

СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД К АНАЛИЗУ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ: СУРФАКТАНТНЫЙ БЕЛОК D И ЕГО РОЛЬ

Лямина С.В., Веденикин Т.Ю., Малышев И.Ю.

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Москва, Россия, e-mail: svlvs@mail.ru

Исключительно важную роль в реализации иммунного ответа при заболеваниях легких с воспалительным компонентом играют альвеолярные макрофаги, а одним из ключевых регуляторов функций альвеолярных макрофагов является сурфактантный белок D (SP-D). Мультифункциональная структура белка позволяет SP-D выступать в качестве бивалентного фактора контроля фенотипа макрофагов и определять двойственность иммунного ответа, обеспечивая возможность активации иммунного ответа провоспалительной или противовоспалительной направленности. Уровень SP-D изменяется при различных заболеваниях легких, в связи с чем белок может быть использован не только как маркер повреждения легких, но и как агент воздействия на патогенетические звенья воспалительной реакции.

Ключевые слова: сурфактантный белок D, иммунный ответ, макрофаги, заболевания легких.

A MODERN APPROACH TO IMMUNE RESPONSE ANALYSIS IN PULMONARY DISEASES: SURFACTANT PROTEIN D AND ITS ROLE

Lyamina S.V., Vedenikin T.Yu., Malyshev I.Yu.

State educational institution of higher education «Moscow State Medical and Dental University», Department of Health and Social Development of Russian Federation, Moscow, Russia, e-mail: svlvs@mail.ru

The role of alveolar macrophages in immune response in inflammatory pulmonary diseases is of the utmost importance and one of the key regulators of alveolar macrophages function is pulmonary surfactant protein D (SP-D). Multifunctional structure of SP-D offers the possibility to act as bivalent factor controlling macrophages phenotype and to determine the duality of the immune response encuring the possibility of proinflammatory or anti-inflammatory reactions. SP-D level is changes in different pulmonary diseases, therefore the protein can be used not only as a marker of pulmonary injury but as agent influencing on pathogenetic branches of inflammatory reactions.

Key words: surfactant protein D, immune response, macrophages, pulmonary diseases.

Изучение молекулярных механизмов воспаления в легких и возможности его коррекции в настоящее время приобрели особую значимость в связи с ростом

заболеваемости хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), бронхиальной астмой (БА), саркоидозом, инфекционными заболеваниями органов дыхательных путей.

1. SP-D – маркер поражения легких.

1.1. SP-D и контроль воспаления в легких.

Известно, что сурфактантный белок D (SP-D) является одним из ключевых регуляторов функций альвеолярных макрофагов – основных клеток системы иммунитета в легких. SP-D вырабатывается нецилиарными клетками бронхиол – клетками Клара и альвеолоцитами II типа [1]. Понимание важности SP-D для адекватного функционирования альвеолярных макрофагов и иммунной защиты легких возникло после экспериментов на мышах, геном которых не имел гена SP-D (SP-D (-/-) мышей).

Отсутствие гена SP-D у мышей приводит к значительному воспалению в легких и увеличению восприимчивости к инфекциям [15]. У SP-D (-/-) мышей отмечено увеличение продукции провоспалительных цитокинов [10], развитие фиброза и, в конечном итоге, развитие эмфиземы легких [7]. В легких у мышей, лишенных гена SP-D, наблюдалась выраженная инфильтрация макрофагов, нейтрофилов и лимфоцитов в перибронхиальных и периваскулярных областях [10]. При этом отмечалось увеличение размеров макрофагов. Эти изменения в определенной мере связаны с усилением оксидантного стресса в легких SP-D (-/-) мышей. Так, например, оказалось, что альвеолярные макрофаги, выделенные из SP-D (-/-) мышей, продуцировали оксидативных молекул, таких как H_2O_2 , в 10 раз больше по сравнению с нормальными макрофагами. Показано, что антиоксидантные свойства SP-D обусловлены подавлением образования липидных радикалов [23].

