

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ БАЗОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ С-РЕАКТИВНОГО ПРОТЕИНА В КРОВИ, УРОВНЯМИ СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИЭНДОТОКСИНОВЫХ АНТИТЕЛ И ЭНДОТОКСИНСВЯЗЫВАЮЩИМ ПОТЕНЦИАЛОМ МОНОЦИТОВ И ГРАНУЛОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

А. И. ГОРДИЕНКО

*ГУ «Крымский государственный медицинский университет
им. С. И. Георгиевского», Симферополь, Украина;
e-mail: uu4jey@csmu.strace.net*

Методом кластерного анализа изучены ассоциативные связи между базовой концентрацией С-реактивного протеина, уровнями антиэндотоксिनотических антител разных классов и эндотоксинсвязывающим потенциалом моноцитов и гранулоцитов периферической крови у здоровых людей. Установлено, что у людей с повышенной базовой концентрацией С-реактивного протеина в крови достоверно снижено содержание сывороточных антиэндотоксिनотических антител разных классов и снижен уровень эндотоксинсвязывающего потенциала моноцитов и гранулоцитов. Таким образом, несостоятельность гуморальных и клеточноопосредованных механизмов детоксикации и клиренса эндотоксина может быть одной из возможных причин развития низкоинтенсивного воспаления и повышения уровня С-реактивного протеина в крови.

Ключевые слова: эндотоксин, антитела, рецепторы, С-реактивный протеин.

Имеющиеся на сегодняшний день клинико-экспериментальные данные указывают на то, что развитие атеросклероза и его осложнений во многом обусловлено вялотекущими воспалительными процессами в эндотелии [1, 2]. Одним из центральных компонентов воспаления является С-реактивный протеин (СРП) – мультифункциональный протеин острой фазы, задействованный в механизмах развития воспалительного ответа и защите организма от инфекционных агентов [3]. Введение в лабораторную практику новых высокочувствительных методов анализа СРП позволило существенно изменить представления о прогностической значимости определения содержания СРП в пределах от 0,5 до 5 мг/л, что находится ниже порогового значения (5 мг/л), указывающего на наличие воспаления. Оказалось, что у здоровых людей, а также у пациентов при отсутствии воспалительного ответа или вне периода обострения заболевания этот показатель, который получил название «базовая концентрация СРП», является достаточно стабильным параметром. В дальнейшем в целом ряде проспективных исследований было показано, что даже незначительное повышение базовой концентрации СРП служит достоверным и независимым предиктором кардиоваскулярного риска [4, 5].

Одним из экзогенных факторов, участвующих в поддержании низкоинтенсивного воспаления в эндотелии, может быть эндотоксин (ЭТ) [6, 7], представляющий собой полимерный гликолипид, который в качестве основного структурно-функционального компонента входит в состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Обладая чрезвычайно высокой биологической активностью, при попадании в организм ЭТ инициирует различные патофизиологические реакции, сопровождающиеся продукцией широкого спектра медиаторов воспаления [8].

В физиологических условиях основной причиной поступления ЭТ в кровь считается бактериальная транслокация – проникновение грамотрицательной сапрофитной микрофлоры дистальных отделов желудочно-кишечного тракта и продуктов ее жизнедеятельности, включая ЭТ, из просвета кишечника в брыжеечные лимфатические узлы, внутренние органы и кровь [9]. Усиление бактериальной транслокации на фоне нарушений иммунных механизмов нейтрализации биологической активности и клиренса ЭТ, которые реализуются при участии гуморальных и клеточных факторов, может создавать благоприятные условия для проявления феномена эндотоксина агрессии и поддержания хронического низко-

интенсивного воспаления в сосудистой стенке [10].

Начальным этапом вызываемых ЭТ патофизиологических реакций является его взаимодействие с ЭТ-связывающими рецепторами эффекторных клеток, к которым в первую очередь относятся клетки мономиелоцитарного ряда [8]. Ранее нами была разработана методика интегральной оценки ЭТ-связывающего потенциала (ЭТ-П) моноцитов и гранулоцитов периферической крови с помощью проточной лазерной цитофлуориметрии, которая основана на использовании в качестве флуоресцентного зонда конъюгата ЭТ с флуоресцеинизотиоцианатом [11].

