

РОЛЬ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* M49-16 В ИНГИБИЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ EA.hy926

**Старикова Э.А.¹, Карасева А.Б.¹, Бурова Л.А.¹, Суворов А.Н.¹,
Соколов А.В.¹, Васильев В.Б.¹, Фрейдлин И.С.^{1,2}**

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Аргининдеиминаза (АД) – бактериальный фермент, который осуществляет гидролиз аргинина с образованием цитрулина и аммиака. В последние годы в литературе накапливается все больше данных об антиангиогенном действии АД *Mycoplasma spp.* в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Наши исследования показали, что АД *Streptococcus pyogenes* тип M22 обладает аналогичным эффектом, а именно – подавляет пролиферацию и другие функции эндотелиальных клеток, связанные с процессом ангиогенеза. Для подтверждения ведущей роли АД как фактора, ответственного за антипролиферативное действие, был сконструирован изогенный мутант *S. pyogenes* тип M49-16, не способный экспрессировать АД. Был проведен сравнительный анализ антипролиферативной активности *S. pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с делецией гена АД (M49-16delAD) в отношении эндотелиальных клеток линии EA.hy926. В работе использовали супернатанты разрушенных ультразвуком *S. pyogenes* M49-16 и M49-16delAD. В ходе исследований проводили сравнение способности супернатантов разрушенных *S. pyogenes* M49-16 и M49-16delAD гидролизовать аргинин. Кроме того, изучали влияние супернатантов разрушенных стрептококков на пролиферативную активность эндотелиальных клеток и их распределение по фазам клеточного цикла. Исследования показали, что супернатант исходного штамма *S. pyogenes* 49-16 достоверно подавлял пролиферацию эндотелиальных клеток (на 50% от контроля). Этот эффект был обусловлен его аргинингидролизующей активностью, т.к. добавление в среду экзогенного аргинина приводило к восстановлению пролиферации клеток до уровня пролиферации в контроле. Супернатант *S. pyogenes* M49-16delAD обладал достоверно сниженной по сравнению с супернатантом исходного штамма способностью гидролизовать аргинин. Культивирование эндотелиальных клеток в присутствии супернатанта *S. pyogenes* M49-16delAD приводило к снижению их пролиферативной активности только на 10% от контроля. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла подтвердил эти результаты. Супернатант *S. pyogenes* M49-16 снижал долю клеток в фазах синтеза на 20% по сравнению с контролем. В присутствии супернатанта *S. pyogenes* M49-16delAD уменьшение доли клеток в фазах синтеза было выражено достоверно слабее и составило всего 5% от контроля. Полученные результаты раскрывают новые патогенетические механизмы эндотелиальной дисфункции при стрептококковой инфекции и доказывают антиангиогенный потенциал стрептококковой аргининдеиминазы.

Ключевые слова: *S. pyogenes*, аргининдеиминаза, эндотелиальные клетки, аргинин, пролиферация

Адрес для переписки:

Старикова Элеонора Александровна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-16-69.
Факс: 8 (812) 234-94-89.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Address for correspondence:

Starikova Eleonora A.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-16-69.
Fax: 7 (812) 234-94-89.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Образец цитирования:

Э.А. Старикова, А.Б. Карасева, Л.А. Бурова,
А.Н. Суворов, А.В. Соколов, В.Б. Васильев, И.С. Фрейдлин
«Роль аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes*
M49-16 в ингибировании пролиферации эндотелиальных клеток
человека линии EA.hy926» // Медицинская иммунология,
2016. Т. 18, № 6. С. 555-562.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-555-562

© Старикова Э.А. и соавт., 2016

For citation:

E.A. Starikova, A.B. Karaseva, L.A. Burova, A.N. Suvorov,
A.V. Sokolov, V.B. Vasilyev, I.S. Freidlin "A role of arginine
deiminase from *Streptococcus pyogenes* M49-16 in promoting
infection and inhibition of endothelial cell proliferation", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016,
Vol. 18, no. 6, pp. 555-562.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-555-562