В легких SP-D (-/-) мышей также увеличивалось содержание макрофагов, находящихся на разных стадиях некроза и апоптоза [10]. Добавление экзогенного SP-D ограничивало гибель макрофагов [10]. При этом SP-D за счет связывания с углеводными и липидными частями на поверхностях апоптотических клеток облегчал процесс фагоцитоза уже погибших клеток [11] и тем самым способствовал нормальному разрешению воспаления.

При развитии воспаления в легких мышей, лишенных гена SP-D, особо следует отметить увеличение экспрессии индуцибельной NO-синтазы (*i*NOS) и продукции NO. Было показано, что ингибирование *i*NOS у SP-D (-/-) мышей приводило к уменьшению признаков воспаления и увеличению количества клеток в бронхо-альвеолярном лаваже (БАЛ) [4]. Следовательно, NO у SP-D (-/-) мышей можно рассматривать как запускающий фактор воспаления в легких, а SP-D – как фактор, контролирующий в легких продукцию NO [5].

Кроме того, установлено, что NO, в свою очередь, может контролировать эффекты SP-D [12]. Понять, как это происходит, помогло изучение структуры SP-D и механизмов взаимодействия белка с альвеолярными макрофагами.

1.2. Особенности структуры SP-D, влияющие на иммунорегуляторные свойства белка.

По результатам проведенных исследований установлено, что мономер белка SP-D имеет молекулярную массу 43 кДа, состоит из 375 аминокислот и включает четыре домена: NH₂-хвостовой домен, коллагеноподобный домен, домен «шейки» и С-концевой лектиновый домен «головка», распознающий COOH-группы углеводов и лектин С-типа [1].

SP-D может существовать в различных олигомерных состояниях – в форме мономера, тримера, додекамера или мультимера. Процесс олигомеризации мономеров SP-D в тример вовлекает «шейный» и «головной» домены. Четыре тримера, соединяясь, формируют додекамер, участвующий, в свою очередь, в процессе мультимеризации. Установлено, что мономеры SP-D с делециями цистеинов в позициях 15 и 20 в NH₂-хвостовом домене не способны к формированию додекамеров [12]. Эти данные свидетельствуют о существенном значении цистеинов хвостового домена в процессе олигомеризации и переходе от тримера к додекамеру.

Наличие двух цистеинов в NH₂-хвостовом домене позволяет понять механизмы регуляторных эффектов сурфактантного белка D. В физиологических условиях в здоровом легком SP-D преимущественно находится в форме мультимеров и додекамеров со скрытыми хвостовыми доменами. При развитии воспаления, сопровождающегося усилением продукции NO, происходит нитрозилирование цистеинов хвостового домена, сопровождающееся распадом мультимеров до тримеров и мономеров [12].

Такая мультифункциональная структура белка позволяет SP-D выступать в качестве бивалентного фактора и определять двойственность иммунного ответа, обеспечивая возможность активации иммунного ответа провоспалительной или противовоспалительной направленности [11]. Разные олигомерные формы SP-D альтернативно влияют на активность и функции альвеолярных макрофагов [11]. Это связано с тем, что мультимеры и додекамеры SP-D взаимодействуют с одним типом рецепторов на поверхности альвеолярных макрофагов, обеспечивая противовоспалительную направленность иммунного ответа, тогда как S-нитрозилированные тримеры и мономеры – с другим типом рецепторов, активируя провоспалительное звено [11].

1.3. SP-D – фактор программирования фенотипа макрофагов.

Оказалось, что разные олигомерные формы SP-D альтернативно влияют на активность и функции альвеолярных макрофагов [11]. Это связано с вышеописанной способностью различных олигомерных форм взаимодействовать с мультимеров и додекамеров SP-D с разными типами рецепторов на поверхности альвеолярных макрофагов [11].

