

# ЦИТОКИНЫ и ВОСПАЛЕНИЕ

Cytokines & Inflammation

Том 5, №4, 2006

- **Цитокины при пневмониях у детей**
- **Цитокины при инфекциях:  
коклюш, хламидиоз, мелиоидоз**
- **Рекомбинантные цитокины  
в лечении гнойных заболеваний легких**
- **Факторы воспаления в регуляции  
физиологических функций**
- **Цитотоксическая активность  
иммуноглобулинов при рассеянном склерозе**

## C-реактивный белок: фактор воспаления, связывающий и инактивирующий ацетилхолин

П.Г. Назаров, И.Б. Крылова, Н.Р. Евдокимова, Г.И. Нежинская, А.А. Бутюгов

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

C-реактивный белок (CRP), маркер воспаления и защитный фактор врожденного иммунитета, связывает фосфорилхолин (ФХ) и ФХ-содержащие вещества. Основываясь на структурном сходстве между ФХ и ацетилхолином (АХ), исследовали способность очищенного CRP человека связывать АХ, влиять на его физиологическую активность и расщепление ацетилхолинэстеразой. Результаты показали, что CRP связывает АХ. У крыс CRP значительно снижал сердечно-сосудистую реакцию на введение АХ, а *in vitro* связывал АХ и защищал от гидролиза ферментом. Влияние CRP на сердечно-сосудистую систему может реализовываться через АХ-зависимые механизмы. (Цитокины и воспаление. 2006. Т. 5, № 4. С. 32–35.)

**Ключевые слова:** C-реактивный белок, пентраксины, врожденный иммунитет, ацетилхолин.

Пентраксины — это семейство гомологичных белков человека и животных, состоящих из пяти субъединиц и связывающих определенные лиганды. Такие пентраксины, как C-реактивный белок (CRP) и сывороточный P-компонент амилоида (SAP), являются маркерами острой фазы воспаления и играют защитную роль в реакциях врожденного иммунитета. Одна из функций CRP состоит в связывании и поврежденных и вредных продуктов — компонентов клеточного детрита, нуклеопротеинов, бактериальных токсинов, модифицированных липопротеинов [1–3]. Основными лигандами CRP и SAP являются фосфорилхолин (ФХ) и ФХ-содержащие соединения. После связывания с пентраксином они разрушаются комплементом и элиминируются путем фагоцитоза.

ФХ структурно сходен с ацетилхолином (АХ), парасимпатическим нейромедиатором: оба вещества имеют холиновое ядро, соединенное с фосфатом или ацетатом. Несмотря на сходство ФХ и АХ, в литературе нет работ, касающихся сродства пентраксинов к АХ. АХ не упоминался среди лигандов CRP. Вместе с тем, некоторые фосфолипиды (лизофосфатидилхо-

лин, сфингозин, лизо-тромбоцитаактивирующий фактор (lyso-PAF)) проявляют холинолитическую активность, т. е. связываются с ацетилхолиновыми рецепторами (АХР) и конкурируют с АХ, блокируя его физиологическую активность [9, 15].

В литературе обсуждается патогенетическая роль CRP в развитии сердечно-сосудистой тромбозоболической патологии. Считают, что CRP — фактор атерогенеза, способствующий формированию атеросклеротических бляшек и развитию тромбозов [11]. У лиц с повышенным уровнем CRP снижен сосудистый ответ на инфузию АХ [5]. Можно допустить, что CRP способен связывать АХ и ограничивать его влияние на сердечно-сосудистую систему.

Цель работы — исследовать, влияет ли CRP на физиологическую активность АХ *in vivo* и, если да, то каким путем. Проведены следующие исследования: 1) опыты на животных по выяснению влияния CRP на основные виды активности АХ — способность понижать артериальное давление и вызывать брадикардию; 2) опыты *in vitro* по выяснению связывания АХ с CRP с оценкой защиты АХ от разрушения ацетилхолинэстеразой и с оценкой электрофоретической подвижности комплексов CRP-АХ.

Назаров Петр Григорьевич, e-mail: pnazarov@pn4093.spb.edu

## Материалы и методы

Использовали препараты следующих фирм: ацетилхолин хлорид (АХ) — Казанского химфармзавода; очищенный С-реактивный белок человека (CRP) — ICN (USA) и RDI (USA); аденозин (Адо) и ацетилхолинэстеразу (АХЭ; ЕС 3.1.1.7) — ICN (USA); нормальный гамма-глобулин человека (IgG) — НИИЭМ им. Пастера (Санкт-Петербург); фосфорилхолин хлорид (ФХ) — Sigma (USA); пневмококковый С-полисахарид — Reanal (Hungary); реагенты для метода Хестрина и электрофореза в геле агарозы (гидроксиламин, FeCl<sub>3</sub>, HCl, NaOH, дитионитробензойная кислота, маркеры молекулярной массы и др.) — ICN (USA), Helicon (USA) и «Вектон» (Санкт-Петербург).