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-6-555-562>

A ROLE OF ARGININE DEIMINASE FROM *STREPTOCOCCUS PYOGENES* M49-16 IN PROMOTING INFECTION AND INHIBITION OF ENDOTHELIAL CELL PROLIFERATION

Starikova E.A.^a, Karaseva A.B.^a, Burova L.A.^a, Suvorov A.N.^a, Sokolov A.V.^a, Vasilyev V.B.^a, Freidlin I.S.^{a, b}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Arginine deiminase is a bacterial enzyme that hydrolyses arginine with citrulline and ammonia formation. In recent years, increasing evidence is reported about *in vitro* and *in vivo* anti-angiogenic action of arginine deiminase from *Mycoplasma spp.* Our studies have shown that arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22 exerts similar effects, i.e., inhibits proliferation and other endothelial cell functions related to angiogenesis. To confirm a leading role of arginine deiminase, as a factor responsible for the anti-proliferative effect, we have constructed an isogenic *S. pyogenes* M49-16 mutant unable to express arginine deiminase. A comparative analysis of anti-proliferative activity of original *S. pyogenes* M49-16 strain and its isogenic mutant with arginine deiminase gene deletion (M49-16delAD) was performed, using an endothelial EA.hy926 cell line. The bacterial supernatantes obtained by sonication of *S. pyogenes* M49-16 and M49-16delAD were tested. The ability of *S. pyogenes* M49-16 and M49-16delAD supernatantes to hydrolyze arginine was assessed. Moreover, we compared effects of the *Streptococcus* supernatantes upon proliferative activity of endothelial cells and their distribution through the cell cycle phases.

Supernatantes from original *S. pyogenes* 49-16 strain were shown to inhibit endothelial cell proliferation to a significant degree (down to 50% of controls). This effect was due to its arginine hydrolyzing activity, i. e. addition of exogenous arginine to the medium resulted into recovery of the cell proliferation levels. The supernatante from *S. pyogenes* M49-16delAD showed a lower ability to hydrolyze arginine as compared to the supernatante of original strain. Culturing of endothelial cells supplied with *S. pyogenes* M49-16delAD supernatantes resulted into reduction of their proliferative activity by 10% of control values. Analysis of the cell cycle distribution was concordant with these results. *S. pyogenes* M49-16 supernatante caused a decrease in S-phase cell fraction by 20% against controls. With a supernatants from *S. pyogenes* M49-16delAD, such drop in DNA-synthesizing cell ratio was significantly weaker (by only 5% of the control). These results reveal new pathogenetic mechanisms of endothelial dysfunction during streptococcal infection and suggest anti-angiogenic potential of streptococcal arginine deiminase.

Keywords: *S. pyogenes*, arginine deiminase, endothelial cells, arginine, proliferation

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-00150.

Введение

Многие патогенные микроорганизмы используют метаболические пути аргинина организма-хозяина в качестве стратегии выживания [8]. Одним из бактериальных ферментов, катализирующих гидролиз аргинина, является аргининдеими́наза (АД) [23]. АД защищает микроорганизмы от кислой среды в очаге инфекции и в фаголизосомах благодаря продукции NH₃ [6]. Очевидно, что фермент может нарушать функциональную активность клеток организма-хозяина за счет деплеции аргинина и его метаболитов. Многочисленные исследования показывают, что АД, выделенная из разных микроорганизмов, подавляет пролиферацию клеток млекопитающих *in vitro*. В частности, установлено, что АД подавляет пролиферацию трансформированных