Открытые S-нитрозилированные хвостовые домены моно- и тримеров SP-D связываются с кальретикулином и CD-91 комплексом [11], что, в свою очередь, приводит к фосфорилированию внутриклеточного p38, активации ядерного фактора NF- κ B и, соответственно, увеличению продукции провоспалительных медиаторов и NO. NO еще больше разрушает мультимеры SP-D, а образующиеся моно- и тримеры, в свою очередь, еще больше усиливают воспалительный ответ и бактерицидную активность макрофагов. Таким образом, на уровне макрофага формируется механизм положительной обратной связи, который, при необходимости, обеспечивает быстрый надлежащий ответ со стороны макрофагов, запуск системы врожденного иммунитета и уничтожение патогена, но, с другой стороны, может провоцировать чрезмерное развитие воспаления и обострение заболевания.

В физиологических условиях здорового легкого «хвостовые» домены SP-D спрятаны внутри мультимерной структуры, а «головные» домены взаимодействуют с рецепторами сигнального ингибирующего регуляторного белка- α (SIRP- α) [11] и активируют киназу SHP-1. Это приводит к подавлению активации p38, блокированию NF- κ B, и, соответственно, угнетению воспалительных реакций макрофагов.

На основании этих данных процессы нитрозилирования и денитрозилирования SP-D и, соответственно, существование SP-D в различных олигомерных формах обеспечивает возможность переключения функции SP-D с активатора на ингибитор воспалительной активности макрофагов. Следовательно, SP-D можно рассматривать как фактор программирования макрофагов. Действительно, при действии тримеров или мономеров SP-D макрофаги преимущественно приобретают провоспалительный M1 фенотип и характеризуются усилением продукции NO и провоспалительных цитокинов, а при действии мультимеров – противовоспалительный M2 фенотип, для которого характерно подавление продукции NO и провоспалительных цитокинов [11].

Обнаружен ряд факторов, программирующих макрофаги на M1 фенотип. К ним относятся Th1 цитокины (IFN- γ , TNF- α), патоген-ассоциированные молекулярные комплексы – ЛПС, липопотеины, dsPHK, различные грамположительные и грамотрицательные бактерии, цитомегаловирус, белки теплового шока, бокс 1 высокомолекулярной группы (HMGB1) [1]. Целый ряд факторов может программировать макрофаги на M2 фенотип: Th2 цитокины (IL-4, IL-13), иммунокомплексы в сочетании с IL-1 β , IL-10, TGF- β , агонисты ядерного рецептора

PPAR- γ , контролирующего макрофагальное воспаление, *Coxiella burnetii* и *Leishmania*, витамин D3, глюкокортикоиды и апоптотические клетки [1].

Таким образом, при кратком анализе роли SP-D в регуляции функций макрофагов бросается в глаза одно важное обстоятельство: SP-D – это единственный фактор репрограммирования, который действует по принципу «два в одном», то есть может программировать макрофаги и на M1, и на M2 фенотип. Благодаря этому SP-D можно рассматривать как бивалентный регулятор процесса воспаления в легких [1].

2. SP-D, иммунный ответ и клинические проявления при заболеваниях легких.

В клинических работах ранее не анализировалось соотношение разных олигомерных форм SP-D при заболеваниях легких, несмотря на их важную роль. Поэтому в полной мере понять и оценить роль SP-D при заболеваниях легких у человека станет возможным только в будущем, после проведения такого анализа.

2.1. Хроническая обструктивная болезнь легких.

Особенностью клинической картины ХОБЛ является прогрессирующая необратимая обструкция дыхательных путей, связанная с патологическим воспалением дыхательных путей. Во многих случаях развитие ХОБЛ связано с длительным курением.

У пациентов с ХОБЛ, по сравнению со здоровыми людьми, альвеолярные макрофаги имеют выраженный M1 фенотип, что обуславливает направленность иммунного ответа по клеточному Th1 пути. У курящих лиц без ХОБЛ при действии основного фактора риска развития болезни – сигаретного дыма отмечено программирование макрофагов на M2 фенотип [19]. Значение такой трансформации фенотипа макрофагов до болезни в ответ на действие этиологического фактора и во время самой болезни еще предстоит оценить.