**Животные и схема опытов.** Опыты проведены на крысах-самцах Wistar (Питомник РАМН «Рапполово», Санкт-Петербург), массой 280–330 г (в возрасте 7 нед.), под внутрибрюшинным наркозом этиналом натрия (50 мг/кг массы тела, растворитель — забуференный физиологический раствор NaCl (ЗФР)). Вводили 2 катетера: один в бедренную артерию для регистрации артериального давления (АД), другой в бедренную вену для введения препаратов. После 30-минутного стабилизационного периода получали ответ на гипотензивные агенты — АХ и Адо. Гипотензивный ответ оценивали по процентному снижению АД по сравнению с индивидуальным фоновым АД. Влияние препаратов на сердечный ритм оценивали по частоте сердцебиений — по максимальному изменению длины интервала R-R на электрокардиограмме (ЭКГ) во втором отведении при скорости записи 50 мм/сек на приборе ЭК1Т-03М2.

Как известно, АД и интервал R-R нормализуются после введения АХ без десенсибилизации рецепторов, не влияя на характер сердечно-сосудистой реакции на повторное введение АХ. Это определило схему опытов. Каждая крыса получала две инъекции вазорелаксанта с интервалом 20 мин. После 1-й инъекции регистрировали исходную сердечно-сосудистую реакцию; через 20 мин вводили тот же релаксант повторно, в той же дозе, но теперь в виде смеси с CRP, IgG или ЗФР, и снова регистрировали сердечно-сосудистую реакцию. Минимальные эффективные дозы АХ и Адо были подобраны в предварительных опытах: оба препарата вводили по 2,5 мкг/кг в 0,1 мл ЗФР.

Группы животных: 1) 1-я инъекция — АХ, 2-я — АХ, смешанный и инкубированный в течение 15 мин при комнатной температуре с 0,1 мл ЗФР (контроль) либо с 0,3 мл CRP (650 мкг/мл); 2) 1-я инъекция — АХ, 2-я — АХ, смешанный и инкубированный, как указано выше, с IgG человека (0,3 мл, 650 мкг/мл); 3) 1-я — Адо, 2-я — Адо в смеси с 0,1 мл ЗФР

либо с 0,3 мл CRP (650 мкг/мл); 4) 1-я инъекция — Адо, 2-я — Адо в смеси с IgG человека (0,3 мл, 650 мкг/мл).

При расчете дозы CRP, вводимого животным, за основу был принят известный факт, что молекула CRP связывает 5 молекул ФХ. В случае введения смеси АХ с CRP крысы получали по 2 нМ CRP и по 5 нМ АХ. Это соответствовало молярному отношению CRP к АХ 1:2,5 и 2-кратному молярному избытку ФХ-связывающих сайтов CRP над АХ.

**Оценку гидролиза АХ ацетилхолинэстеразой (АХЭ) в присутствии CRP или IgG проводили гидроксиламиновой реакцией Хестрина [7] с регистрацией на ридере Spektra-III (Austria) при 570 нм.** Рабочая концентрация АХЭ составляла 1 мг/мл.

**Электрофорез в геле агарозы проводили без додецилсульфата натрия.** CRP, АХ, ФХ, С-полисахарид и АХЭ растворяли в растворе Хэнкса, содержащем ионы кальция.

**Статистическая обработка данных.** Данные представлены в виде средних арифметических (М) и ошибок средних (SEM). Различия между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

**CRP ингибирует ответ на АХ in vivo.** Через 10–15 мин после введения АХ у крыс наблюдалось падение АД на 50 % по сравнению с фоном (табл. 1) с возвратом к исходному уровню в течение 60 сек. Наблюдалось также временное замедление частоты сердцебиений: через 5 сек после введения АХ интервал R-R возрастал в 2,5 раза и через 15 сек возвращался к исходному. Повторная инъекция АХ после 20-минутного перерыва вызывала такие же изменения величины АД и интервала R-R, как 1-я инъекция.