клеток и оказывает противоопухолевое действие *in vivo* с минимальными побочными эффектами [12, 15]. Предполагают, что подавление роста опухолевых клеток происходит благодаря аминокислотному голоданию из-за деплеции аргинина и/или созданию дефицита метаболитов этой аминокислоты, таких как NO и полиамины [14, 16]. Однако противоопухолевое действие фермента может быть обусловлено также его антиангиогенной активностью. Было показано, что АД *Mycoplasma sp.* (нативный и рекомбинантный белок) снижает пролиферативную, миграционную способность эндотелиальных клеток, а также формирование капилляроподобных структур *in vitro* и *in vivo* [3, 16]. В литературе обсуждаются возможные механизмы антиангиогенного действия АД, среди которых выделяют аминокислотное голодание. Не исключается также роль дефицита метаболитов аргинина (NO и полиаминов), который возникает вследствие деплеции этой аминокислоты [16]. Вопрос о влиянии АД

на продукцию NO остается дискуссионным. Существуют данные указывающие на важную роль NO в регуляции пролиферации эндотелиальных клеток. В то же время показано, что дефицит аргинина, в том числе вызванный активностью АД, не влияет на способность эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) генерировать NO [7]. Доказано, что дефицит полиаминов, которые играют важную роль в процессах трансляции, транскрипции и пролиферации всех эукариотических клеток, может приводить к подавлению их пролиферативной активности. Не исключено, что обнаруженное антиангиогенное действие фермента может быть связано с токсичностью аммиака, который генерирует АД [16]. Таким образом, точные механизмы, лежащие в основе антиангиогенного действия АД, остаются невыясненными и требуют дальнейшего изучения.

В наших исследованиях по изучению влияния внутриклеточных компонентов *Streptococcus pyogenes* тип M22, штамм AL168 на функции эндотелиальных клеток было обнаружено, что супернатант разрушенных ультразвуком стрептококков (СРС) подавлял пролиферацию, миграцию, адгезию и метаболизм этих клеток [2]. Пролиферативная активность клеток восстанавливалась при добавлении в культуру экзогенного аргинина, что свидетельствовало об аргинин-деградирующей активности СРС. Биохимическая характеристика компонента в составе СРС, ответственного за обнаруженные эффекты, показала, что активным веществом является АД [18]. Чтобы подтвердить полученные ранее данные о роли АД *S. pyogenes* в подавлении пролиферации эндотелиальных клеток, в ходе данной работы был сконструирован изогенный мутант штамма – *S. pyogenes* M49-16, неспособный экспрессировать АД, и был проведен сравнительный анализ антипролиферативной активности исходного штамма СРС *S. pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с делецией гена АД (M49-16delAD).

Материалы и методы

Культура клеток

Эндотелиальные клетки линии EA.hy 926 были любезно предоставлены д-ром Cora-Jean S. Edgell (Университет Северная Каролина, США). Линия воспроизводит основные фенотипические и функциональные характеристики эндотелиальных клеток макрососудов человека [11]. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров, НАТ (все – Sigma), 4 mM L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицин (Биолот). Пересев производили дважды в неделю. Дезинтеграцию монослоя клеток вызывали инкубацией в растворе Версена (Биолот).

Получение изогенного мутанта по гену аргининдеиминазы

Для создания штамма, неспособного синтезировать АД, участок гена, кодирующий центральную часть гена аргининдеиминазы штамма серотипа M49, был проклонирован в интегративную плазмиду pT7ermB. Для этих целей участок sagp49 амплифицировали с использованием ДНК праймеров 3' GGAGGATCCGTTGTTTGATGA 5' и 3' CGAGTGAATCCATTACGGTCA 5' со встроенными сайтами гидролиза BamHI и EcoRI. Продукт амплификации клонировали в интегративный вектор pT7ermB, предварительно также гидролизованный эндонуклеазами BamHI и EcoRI. Полученным после лигирования препаратом трансформировали штамм *E. coli* JM109 и клоны с плазмидой отбирали при выращивании на чашках Петри с эритромицином 500 мкг/мл. Рекомбинантные клоны *E. coli* тестировали на наличие плазмиды pT7ermB – АД с фрагментом гена АД размером 538 н.п. Из клонов с нужной вставкой выделяли плазмидную ДНК, которую и использовали для трансформации стрептококков.

