

УДК 612.017:[616-92.19+612.3+579.222.112]

НЕЙТРАЛИЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА В ОТНОШЕНИИ ПОРООБРАЗУЮЩИХ ЦИТОТОКСИНОВ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© 1995 г. П. Г. Назаров, Л. К. Берестовая

Представлено академиком Р.В. Петровым 16.01.95 г.

Поступило 27.01.95 г.

С-реактивный белок (СРБ) был открыт в 1930 г. как антителоподобное вещество, появившееся в крови больных острой пневмонией и реагировавшее *in vitro* с С-полисахаридом клеточной стенки пневмококков. В настоящее время этот фосфорилхолинсвязывающий белок считают универсальным неспецифическим реактантом острой фазы воспаления, одной из функций которого является удаление поврежденных и некротизированных клеток, нуклеопротеинов и т.п. Существенный вклад в формирование современного представления о СРБ внесли работы отечественных иммунологов: П.М. Пашинина – в области клинической диагностики [1], Р.В. Петрова – в области инфекционной и радиационной иммунологии, установившие основные закономерности продукции СРБ в организме и впервые указавшие на его синтез вне лимфоидной системы [2]; В.И. Иоффе – в области экспериментальной иммунологии, впервые показавшие, что СРБ отличается от антител отсутствием идиотипического разнообразия [3].

У человека и многих животных СРБ – минорный белок плазмы, концентрация которого возрастает в острой фазе воспаления в 1000 раз и более. Экспрессию гена СРБ в гепатоцитах обеспечивают интерлейкины-1 и -6 [4]. СРБ связывается *in vitro* с некоторыми патогенными бактериями, вызывая их гибель [5], защищает мышей от летальной пневмококковой инфекции [6], прерывает развитие экспериментальной малярии на презритроцитарной стадии инфицирования спороzoитами [7], связывает секретируемые продукты лейшманий [8]. Таким образом, многое указывает на участие СРБ в механизмах защиты от инфекций. Вместе с тем, его роль в организме до конца не выяснена, и характеристика СРБ как фактора противoinфекционной резистентности

далека от полной ясности. В тени остаются многие важные аспекты проблемы. В частности, совершенно не изучен вопрос об отношении СРБ к бактериальным токсинам, которым часто принадлежит определяющая роль в патогенезе инфекционных заболеваний и пострадиационных осложнений. Актуальность этого вопроса побудила нас к изучению влияния СРБ на активность бактериальных токсинов, результаты которого и представлены в настоящей работе.

Исследование проведено на примере стрептолизина О (СЛО) и тетанолизина (ТЛ) – белковых экзотоксинов, продуцируемых патогенными стрептококками и клостридиями и относящихся к группе серологически родственных кислородолабильных, тиолактивируемых цитолизиннов, механизм действия которых связан с формированием пор в клеточных мембранах [9].

Использовали препараты СЛО и ТЛ производства НИИ вакцин и сывороток (С.-Пб.) и электрофоретически и иммунохимически чистый СРБ человека, выделенный и охарактеризованный, как описано ранее [10]. Для сравнения с СРБ использовали холестерин (“Serva”), лизоцим (“Reanal”) и препарат донорского человеческого гамма-глобулина (ЧГГ; НИИЭМ им. Пастера, С.-Пб.) – их способность нейтрализовать токсины группы СЛО и ТЛ хорошо известна [11]. Влияние СРБ и контрольных препаратов на активность токсинов (взятых в дозе 10 гемолитических единиц, ГЕ) оценивали после их совместной инкубации (37°C, 30 мин) по изменению степени гемолиза эритроцитов путем регистрации освободившегося гемоглобина при 405 нм. Для выяснения способности СРБ связываться с СЛО разведения СРБ предварительно истощали эритроцитами, обработанными субгемолитической дозой СЛО (0.2 ГЕ, 18 ч при 4°C) и отмывали (в контроле – эритроцитами тех же доноров, обработанными физиологическим раствором NaCl). Истощенный СРБ переносили в чистые лунки планшета, инкубировали с 2 ГЕ СЛО 30 мин при 37°C, после чего добавляли свежие эритроциты и регистрировали их гемолиз.