Целью данной работы являлась типологическая классификация выборки здоровых людей по ассоциативным связям между базовой концентрацией СРП в крови, ЭТ-П моноцитов и гранулоцитов и уровнями сывороточных антиэндоксинных антител (анти-ЭТ-АТ) разных классов, которую проводили методом кластерного анализа.

Материалы и методы

Обследуемую выборку здоровых людей составили 52 человека (25 мужчин и 27 женщин, средний возраст $43,0 \pm 1,5$ года), у которых в анамнезе не было каких-либо хронических заболеваний, а на момент проведения обследования отсутствовали клинические проявления острой инфекционной патологии. Сыворотку периферической крови получали общепринятым способом и хранили при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Уровни сывороточных анти-ЭТ-АТ классов А, М и G определяли методом твердофазного иммуноэнзимного анализа (тИЭА) [12] с использованием в качестве антигена липополисахарида (ЛПС) *Escherichia coli* K235 (Sigma Chem. Co., США). Концентрацию СРП определяли методом тИЭА [hsCRP ELISA, DRG International Inc., США]. ЭТ-П моноцитов и гранулоцитов периферической крови оценивали методом проточной лазерной цитофлуориметрии с помощью двухцветного варианта флуоресцентного теста [11], основанного на одновременном применении конъюгата ЛПС *E. coli* K235 с флуоресцеинизотиоцианатом и моноклональных антител к антигену CD14, конъюгированных с фикоэритрином (анти-CD14-PE; IOTest® Beckman Coulter Co., Франция). Для сбора данных и их анализа использовали проточный лазерный цитофлуориметр PASIII и программное обеспечение Partec FloMax V. 2.4d (Partec GmbH, Munster, Германия).

Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью программного пакета STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., USA). При проведении кластерного анализа использовали агломеративно-иерархический алгоритм Варда (Ward's method) и метрику City-block (Manhattan) в качестве матрицы расстояний, а также итерационный метод k -средних МакКина [13, 14].

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены статистические показатели, характеризующие основные особенности распределения концентрации СРП, уровней сывороточных анти-ЭТ-АТ разных классов, ЭТ-П моноцитов и гранулоцитов периферической крови у практически здоровых людей. Установлено, что как среднее значение концентрации СРП в крови обследованной выборки здоровых людей, так и максимальное зарегистрированное значение этого показателя не превышает порогового диагностического уровня (5 мг/л), свидетельствующего о наличии воспаления. Вместе с тем индивидуальное содержание СРП в крови обследованных людей колеблется в достаточно широких пределах, на что указывает высокая величина коэффициента вариации для этого показателя. Такое же значительное рассеяние индивидуальных уровней относительно своих средних значений зарегистрировано для анти-ЭТ-АТ разных классов. Вместе с тем вариабельность ЭТ-П моноцитов и гранулоцитов существенно ниже (коэффициент вариации в среднем в 2,6 раза меньше коэффициентов вариации для СРП и анти-ЭТ-АТ разных классов).

Корреляционный анализ всего массива полученных данных с использованием непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена показал, что достоверные корреляции между концентрацией СРП в крови, уровнями сывороточных анти-ЭТ-АТ классов А, М и G и ЭТ-П моноцитов и гранулоцитов отсутствуют.

На следующем этапе исследований с помощью кластерного анализа (КА) была проведена типологическая классификация обследованной выборки здоровых людей по ассоциативным связям между базовой концентрацией СРП, уровнями сывороточных анти-ЭТ-АТ разных классов и ЭТ-П моноцитов и гранулоцитов. КА представляет собой особый метод группировки многомерных объектов, основанный на представлении результатов отдельных наблюдений точками подходящего геометрического пространства с последующим