Электропорацию стрептококков осуществляли в аппарате компании BioRad – Gene-Pulser (USA) в кюветах с расстоянием между электродами 1 мм. Электропорацию осуществляли на культуре стрептококков, четырехкратно отмытой 10% глицеролом, в поздней логарифмической фазе роста. После электропорации стрептококки с интегративной плазмидой pT7ermB – АД, неспособной реплицироваться автономно в стрептококках и предназначенной для интеграции в область гена АД, инкубировались 2 часа при 37 °C, а затем высевались на агар с 2,5 мкг/мл эритромицина. Клоны стрептококков, устойчивые к антибиотику, проверялись на наличие искомым конструкции в геноме с использованием ПЦР и последующего секвенирования.

Получение супернатантов разрушенных ультразвуком *S. pyogenes*

СРС, содержащие биологически активные внутриклеточные компоненты, были приготовлены из культур бактериальных клеток *S. pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с делецией гена АД M49-16delAD. Стрептококки выращивали в течение 18-20 часов при 37 °C в среде Todd-Hewitt (Difco) в аэробных условиях, осаждали центрифугированием и производили двукратную отмывку PBS (150 mM NaCl, 10 mM Na-фосфатный буфер, pH 7,4), не содержащим липополисахарида. Концентрацию суспензии бактериальных клеток стандартизировали по оптической плотности и довели до 2,5-5 × 10⁸ КОЕ/мл. Ультразвуковая дезинтеграция стрептококков проводилась в объеме 5 мл взвеси бактерии в PBS при pH 7,4

в течение 5 мин, при частоте 22 kHz и мощности 0,6–0,8 мА дезинтегратора (MSE). Полноту разрушения бактериальных клеток контролировали микроскопически, после чего суспензию центрифугировали при 1600 g 30 мин. Полученный супернатант подвергали стерилизации с использованием фильтров Filtropure S с размером пор 0,45 мкм (Sarstedt) и хранили при -20 °С. Используемые концентрации бактериальных компонентов не оказывали токсического действия на культуры клеток.

Определение ферментативной активности АД в супернатантах разрушенных *S. pyogenes*

Метод определения активности АД основан на измерении уменьшения концентрации аргинина в среде, который определяют по окрашенному в желтый цвет продукту реакции аргинина с тимолом и гипобромитом натрия в щелочной среде. Образующийся в АД-реакции аммоний помимо ослабления желтой окраски, характерной для аргинина, давал индофенольную реакцию – голубое окрашивание [18]. Для анализа к 100 мкл раствора 5 мМ аргинин гидрохлорида в 50 мМ Na-фосфатном буфере (рН 6,8) добавляли испытуемую на активность пробу – 2,5, 5 и 10 мкл, инкубировали в течение 30 минут при 37 °С и останавливали реакцию добавлением 50 мкл 100 мМ тимолом и 100 мкл 40 мМ гипобромита натрия, растворенных в 2 М NaOH. Реакцию проводили в 96-луночных микропланшетах и регистрировали оптическую плотность на планшетном спектрофотометре при 450 нм. Для каждого эксперимента строили калибровочный график зависимости поглощения при 450 нм от концентрации аргинина (диапазон 0,25–5 мМ). Активность выражали в мкмоль аргинина, утилизированного ферментом за 1 минуту, с учетом доли вносимой в реакцию пробы от общего объема.

Анализ пролиферативной активности эндотелиальных клеток

Для оценки пролиферативной активности клетки вносили в 96-луночные плоскодонные планшеты (Sarstedt) в концентрации 5 тыс. в 100 мкл полной культуральной среды и инкубировали 72 ч в присутствии исследуемых веществ при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂. По окончании инкубации клетки окрашивали 0,2% раствором кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich) на 10% метаноле. Избыток красителя удаляли пятикратной отмывкой деионизированной водой. Краситель экстрагировали 10% уксусной кислотой и измеряли оптическую плотность на планшетном спектрофотометре (Bio-Rad Laboratories) при длине волны 570 нм.