В ряде работ было показано, что у курящих пациентов без ХОБЛ, а также у курящих и некурящих пациентов с ХОБЛ уровень SP-D в БАЛ снижен по сравнению со здоровыми лицами [20]. Экспериментальные данные, полученные на SP-D (-/-) мышях, показывают, что снижение содержания SP-D может играть роль в патогенезе ХОБЛ из-за усиления оксидативного стресса, апоптоза и некроза в легких [15].

Снижение содержания SP-D может быть связано с тем, что альвеолярные макрофаги могут поглощать и разрушать SP-D [22] и/или с тем, что из-за повреждения легочного эпителия и нарушения проницаемости капилляров, характерного для процесса воспаления, происходит попадание SP-D в системный кровоток, вызывая увеличение уровня SP-D в сыворотке.

Снижение содержания SP-D в легких при ХОБЛ приводит к повышенной восприимчивости органа к инфекциям, а последующая колонизация микроорганизмами увеличивает риск обострений ХОБЛ и прогрессирование заболевания [18].

В настоящее время определение маркеров воспаления и повреждения легких остается значимой задачей, учитывая актуальность проблемы воспаления в развитии ХОБЛ. У пациентов с ХОБЛ была установлена четкая обратная зависимость между тяжестью заболевания и уровнем SP-D в сыворотке, тогда как для белка-16 клеток Клара (CC16) или СРБ (С-реактивного белка) такой взаимосвязи не наблюдалось [20].

Таким образом, у пациентов с ХОБЛ снижение содержания SP-D в легких может рассматриваться как один из факторов усиления воспаления в легких и повышения восприимчивости к респираторным инфекциям и хроническим колонизациям, а также выступать в качестве диагностического маркера поражения легких и использоваться для прогнозирования исходов состояния пациентов с ХОБЛ.

2.2. Бронхиальная астма.

Показано, что при БА уровень SP-D в БАЛ пациентов в несколько раз превышает значения, полученные у пациентов без БА [14]. В экспериментах *in vitro* было установлено, что повышение уровня SP-D при БА направлено на ограничение легочного воспаления. Компенсаторный характер повышения SP-D при воспалении, вероятнее всего, обусловлен способностью SP-D усиливать цитотоксические и фагоцитирующие свойства макрофагов.

По результатам проведенных исследований установлено, что в отличие от ХОБЛ на фоне высокого содержания SP-D при БА альвеолярные макрофаги преимущественно имели M2 фенотип, и, соответственно, иммунный ответ развивался по Th2 типу [21]. В настоящее время повышение концентрации SP-D в легких больных БА и соответственно этому программирование M2 фенотипа альвеолярных макрофагов и развитие Th2 иммунного ответа рассматриваются как основной молекулярный механизм развития этого заболевания.

Однако при развитии обострений БА уровень SP-D резко снижается [8]. Имеющиеся данные позволяют по-новому взглянуть на патогенез и способы купирования обострений. Возможно, факторы, провоцирующие развитие БА, нарушают синтез SP-D или увеличивают поступление SP-D в системный кровоток, как это, например, происходит при респираторном дистресс-синдроме. Если вспомнить, что SP-D является «секреторным патоген-распознающим рецептором» [6], можно также предположить, что снижение уровня SP-D при обострении БА обусловлено абсорбцией молекул SP-D на поверхности аллергенов. Далее, вне зависимости от механизма, снижение SP-D приводит к тому, что воспаление «выходит» из-под SP-D-зависимого контроля и провоцирует приступ БА. В случае подтверждения этой гипотезы профилактика и купирование приступов БА должны быть направлены на

предотвращение падения или быстрое восстановление уровня SP-D при действии провоцирующих факторов.

2.3. Саркоидоз.

Саркоидоз относится к группе наиболее распространенных интерстициальных болезней легких неустановленной природы. В настоящее время распространенность заболевания как в России, так и в мире неуклонно растет [2]. Уровень SP-D в бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) и сыворотке пациентов с саркоидозом повышен по сравнению со здоровыми людьми и прогрессивно увеличивается при возрастании тяжести заболевания [14].