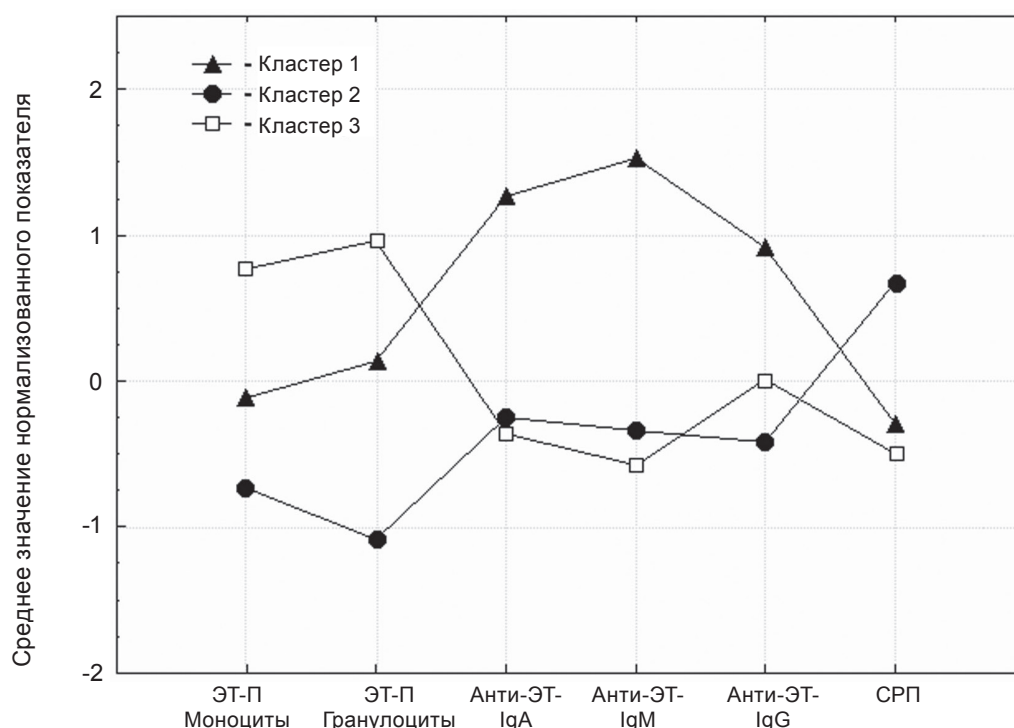
Таблица 1. Статистические показатели, характеризующие распределение концентрации С-реактивного протеина (СРП) в крови, уровней сывороточных антиэндотоксиновых антител разных классов и эндотоксинсвязывающего потенциала моноцитов и гранулоцитов периферической крови в выборке здоровых людей ($n = 52$)

Параметр	Антиэндотоксиновые антитела, усл. ед.			Эндотоксинсвязывающий потенциал, усл. ед.		СРП, мг/л
	Анти-ЭТ-IgA	Анти-ЭТ-IgM	Анти-ЭТ-IgG	Моноциты	Гранулоциты	
Среднее значение	0,285	0,254	0,832	1,99	1,12	1,59
Стандартная ошибка	0,030	0,026	0,069	0,07	0,04	0,13
Минимум	0,056	0,030	0,141	0,76	0,60	0,67
Максимум	1,227	0,737	2,142	3,09	1,69	4,91
Коэффициент вариации	75,7	74,6	59,8	26,3	25,5	60,6

выделением групп как «сгустков» (кластеров) этих точек [15]. КА считается очень эффективным способом выявления однородных совокупностей по количественным признакам и находит широкое применение в медико-биологических исследованиях [13, 14].

Результаты кластерного анализа массива данных обследованной выборки здоровых людей с использованием итерационного метода

k -средних Мак-Кина приведены на рисунке. Оказалось, что она фактически представлена тремя кластерами. В эти кластеры, условно обозначенные как кластеры 1, 2 и 3, вошло соответственно 23,0; 38,5 и 38,5% от общего числа обследованных лиц. При этом в пределах каждого из указанных кластеров имеют место вполне определенные закономерности в соотношениях между уровнями сывороточных



Кластеризация обследованной выборки здоровых людей по ассоциативным связям между уровнями сывороточных антиэндотоксиновых антител классов А, М и G, базовой концентрацией С-реактивного протеина в крови и ЭТ-связывающим потенциалом моноцитов и гранулоцитов (итерационный метод k -средних Мак-Кина)

анти-ЭТ-АТ классов А, М и G, ЭТ-П моноцитов и гранулоцитов и базовой концентрацией С-реактивного протеина в крови (рис. и табл. 2).