*Институт экспериментальной медицины
Российской Академии медицинских наук,
Санкт-Петербург*

Институт вакцин и сывороток, Санкт-Петербург

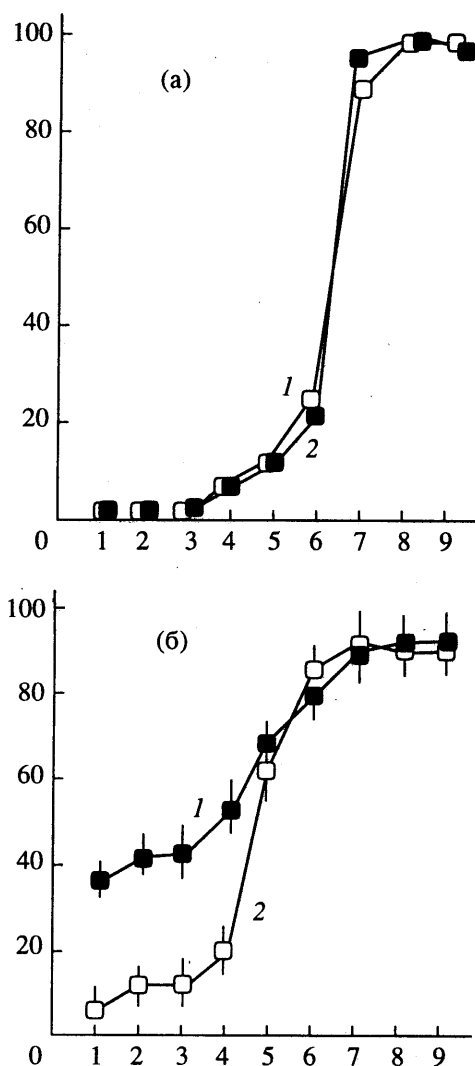


Рис. 1. Способность СРБ нейтрализовать гемолитическое действие стрептолизина О и тетанолизина (а) и связываться с токсином, фиксированным на клеточных мембранах (б). Абсцисса – \log_2^{-1} разведения СРБ, ордината – степень гемолиза эритроцитов, %. На а: 1 – СРБ + СЛО; 2 – СРБ + ТЛ; на б: СРБ + СЛО; разведения СРБ предварительно истощали эритроцитами, обработанными субгемолитической дозой СЛО (1), или контрольными (2). Каждая точка – средняя по результатам истощения эритроцитами 19 доноров.

О механизме взаимодействия СРБ с токсинами судили по степени снижения антитоксического эффекта СРБ в гемолитическом тесте после предварительной инкубации СРБ (10 мкг/мл, или 10^{-7} М; 37°C, 30 мин) с его лигандами: пневмококковым С-полисахаридом (СПС; "Reanal"), фосфорилхолином (ФХ; "Sigma"), L- α -лецитином ("Serva"; в виде липосом, приготовленных спиртовым методом), поли-L-лизином ("Serva"; 50 кДа), гепарином ("LaChemie"), фибронектином (ФН, любезно предоставлен проф. А.Б. Жебруном, НИИЭМ им. Пастера, С.-Пб.), а также с липополисахарида-

ми (ЛПС) из *E. coli* 055 ("Диагностикум") и *S. typhimurium* (НИИВС, С.-Пб.).

Результаты, представленные на рис. 1а, указывают на ранее не описанную способность С-реактивного белка отменять гемолитическое действие СЛО и ТЛ. По нейтрализующей активности СРБ превосходил препарат ЧГГ, уровень антител к СЛО в котором составлял 625 МЕ/мл. Сравнение СРБ с другими ингибиторами этих токсинов на основе молярных концентраций, обеспечивающих снижение гемолитического эффекта токсина на 50%, дало, при использовании СЛО, следующие значения K_i : $8.3 \cdot 10^{-5}$ М для холестерина, $2.9 \cdot 10^{-6}$ М для лизоцима, $1.5 \cdot 10^{-6}$ М для ЧГГ и $1.5 \cdot 10^{-8}$ М (или 2.3 ± 0.2 мкг/мл, при $n = 18$) для СРБ. Таким образом, нейтрализующее действие СРБ проявляется в существенно меньшей концентрации, чем у других ингибиторов токсинов. Эта концентрация соответствует уровню СРБ в крови при воспалении, что указывает на возможность функционирования острофазного реактанта как эффективного антитоксического фактора и в организме.

Эритроциты, связавшие токсин в условиях инкубации с его сублитической дозой, истощали раствор СРБ активнее контрольных (рис. 1б), что говорит о связывании СРБ непосредственно с молекулами токсина на клетках и/или с открывшимися под действием токсина структурами клеточной мембраны.

Для выяснения молекулярной природы токсиннейтрализующего действия СРБ были привлечены лиганды, охватывающие почти весь спектр его известных специфичностей [12]. Определяющим среди них считают ФХ, для которого каждая из пяти субъединиц белка имеет по связывающему центру. Эти центры ответственны также за связывание СПС клеточной стенки пневмококков, лецитина и фибронектина. Полилизин и гепарин представляли поликатионы и полианионы соответственно, с которыми СРБ также связывается. ЛПС грамотрицательных бактерий не значатся в числе лигандов СРБ, однако они тоже были включены в исследование, так как в структуре СРБ более 40% составляют остатки неполярных аминокислот, встречающихся в N-концевой половине молекулы в виде 4-5-членных кластеров (табл. 1), исходя из чего, взаимодействие СРБ с гидрофобным липидом А эндотоксинов представлялось вероятным.

