонии / *А.Н. Микеров, Н.И. Алексеева, С.С. Абрамкина, Ю.Ю. Елисеев* // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* 2010. 12. С. 1769-1773.

## **DYNAMICS OF PNEUMONIA DEVELOPMENT AT WILD TYPE MICE AND MICE, DEPRIVED OF SURFACTANT PROTEIN A (SP-A) GENE, AFTER OZONE INHALATION**

© 2011 A.N. Mikero, N.I. Alekseeva, M.N. Ivanchenko, Yu.Yu. Yeliseyev

Saratov State Medical University named after V.I. Razumovskiy

Tropospheric ozone is one of factors of the anthropogenous air pollution, making considerable impact on population health. The surfactant protein And (SP-A, Surfactant Protein A) carries out protective function in lungs. We have shown earlier that females of mice were steadier against pneumonia, than males for lack of ozone inhalation whereas after inhalation of ozone the trend changed on opposite – the survival of females was at lower level, than survival of males after pneumonia. We also have shown earlier that the mice, deprived of SP-A gene, were more sensitive to pneumonia, than the mouse of wild type. The purpose of the given work: studying the reasons of various level of survival rate of mice after pneumonia by the analysis of dynamics of pulmonary infection development after ozone inhalation. The received results testify that higher levels of bacteria reproduction in lungs and lowered immune answer of spleen at females infected with pneumonia after ozone inhalation, and higher level of infections dissemination at males in absence of ozone treatment, are the factors defining level of mice survival from pneumonia at presence or absence of oxidizing stress, caused by ozone inhalation.

Key words: *ozone, pneumonia, sexual distinctions, spleen, lungs*

---

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

*Nataliya Alekseeva, Candidate of Medicine, Senior Lecturer at the Common Hygiene and Ecology Department*

*Margarita Ivanchenko, Candidate of Medicine, Assistant at the Common Hygiene and Ecology Department*

*Yuriy Yeliseev, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Common Hygiene and Ecology Department Елисеев. E-mail: yeliseev55@mail.ru*