У лиц, сформировавших кластер 2, базовая концентрация СРП в крови выше, чем у людей, вошедших в кластеры 1 и 3, в среднем соответственно на 41,8% ($P < 0,01$) и на 50,4% ($P < 0,001$). В тоже время у людей из этого кластера ЭТ-П моноцитов в среднем на 46,0% ниже по сравнению с величиной этого показателя для лиц из кластера 3, а ЭТ-П гранулоцитов ниже ЭТ-П гранулоцитов для людей из кластеров 1 и 3 в среднем соответственно на 39,8% ($P < 0,001$) и 65,1% ($P < 0,001$).

Уровни анти-ЭТ-IgА и анти-ЭТ-IgМ у лиц из кластера 2 в среднем достоверно не отличаются от аналогичных показателей для людей из кластера 3, тогда как по сравнению с этими же показателями для лиц кластера 1 они ниже соответственно в 2,43 ($P < 0,001$) и 2,76 раза ($P < 0,001$). Уровни анти-ЭТ-IgG у людей из кластера 2 по сравнению с величиной этого же показателя для лиц из кластеров 1 и

3 в среднем ниже соответственно в 2,10 раза ($P < 0,001$) и на 33,5% ($P < 0,01$).

Увеличение базовой концентрации СРП более 2 мг/л считается лабораторным признаком вялотекущего воспалительного процесса и в настоящее время рассматривается в качестве независимого предиктора повышенного сердечно-сосудистого риска [16]. Синтез СРП происходит преимущественно в гепатоцитах и инициируется различными факторами, включая цитокины IL-6 и IL-1 β [3]. Хотя они могут синтезироваться разными клетками, к важнейшим продуцентам этих цитокинов относятся моноциты, а одним из активаторов их синтеза является ЭТ [17, 18]. На моноцитах экспрессируются мембранные рецепторы CD14 и TLR4, которые вместе с внеклеточным адаптерным гликопротеином MD2 образуют рецепторный комплекс, обеспечивающий распознавание ЭТ и последующую внутриклеточную трансдукцию сигнала на внутриядерный фактор транскрипции NF κ b. При участии NF κ b происходит активация генов медиаторов воспаления и синтез провоспалительных цитокинов, вклю-

Таблица 2. Базовая концентрация С-реактивного протеина в крови, уровни сывороточных анти-эндотоксиновых антител разных классов и эндотоксинсвязывающий потенциал моноцитов и гранулоцитов периферической крови у здоровых людей, отнесенных к разным кластерам ($M \pm m$)

Показатель		Здоровые люди ($n = 52$)		
		Кластер 1 ($n = 12$)	Кластер 2 ($n = 20$)	Кластер 3 ($n = 20$)
ЭТ-П, усл. ед.	Моноциты	1,94 \pm 0,13 $P_2 = 0,111$ $P_3 = 0,006$	1,63 \pm 0,096 $P_3 < 0,001$	2,38 \pm 0,082
	Гранулоциты	1,16 \pm 0,04 $P_2 < 0,001$ $P_3 = 0,002$	0,83 \pm 0,030 $P_3 < 0,001$	1,37 \pm 0,039
Анти-ЭТ-АТ, усл. ед.	Анти-ЭТ-IgА	0,537 \pm 0,082 $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,001$	0,221 \pm 0,025 $P_3 = 0,449$	0,198 \pm 0,025
	Анти-ЭТ-IgМ	0,530 \pm 0,042 $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,001$	0,192 \pm 0,025 $P_3 = 0,293$	0,150 \pm 0,020
	Анти-ЭТ-IgG	1,246 \pm 0,174 $P_2 = 0,002$ $P_3 = 0,052$	0,606 \pm 0,100 $P_3 = 0,016$	0,809 \pm 0,067
С-реактивный протеин, мг/л		1,21 \pm 0,19 $P_2 = 0,004$ $P_3 = 0,259$	2,24 \pm 0,26 $P_3 < 0,001$	1,11 \pm 0,09

Примечание. P_2 – Достоверность различий по сравнению с кластером 2; P_3 – достоверность различий по сравнению с кластером 3.

чая IL-6 и IL-1 β [19]. Посредством указанного механизма ЭТ может положительно воздействовать на синтез СРП и других протеинов острой фазы воспаления. Действительно, было показано, что парентеральное введение ЭТ вызывает увеличение концентрации СРП в крови [20].