Ни один из лигандов СРБ сам по себе не обладал способностью нейтрализовать гемолитическое действие СЛО и ТЛ. Те из лигандов, эффект которых в гемолитической системе имел место, проявляли его лишь после предварительной инкубации с СРБ. Это означает, что влияние лигандов опосредовалось через взаимодействие с СРБ,

а не являлось результатом прямого действия на токсина.

Блокирование ФХ-специфичных сайтов с помощью различных концентраций ФХ, СПС или ФН не влияло на способность СРБ нейтрализовать СЛО и ТЛ; снижал ее лишь лецитин, да и то в высокой концентрации (табл. 2). Это свидетельствует об имеющем место, но незначительном вкладе ФХ-специфичных сайтов в нейтрализацию токсинов. Влияния на эритроциты ФХ, СПС, ФН и лецитин не оказывали.

Блокирование СРБ гепарином также не влияло на анти-СЛО- и анти-ТЛ-активность СРБ, тогда как инкубация с полилизинном приводила к утрате способности СРБ нейтрализовать гемолитическое действие обоих токсинов (рис. 2, табл. 2). Аминокислота L-лизин (мол. масса 146) и этанол-амин не оказывали такого эффекта. Следовательно, в связывании токсинов принимают участие отрицательно заряженные участки молекулы СРБ, ответственные за взаимодействие с поликатионами. Заметим, что в концентрациях до 250 мкг/мл полилизин сам вызывал лизис эритроцитов, однако в концентрациях на один - два порядка ниже указанной, какие и использовались для блокирования СРБ, гемолитическое действие полилизина отсутствовало. Антитоксическим эффектом полилизин не обладал.

Опыты с эндотоксинами показали, что ЛПС также эффективно отменяет антитоксический эффект СРБ, что свидетельствует о связывании ЛПС с СРБ. При этом два препарата ЛПС из разных источников (из эшерихий и сальмонелл) были эффективны в одинаковой концентрации, поэтому в табл. 2 происхождение ЛПС не оговаривается. В контрольных опытах ЛПС не влияли на гемолитическую активность СЛО и ТЛ и не обладали собственным гемолитическим эффектом.

Полученные данные демонстрируют новые свойства С-реактивного белка, состоящие в нейтрализации цитолитических экзотоксинов грамположительных бактерий порообразующего действия и связывании эндотоксинов грамотрицательных бактерий.

Связывание ЛПС, по-видимому, обеспечивается гидрофобными остатками СРБ и их кластерами (табл. 1), тогда как связывание СЛО и ТЛ – как гидрофобными, так и отрицательно заряженными остатками, которыми также богата молекула СРБ [13]. На это указывает легкость отмены нейтрализующей активности СРБ в отношении СЛО и ТЛ как эндотоксинами, так и поликатионами, а также то обстоятельство, что гепарин, являющийся, как и СРБ, полианионом, но не обладающий гидрофобностью, не способен нейтрализовать СЛО и ТЛ (табл. 2).

Таблица 1. Распределение гидрофобных остатков в молекуле СРБ (рассчитано по опубликованной [13] первичной структуре)

Позиция в последовательности СРБ	Число неполярных остатков	В том числе		P
		в кластерах по 4 и больше	прочих	
1 - 103	43	14	29	<0.01
104 - 206	44	0	44	

СЛО – один из наиболее полно изученных экзотоксинов цитолитического действия, и все же механизм вызываемого им повреждения мембран до конца не известен. Согласно распространенной гипотезе, прочное связывание олигомеров СЛО с холестерином мембраны дезорганизует липидный бислой и инициирует полимеризацию токсина на поверхности клетки с образованием доступных электронной микроскопии кольцевых структур, определяющих форму и диаметр мембранных пор [9]. Эта модель опирается на аналогию с полиеновыми антибиотиками. Наши данные показывают, что в механизме действия токсинов группы СЛО и ТЛ гидрофобные эффекты сочетаются с поликатионными. При этом гидрофобные взаимодействия действительно могут обеспечивать фиксацию токсина на мембране, тогда как поликатионные, по-видимому, ответственны за литический эффект. Повреждающее