Введение АХ, предварительно смешанного и инкубированного с CRP, приводило к заметному ослаблению (на 33 %) гипотензивного эффекта АХ. У крыс, получивших смесь АХ с CRP, уровень АД снижался достоверно меньше, чем у крыс, получивших АХ+ЗФР ( $p < 0,05$ ), или чем у крыс другой контрольной группы, получивших АХ, смешанный с другим гетерологичным белком (IgG) (табл. 1). Гипотензивный ответ на АХ у животных, получивших смесь АХ с IgG, не отличался

Таблица 1

**Артериальное давление и интервал R-R у крыс, получивших смесь ацетилхолина с С-реактивным белком или IgG**

Номер инъекции	Введенные препараты	АД		Интервал R-R	
		n	Изменение по отношению к исходному уровню, %	n	Изменение по отношению к исходному уровню, %
1	АХ + ЗФР	18	-54 ± 2	14	235 ± 32
2	АХ + ЗФР	7	-52 ± 3	6	226 ± 17
2	АХ + CRP	11	-35 ± 2*	8	11 ± 7*
1	АХ + ЗФР	8	-44 ± 2	6	232 ± 42
2	АХ + ЗФР	3	-45 ± 4	3	224 ± 28
2	АХ + IgG	5	-48 ± 1	3	201 ± 43

**Примечание.** \* — достоверно отличается от 1-й и 2-й инъекций смеси АХ + ЗФР,  $p < 0,05$ .

от животных контрольной группы, получивших АХ в смеси с ЗФР (см. табл. 1).

Иные результаты были получены с Адо в качестве вазорелаксанта (табл. 2). В смеси с CRP Адо вызывал такое же снижение АД, как и в смеси с ЗФР ( $p > 0,05$ ), т. е. в случае Адо-индуцированной вазорелаксации CRP не оказывал влияния. Таким образом, CRP не уменьшал эндотелий-

независимый гипотензивный эффект. Эффект смеси Адо+IgG также не отличался от эффекта контрольной смеси Адо+ЗФР (см. табл. 2,  $p > 0,05$ ).

Влияние АХ и Адо на сердечный ритм оценивали по длине интервала R-R на ЭКГ (см. табл. 1, 2). Оба агента вызывали достоверное удлинение интервала R-R. Добавление CRP к АХ существенно влияло на длину интервала R-R по сравнению со смесью АХ+ЗФР (см. табл. 2,  $p < 0,05$ ): CRP почти полностью отменял влияние АХ на сердечный ритм; АХ в смеси с CRP практически не влиял на частоту сердечбиений.

Совершенно иные результаты получены с Адо. Вызываемое этим эндотелий-независимым вазорелаксантом удлинение интервала R-R было нечувствительно к модуляции С-реактивным белком (см. табл. 2); различие между группами «Адо+CRP» и «Адо+ЗФР» было недостоверным ( $p > 0,05$ ).

CRP ингибирует гидролиз АХ ферментом АХЭ *in vitro*. Человеческий CRP дозозависимо угнетал расщепление АХ ферментом АХЭ (достоверно при концентрациях CRP 1,5 и 0,75 мг/мл —  $p < 0,05$ , табл. 3). В отличие от CRP, IgG в таких же концентрациях не угнетал расщепление АХ (см. табл. 3).

CRP не взаимодействует с АХЭ. Электрофоретическая подвижность CRP, смешанного с АХ, была такой же, как у CRP, смешанного с ЗФР (рисунок). Низкомолекулярный АХ не изменял заряда и подвижности CRP. В случае смеси CRP с АХЭ оба компонента мигрировали независимо, с такими же скоростями, как на контрольных дорожках, где их наносили по отдельности. Таким образом, CRP не взаимодействует с ферментом АХЭ. В то же время, контрольная дорожка (рис., дорожка № 4,) показывает, что подвижность CRP заметно изменялась при смешивании с известным ФХ-содержащим лигандом (пневмококковым С-полисахаридом). Данные электрофореза указывают на то, что CRP не взаимодействует с АХЭ. Следовательно, ингибирующий эффект CRP в отношении расщепления АХ ферментом АХЭ является результатом связывания пентраксина с нейромедиатором.

**Заключение**

Результаты исследования влияния CRP на два основных эффекта АХ *in vivo* — гипотензивный и брадикардический — впервые показали, что CRP ингибирует биологическую активность АХ. Оба эффекта АХ достоверно подавляются пентраксином.