По данным литературы, уровень ЭТ в крови портальной вены здоровых людей, колеблется в пределах от 10 пкг/мл до 1 нг/мл. Хотя в норме основная часть ЭТ, попадающего в портальный кровоток, элиминируется резидентными макрофагами печени без развития локальной воспалительной реакции, за счет наличия портокавальных анастомозов около 6% портальной крови минует печеночный барьер и непосредственно попадает в системный кровоток [21]. В нейтрализации биологической активности ЭТ и его клиренсе из системного кровообращения важную роль играют эффекторы адаптивного и врожденного иммунитета, которые представлены соответственно анти-ЭТ-АТ [22] и гранулоцитами. Последние экспрессируют особый тип мембранных рецепторов (scavenger receptors), способных связывать ЭТ [23] с его последующей внутриклеточной детоксикацией путем деацилирования и дефосфорилирования с помощью специализированных энзиматических систем [24].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в подгруппе здоровых людей с повышенной базовой концентрацией СРП в крови (в среднем $2,24 \pm 0,26$ мг/л) имеет место параллельное снижение как ЭТ-П моноцитов и гранулоцитов периферической крови, так и уровней сывороточных анти-ЭТ-АТ всех трех классов. Поскольку для оценки ЭТ-П указанных субпопуляций лимфоцитов использовался метод, основанный на выявлении только функционально активных ЭТ-связывающих рецепторов [11], уменьшение ЭТ-П гранулоцитов указывает на снижение способности гранулоцитов к клиренсу ЭТ из системного кровотока. Учитывая, что анти-ЭТ-АТ также принимают непосредственное участие в связывании и нейтрализации ЭТ, причем наибольшим протективным эффектом в этом отношении обладают анти-ЭТ-АТ класса М [25], снижение уровней сывороточных анти-ЭТ-АТ разных классов можно интерпретировать как дисбаланс в системе иммунной защиты от ЭТ. В то же время выявленное снижение ЭТ-П моноцитов у

людей с повышенной базовой концентрацией СРП в крови может быть обусловлено тем, что определенная часть ЭТ-связывающих рецепторов на этих клетках уже занята лигандом и задействована в трансдукции активационного сигнала. С учетом сказанного можно предположить, что несостоятельность гуморальных и клеточноопосредованных механизмов детоксикации и клиренса ЭТ представляет одну из возможных причин развития низкоинтенсивного воспаления и повышения уровня СРП в крови до величины, которая рассматривается как предиктор кардиоваскулярного риска.

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ БАЗОВОЮ КОНЦЕНТРАЦІЄЮ С-РЕАКТИВНОГО ПРОТЕЇНУ В КРОВІ, РІВНЯМИ СИРОВАТКОВИХ АНТИЕНДОТОКСИНОВИХ АНТИТІЛ І ЕНДОТОКСИНЗВ'ЯЗУВАЛЬНИМ ПОТЕНЦІАЛОМ МОНОЦИТІВ І ГРАНУЛОЦИТІВ У ЗДОРОВИХ ЛЮДЕЙ

А. І. Гордієнко

ДУ «Кримський державний медичний університет
ім. С. І. Георгієвського», Сімферополь, Україна;
e-mail: uu4jey@csmu.strace.net

Методом кластерного аналізу вивчено асоціативні зв'язки між базовою концентрацією С-реактивного протеїну, рівнями антиендотоксинних антитіл різних класів і ендотоксинзв'язувальним потенціалом моноцитів і гранулоцитів периферичної крові у здорових людей. Встановлено, що в людей з підвищеною базовою концентрацією С-реактивного протеїну в крові вірогідно знижено вміст сироваткових антиендотоксинних антитіл різних класів і знижено рівень ендотоксинзв'язувального потенціалу моноцитів і гранулоцитів. Отже, неспроможність гуморальних і клітинноопосередкованих механізмів детоксикації і кліренсу ендотоксину може бути однією з можливих причин розвитку низькоінтенсивного запалення і підвищення рівня С-реактивного протеїну в крові.

Ключові слова: ендотоксин, антитіла, рецептори до ендотоксину, С-реактивний протеїн.