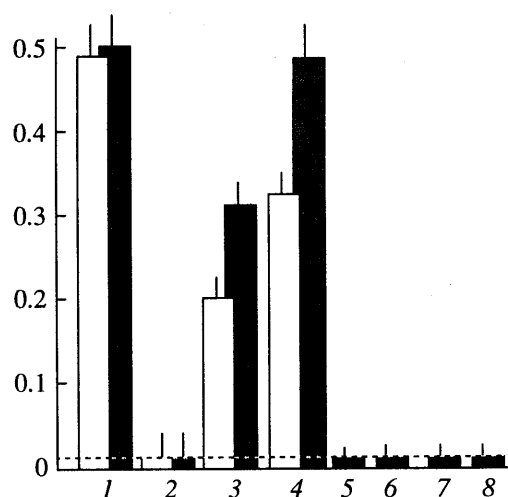


Рис. 2. Блокирование СРБ полилизинном приводит к отмене его токсиннейтрализующей активности. Ордината – степень гемолиза эритроцитов, ед. опт. плотности при 405 нм. 1 – токсин (10 ГЕ, положительный контроль); 2 – СРБ (5 мкг/мл) + токсин; 3, 4 – СРБ + полилизин в концентрациях 100 и 400 нг/мл соответственно + токсин; 5, 6 – СРБ + полилизин (100 и 400 нг/мл); 7, 8 – полилизин (100 и 400 нг/мл); штриховая линия – физиологический раствор (отрицательный контроль). 1, 2, 3, 4 – светлые столбики – стрептолизин О, заштрихованные – тетанолизин.

Таблица 2. Сравнительная способность лигандов С-реактивного белка снижать его нейтрализующую активность в отношении стрептолизина О

Лиганды СРБ	Число опытов	Влияние на активность СРБ	Концентрация, снижающая эффект СРБ на 50%, мкг/мл	Молярное отношение к СРБ
Полилизин	8	+	0.09 ± 0.03	1 : 50
Липополисахарид	3	+	3.4 ± 3.8	1 : 1 - 3**
Лецитин	3	+	1000 ± 400	14 000 : 1
Фосфорилхолин	2	-	13 000*	500 000 : 1
С-полисахарид	3	-	2500*	250 : 1**
Фибронектин	1	-	500*	12 : 1
Гепарин	5	-	19 250*	8300 : 1

Примечание. Плюс – лиганд снижал протективный эффект СРБ, минус – не влиял на него. Одна звездочка – приведена максимальная из испытанных концентраций лиганда, две звездочки – весовое отношение (для лигандов, мол. масса которых была неизвестна).

действие поликатионов на мембраны известно. Оно, например, реализуется организмом в дефенсинах – поликатионных пептидах полиморфно-ядерных лейкоцитов, губительное действие которых на микроорганизмы также сопровождается образованием пор в мембранах микробных клеток [14]. Выше было сказано о гемолитическом действии высоких доз полилизина. Следует отметить, что поликатионные белки лейкоцитов, как и полилизин, связываются С-реактивным белком [15]. Что касается механизма антиоксидантного действия СРБ, то можно предположить, что он сводится к гидрофобно-электростатическому взаимодействию СРБ с олигомерами СЛО или ТЛ, в результате чего блокируется их фиксация на клетке и/или прерывается полимеризация в кольцевые структуры, способные сформировать пору.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пашинин П.М. С-реактивный белок. Дис. ... докт. мед. наук. Л., 1967. 998 с.
2. Петров Р.В., Зарецкая Ю.М. Радиационная иммунология и трансплантация. М.: Атомиздат, 1970. 543 с.
3. Иоффе В.И., Хай Л.М. Ежегодник Института экспериментальной медицины АМН СССР. Л., 1959. С. 238 - 252.
4. Ku N.-O., Mortensen R.F. // Cytokine. 1993. V. 5. № 4. P. 319 - 326.
5. Kindmark C.-O. // Clin. Exp. Immunol. 1972. V. 11. № 2. P. 283 - 289.
6. Mold C., Nakayama S., Holzer T.J. et al. // J. Exp. Med. 1981. V. 154. № 6. P. 1703 - 1708.
7. Pied S., Nussler A., Pontet M. et al. // Infect. Immun. 1989. V. 57. № 1. P. 278 - 282.
8. Pritchard D.G., Volanakis J.E., Slutsky G.M., Greenblatt C.L. // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1985. V. 178. № 3. P. 500 - 503.
9. Trantum-Jensen J. // Meth. Enzymol. 1988. V. 165. P. 357 - 374.
10. Назаров П.Г., Полевицков А.В., Берестовая Л.К. и др. // Бюл. экспер. биол. и мед. 1993. Т. 116. № 12. С. 609 - 611.
11. Bernheimer A.W. // Microbial Toxins. 1970. V. 1. P. 183 - 212.
12. Kilpatrick J.M., Volanakis J.E. // Immunol. Res. 1991. V. 10. P. 43 - 53.
13. Whitehead A.S., Zahedi K. // Biochem. J. 1990. V. 266. № 1. P. 283 - 290.
14. Lehrer R.I., Lichtenstein A.K., Ganz T. // Ann. Rev. Immunol. 1993. V. 11. P. 105 - 128.
15. Siegel J., Osmand A.P., Wolson M.F., Gewurz H. // J. Exp. Med. 1975. V. 142. P. 709 - 721.