**Артериальное давление и интервал R-R у крыс, получивших смесь аденозина с С-реактивным белком или IgG**

Номер инъекции	Введенные препараты	АД		Интервал R-R	
		п	Изменение по отношению к исходному уровню, %	п	Изменение по отношению к исходному уровню, %
1	Адо + ЗФР	9	-38 ± 2	9	351 ± 77
2	Адо + ЗФР	5	-39 ± 3	5	329 ± 74
2	Адо + CRP	4	-33 ± 8	4	419 ± 157
1	Адо + ЗФР	8	-41 ± 3	8	315 ± 48
2	Адо + ЗФР	5	-40 ± 4	5	260 ± 37
2	Адо + IgG	3	-37 ± 2	3	275 ± 83

Таблица 3

**С-реактивный белок ингибирует разрушение ацетилхолина ацетилхолинэстеразой (% гидролиза АХ)**

Концентрация IgG или CRP, мг/мл	IgG	CRP
1,5	54,0 ± 1,5	27,7 ± 1,6*
0,75	55,4 ± 0,7	38,4 ± 1,7*
0,3	52,7 ± 1,7	48,4 ± 1,7
0 (ЗФР, контроль)	51,4 ± 2,8	

**Примечание.** Представлены М±SEM четырех опытов. \* — достоверно отличается от влияния соответствующей дозы IgG ( $p < 0,05$ ).

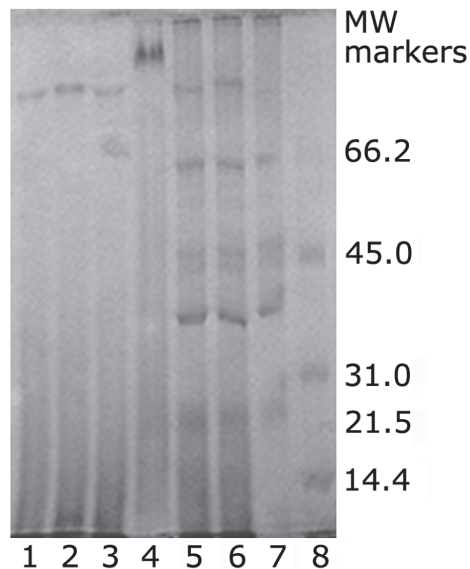


Рисунок. Электрофорез смесей CRP с ацетилхолином, пневмококковым С-полисахаридом и ацетилхолинэстеразой

Дорожки: 1 — смесь CRP+АХ; 2, 3 — CRP; 4 — смесь CRP+пневмококковый С-полисахарид; 5, 6 — смесь CRP+АХЭ; 7 — АХЭ; 8 — маркеры молекулярной массы (указана мол. масса в кДа).

Как известно, медиатором сосудорасширяющего действия обоих релаксантов — АХ и Адо — является оксид азота, хотя АХ и Адо действуют че-

рез разные мембранные рецепторы [10, 12]. Ингибирующий эффект CRP проявлялся только в отношении АХ, но не в отношении Адо, следовательно, CRP влияет не на генерацию NO, а на АХ-зависимые механизмы активации АХР.

Одним из доказанных нами механизмов ингибирующего эффекта CRP в отношении АХ является связывание АХ как лиганда. CRP блокировал АХ и затруднял его атаку ферментом АХЭ. По этой причине пентраксин должен предотвращать взаимодействие АХ и с клеточными АХР, что, вероятно, и является причиной наблюдаемого смягчения или отмены влияния АХ на клеточные функции *in vivo*. Таким образом, наши данные показали, что АХ является лигандом CRP.

Нельзя исключить ингибирующего влияния CRP на физиологию клеток и другими путями, например, путем воздействия CRP непосредственно на АХР или другие рецепторы. Этот вопрос требует изучения.

Способность CRP связывать и нейтрализовать АХ может оказывать влияние на процессы, протекающие с участием АХ в разных регуляторных компартментах организма. Роль CRP может быть актуальна как для системы парасимпатической нервной регуляции, так и за ее пределами, в частно-

сти для автономной регуляции в рамках иммунной системы, где АХ действует как внутренний фактор, синтезируемый лимфоидными клетками [8, 13, 14].

Таким образом, наши данные указывают на существование новой линии взаимодействий между воспалением (с CRP в качестве фактора) и холинергической регуляцией. Одним из механизмов влияния С-реактивного белка на эндотелий является АХ-зависимый путь.