CORRELATION BETWEEN BASE CONCENTRATION OF C-REACTIVE PROTEIN IN THE BLOOD, LEVELS OF SERUM ANTIENDOTOXIN ANTIBODIES AND ENDOTOXIN-BINDING CAPACITY OF MONOCYTES AND GRANULOCYTES OF HEALTHY PEOPLE

A. I. Gordienko

State Institution S. I. Georgievsky Crimea State Medical University, Simferopol, Ukraine;
e-mail: uu4jey@csmu.strace.net

The associative links between base concentration of C-reactive protein (hsCRP), levels of serum antiendotoxin antibodies of different classes and endotoxin-binding capacity of monocytes and granulocytes of healthy volunteers were investigated by cluster analysis. In the group of healthy volunteers with increased base concentration of hsCRP in blood the levels of serum antiendotoxin antibodies of different classes and endotoxin-binding capacity of monocytes and granulocytes were reduced. Thus, the disbalance of detoxification and clearance of endotoxin by humoral and cellular mechanisms can be one of the possible causes of development of low intensity inflammation and increase of hsCRP concentration in blood.

Key words: endotoxin, antibodies, receptor for endotoxin, C-reactive protein.

1. Mizuno Y., Jacob R. F., Mason R. P. // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2011. – **18**, N 5. – P. 351–358.
2. Libby P., Okamoto Y., Rocha V. Z., Folco E. // *Circ. J.* – 2010. – **74**, N 2. – P. 213–220.
3. Black S., Kushner I., Samols D. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 47. – P. 48487–48490.
4. Bikdeli B. // *Cardiovasc. Drugs Ther.* – 2011. – **25**, N 6. – P. 545–549.
5. Abraham J., Campbell C. Y., Cheema A. et al. // *J. Cardiometab. Syndr.* – 2007. – **2**, N 2. – P. 119–123.
6. Stoll L. L., Denning G. M., Weintraub N. L. // *Curr. Pharm. Des.* – 2006. – **12**, N 32. – P. 4229–4245.
7. Stoll L. L., Denning G. M., Weintraub N. L. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – **24**, N 12. – P. 2227–2236.
8. Heine H., Rietschel E. T., Ulmer A. J. // *Mol. Biotechnol.* – 2001. – **19**, N 3. – P. 279–279.
9. Balzan S., de Almeida Quadros C., de Cleve R. et al. // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2007. – **22**, N 4. – P. 464–471.
10. Яковлев М. Ю. // *Успехи совр. биол.* – 2003. – **123**, № 1. – С. 31–40.
11. Гордиенко А. И. // *Імунологія та алергологія.* – 2008. – № 2. – С. 107–113.
12. Гордиенко А. И. // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – **76**, № 6. – С. 130–135.
13. Жижин К. С. *Медицинская статистика.* – Ростов н/Д: Феникс, 2007. – 160 с.
14. Реброва О. Ю. *Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA.* – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
15. Мандель И. Д. *Кластерный анализ.* – М., Финансы и статистика, 1988. – 176 с.
16. Anand S. S., Yusuf S. // *Eur. Heart. J.* – 2010. – **31**, N 17. – P. 2092–2096.
17. Song R., Kim J., Yu D. et al. // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2012. – **146**, N 2. – P. 143–149.
18. Jang C. H., Choi J. H., Byun M. S., Jue D. M. // *Rheumatology.* – 2006. – **45**, N 6. – P. 703–710.
19. Fitzgerald K. A., Rowe D. C., Golenbock D. T. // *Microbes Infect.* – 2004. – **6**, N 15. – P. 1361–1367.
20. White A., Fletcher T. C., Pepys M. B. // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1993. – **74**, N 3. – P. 453–458.
21. Wolter J., Liehr H., Grun M. // *J. Reticuloendothel. Soc.* – 1978. – **23**, N 2. – P. 145–152.
22. Müller-Loennies S., Brade L., Brade H. // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2007. – **297**, N 5. – P. 321–340.
23. Hampton R. Y., Golenbock D. T., Penman M. et al. // *Nature.* – 1991. – **352**, N 6333. – P. 342–344.
24. Munford R. S., Hall C. L. // *Science.* – 1986. – **234**, N 4773. – P. 203–205.
25. Trautmann M., Held T. K., Susa M. et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 1998. – **111**, N 1. – P. 81–90.

Получено 12.02.2013