Установлено, что при саркоидозе альвеолярные макрофаги преимущественно приобретают M1 фенотип, и иммунный ответ, соответственно, развивается по Th1 пути вне зависимости от стадии патологического процесса [17].

В настоящее время невыясненным остается вопрос отличий в формировании преобладающего фенотипа альвеолярных макрофагов на фоне повышенного содержания SP-D при саркоидозе и бронхиальной астме: почему при БА на фоне повышенного содержания SP-D формируется M2 фенотип макрофагов, а при саркоидозе – M1? Не исключено, что это связано с разным соотношением олигомерных форм SP-D при БА и саркоидозе.

2.4. Инфекции дыхательных путей.

SP-D не только способен непосредственно взаимодействовать с основными клетками системы врожденного иммунитета – альвеолярными макрофагами, но и выполняет важную роль в механизмах взаимодействия макрофагов с патогенами. Благодаря способности связываться с липополисахаридом (ЛПС), основным компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий и основной причиной развития эндотоксического шока при развитии инфекционных процессов, SP-D связывается с грамотрицательными бактериями, такими как *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli* и *Haemophilus influenza*. Связывание SP-D с этими бактериями способствует их агглютинации и стимулирует хемотаксис нейтрофилов, макрофагов и эозинофилов к месту инвазии патогена, что существенно увеличивает эффективность фагоцитоза микробов макрофагами и нейтрофилами [10]. Также SP-D связывается с грамположительными бактериями, такими как *Streptococcus pneumoniae* и *S. aureus*, а также с микобактериями [13], вирусами, такими как РСВ и вирус гриппа [16], и грибами, такими как *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* и *Candida albicans* [20].

Таким образом, обеспечивая взаимодействие с патогенными микроорганизмами, предназначенными для уничтожения иммунной системой, и выступая в качестве аттрактанта

для иммунных клеток, SP-D выполняет классические опсонизирующие функции и способствует повышению эффективности фагоцитоза.

Оказалось, что SP-D может связываться с рецепторами CD14, входящими в состав рецепторного комплекса ЛПС [13]. Взаимодействия SP-D с данными рецепторами способствуют подавлению провоспалительного ответа, тем самым обеспечивая механизм протективного действия белка против эндотоксического шока [18].

Все эти данные позволяют предположить, что снижение содержания SP-D в легких будет приводить к увеличению восприимчивости организма к инфекциям. Эта гипотеза нашла подтверждение в экспериментальных работах на мышах, лишенных гена SP-D: SP-D (-/-) мыши оказались более восприимчивы к инфекциям дыхательных путей, вызываемых *Pneumocystis carinii* [9], вирусом гриппа, РСВ и бактериями [3].

Таким образом, отсутствие SP-D повышает чувствительность организма к инфекциям, а его присутствие способствует клиренсу патогенных микробных из дыхательных путей.

Заключение

Таким образом, как показывают современные данные о структуре сурфактантного белка D, особенностях взаимодействия белка с альвеолярными макрофагами и, соответственно, альтернативном изменении функций белка и, кроме того, изменении уровня SP-D при различных заболеваниях легких, белок может быть использован не только как маркер повреждения легких, но и как агент воздействия на патогенетические звенья воспалительной реакции, что раскрывает новые возможности для решения фундаментальных проблем клинической медицины.

Список литературы

1. Лямина С.В., Круглов С.В., Веденикин Т.Ю., Малышев И.Ю. Новая стратегия управления иммунным ответом при заболеваниях легких – роль сурфактантного белка D как бивалентного фактора репрограммирования макрофагов // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 1. – С. 90–98.
2. Шмелев Е.И. Дифференциальная диагностика интерстициальных заболеваний легких // *Consilium medicum*. – 2003. – № 5(4). – С. 176–181.
3. Atochina E.N., Beers M.F., Hawgood S. et al. Surfactant protein-D, a mediator of innate lung immunity, alters the products of nitric oxide metabolism // *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004. – 30: 271–279.