Синтез в печени и массивный выброс CRP связаны с воспалением, что, на первый взгляд, ограничивает влияние пентраксина на функции АХ острой фазой воспаления. Однако показано, что CRP продуцируется не только гепатоцитами при системном воспалении, но и клетками иммунной системы при их активации [4, 6]. Локально синтезированный CRP может участвовать в регуляции местных иммунологических процессов, управляемых вне-нейрональным АХ, также имеющим лимфоидное происхождение. Характер взаимодействий между CRP и АХ, их физиологические последствия и роль в регуляции реакций врожденного иммунитета требует дальнейшего изучения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 06-04-49629.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Назаров П.Г. Реактанты острой фазы воспаления. — СПб.: Наука, 2001. — 423 с.
2. Назаров П.Г., Берестовая Л.К. Ингибирующее действие С-реактивного белка (СРБ) на гемолитическую активность стрептолизина О. Сравнение конформационных вариантов СРБ // Бюл. эксперим. биол. мед. — 1995. — Т. 119, № 5. — С. 506–509.
3. Назаров П.Г., Берестовая Л.К. Нейтрализующая активность С-реактивного белка в отношении порообразующих цитотоксинов бактериального происхождения // Докл. РАН. — 1995. — Т. 343, № 1. — С. 123–126.
4. Назаров П.Г., Софронов Б.Н. Синтез С-реактивного белка лимфоидными клетками // Медиаторы иммунного ответа в эксперименте и клинике. — М., 1983. — С. 112–113.
5. Fichtlscherer S., Breuer S., Zeiher A.M. Prognostic value of systemic endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndromes: further evidence for the existence of the «vulnerable» patient // Circulation. — 2004. — Vol. 110, № 14. — P. 1926–1932.
6. Ikuta T., Okubo H., Ishibashi H. et al. Human lymphocytes synthesize C-reactive protein // Inflammation. — 1986. — Vol. 10, № 3. — P. 223–232.
7. Kao G., Tsai C.-M. Quantification of O-acetyl, N-acetyl and phosphate groups and determination of the extent of O-acetylation in bacterial vaccine polysaccharides by high-performance anion-exchange chromatography with conductivity detection (HPAEC-CD) // Vaccine. — 2004. — Vol. 22. — P. 335–344.
8. Kirkpatrick C.J., Bittinger F., Nozadze K., Wessler I. Expression and function of the non-neuronal cholinergic system in endothelial cells // Life Sci. — 2003. — Vol. 72. — P. 2111–2116.
9. Mangin E.L., Kugiyama K., Nguy J.H. et al. Effects of lysolipids and oxidatively modified low density lipoprotein on endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta // Circulation res. — 1993. — Vol. 72, № 1. — P. 161–166.
10. Murad F. The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication // Recent Prog. Horm. Res. — 1994. — Vol. 49. — P. 239–248.
11. Verhamme P., Quarc R., Hao H. et al. Dietary cholesterol withdrawal reduces vascular inflammation and induces coronary plaque stabilization in miniature pigs // Cardiovasc. Res. — 2002. — Vol. 56, № 1. — P. 135–144.
12. Wang Y.X., Poon C.I., Poon K.S., Pang C.C. Inhibitory actions of diphenylethanolamine on endothelium-dependent vasodilatations in vitro and in vivo // Br. J. Pharmacol. — 1993. — Vol. 110, № 3. — P. 1232–1238.
13. Wessler I., Kilbinger H., Bittinger F. et al. The non-neuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology // Life Sci. — 2003. — Vol. 72. — P. 2055–2061.
14. Wessler I.K., Kirkpatrick C.J. The non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways // Pulm. Pharmacol. Therapeutics. — 2001. — Vol. 14. — P. 423–434.
15. Zvezdina N.D., Prokasova N.V., Vaver V.A. et al. Effect of lysolecithin and lecithin of blood serum on the sensitivity of heart to acetylcholine // Biochem. Pharmacol. — 1978. — Vol. 27, № 24. — P. 2793–801.

### C-reactive protein: a factor of inflammation binding and inactivating acetylcholine

P.G. Nazarov, I.B. Krylova, N.R. Evdokimova, G.I. Nezhinskaya, A.A. Butyugov  
Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg

**C-reactive protein (CRP), a marker of inflammation and factor of innate immunity, binds phosphorylcholine (PC) and PC-containing compounds. Based on structural similarity between PC and acetylcholine (ACh) we investigated the ability of purified human CRP to bind ACh and influence its physiological activity and susceptibility to breakdown with acetylcholinesterase (AChE). The results showed that CRP binds ACh. CRP significantly lowered the cardio-vascular response of rats to ACh infusion and protected ACh from hydrolysis by AChE *in vitro*. It is suggested that CRP effects on cardio-vascular system *in vivo* is mediated through ACh-dependent mechanisms. (Cytokines and Inflammation. 2006. Vol. 5, № 4. P. 32-35.)**

**Key words:** C-reactive protein, pentraxins, innate immunity, acetylcholine.