4. Atochina-Vasserman E.N., Kadire H., Tomer Y. et al. Selective inhibition of iNOS activity *in vivo* reverses inflammatory abnormalities in SP-D deficient mice // *Journal of Immunology*, 2007. – 179 (12): 8090–7.
5. Atochina-Vasserman E.N., Abramova E.V., Tomer Y. et al. SP-D-Dependent Regulation of NO Metabolism in Lipopolysaccharide-Stimulated Peritoneal Macrophages // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2009. – 147(4): 415–420.
6. Bartlett J.G., Breiman R.F., Mandell L.A. et al. Community-acquired pneumonia in adults-guidelines for management // *Clin Infect Dis*, 1998. – 26: 811–38.
7. Botas C.F., Poulain J., Akiyama J. et al. Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D // *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1998. – 11869–11874.
8. Cheng G., Ueda T., Numao T. et al. Increased levels of surfactant protein A and D in bronchoalveolar lavage fluids in patients with bronchial asthma // *Eur Respir J*, 2000. – 16: 831–835.
9. Crouch E.C. Structure, biologic properties and expression of surfactant protein D // *Biochim. Biophys. Acta*, 1998. 1408: 278–289.
10. Fisher J.H., Larson J., Cool C., Dow S.W. Lymphocyte activation in the lungs of SP-D null mice // *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002. – 27: 24–33.
11. Gardai S.J., Xiao Y.Q., Dickinson M. et al. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation // *Cell*, 2003. – 115: 13 – 23.
12. Guo C.J., Atochina-Vasserman E.N., Abramova H. et al. S-Nitrosylation of surfactant protein-D controls inflammatory function // *PLoS Biology*, 2008. – 6 (11).
13. Kuan S., Rust K., Crouch E. Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides // *J Clin Invest*, 1992. – 90: 97 – 106.
14. Kunitake R., Kuwano K., Yoshida K. et al. KL-6, Surfactant Protein A and D in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Patients with Pulmonary Sarcoidosis // *Respiration*, 2001. – 68: 488–495.
15. LeVine A.M., Whitsett J.A., Gwozdz J.A. et al. Distinct effects of surfactant protein A or D deficiency during bacterial infection on the lung // *J Immunol*, 2000. – 165: 3934–3940.
16. McCormack F.X., Whitsett J.A. The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung // *J. Clin. Invest*, 2002. – 109 (6): 707–712.
17. Prasse A., Georges C.G., Biller H. et al. Th1 cytokine pattern in sarcoidosis is expressed by bronchoalveolar CD4⁺ and CD8⁺ T cells // *Clinical & Experimental Immunology*, 2000. – 122 (2): 241–248.

18. Sethi S., Maloney J., Grove L. et al. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease // *Respiratory Medicine COPD Update*, 2006. – 1 (4): 144–145.
19. Shaykhiev R., Krause A., Salit J. et al. Smoking-Dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *The Journal of Immunology*, 2009. – 183: 2867–2883.
20. Sin D.D., Pahlavan P.S., Man. P.S. Paul. Surfactant Protein D: A Lung Specific Biomarker in COPD?: Potential Biological Roles of SP-D in COPD // *Ther Adv Resp Dis*, 2008. – 2 (2): 65–74.
21. Woodruff P.G., Modrek B., Choy D.F. et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 2009. – 180 (5): 388–95.
22. Wright J.R. Immunomodulatory functions of surfactant // *Physiol Rev*, 1997. – 77: 931–962.
23. Yoshida M., Korfhagen Th.R., Whitsett J.A. Surfactant Protein D Regulates NF- κ B and Matrix Metalloproteinase Production in Alveolar Macrophages via Oxidant-Sensitive Pathways // *The Journal of Immunology*, 2001. – 166: 7514–7519.

Рецензенты:

Стаценко М.Е., д.м.н., профессор, проректор по научной работе ГОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, г. Волгоград

Работа получена 30.08.2011