Анализ распределения эндотелиальных клеток по фазам клеточного цикла

Клетки вносили в лунки плоскодонного 6-ти луночного планшета (Sarstedt) в концентрации 500–600 тыс. клеток на 1 мл культуральной среды и инкубировали в присутствии исследуемых веществ. Через 24 часа клетки переносили в микропробирки и производили фиксацию/пермеабиллизацию 95% ледяным метанолом в течение 5 минут. После чего проводили окрашивание клеточной суспензии антителами против циклина A2, конъюгированными с FITC (Beckman Coulter). В каждую пробирку вносили 2 мкг/мл пропидия иодида (Sigma-Aldrich), 100 мкг/мл рибонуклеазы А (Sigma-Aldrich) и проводили инкубацию 20 мин при комнатной температуре в темноте. Образцы анализировали с использованием точного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter).

Статистическую обработку данных производили с использованием t-критерия Стьюдента, программы STATISTICA 6.0.

Результаты

Сравнение активности АД в составе СРС М49-16 и изогенного мутанта М49-16delAD показало, что способность гидролизовать аргинин у СРС М49-16delAD (0,4±0,1 мкмоль аргинина за минуту) составляет лишь 4% от активности СРС М49-16 (10,2±0,2 мкмоль аргинина за минуту).

Эксперименты по изучению пролиферативной активности СРС показали, что во всех исследуемых разведениях (1/100, 1/50 и 1/25) СРС М49-16 вызывал достоверное двукратное уменьшение пролиферации эндотелиальных клеток (табл. 1). Пролиферация клеток в присутствии СРС М49-16delAD в разведении 1/100 не отличалась от пролиферации клеток в контроле, тогда как в разведениях 1/50 и 1/25 снижение пролиферативной активности эндотелиальных клеток было достоверным, но не превышало 10% от контроля. Антипролиферативное действие СРС М49-16 было достоверно сильнее, чем антипролиферативное действие СРС М49-16delAD.

Внесение в культуральную среду экзогенного аргинина в концентрации 2 мМ не оказывало влияния на пролиферацию клеток, а в концентрации 4 мМ приводило к достоверному снижению пролиферации на 20% (табл. 2). Это подтверждает данные других исследователей о том, что сам аргинин в высоких концентрациях может оказывать антипролиферативное действие на клетки [9]. При добавлении 4 мМ аргинина пролиферация эндотелиальных клеток, подавленная под влиянием СРС М49-16 до 50% от контроля, повы-

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СРС *S. PYOGENES* M49-16 И M49-16delAD НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ EA.hy926

Инкубация клеток в присутствии	Интенсивность пролиферации, % (M±m, n = 18) при разведении СРС			
	0	1/100	1/50	1/25
M49-16	100,0	52,1±3,26***	47,8±1,88***	48,4±0,58***
M49-16delAD	100,0	100,3±2,50###	91,4±2,00** ###	88,7±3,21** ###

Примечание. * – пролиферация клеток достоверно ниже в присутствии СРС по сравнению с пролиферацией клеток в контроле (** – при $p < 0,01$; *** – при $p < 0,001$);
– пролиферация клеток в присутствии СРС M49-16 достоверно ниже по сравнению с пролиферацией клеток в присутствии СРС M49-16delAD (### – при $p < 0,001$).

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО АРГИНИНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК EA.hy926 В ПРИСУТСТВИИ СРС *S. PYOGENES* M49-16 И M49-16delAD

Инкубация клеток в присутствии	Интенсивность пролиферации, % (M±m, n = 18)		
	без аргинина	2 мМ аргинина	4 мМ аргинина
культуральной среды	100,0±1,12	95,9±2,17	77,4±5,93###
СРС M49-16 1/50	50,8±3,90***	68,8±3,16##	75,3±2,04###
СРС M49-16delAD 1/50	86,0±1,66***	90,4±0,97#	83,9±1,13

Примечание. * – пролиферация клеток в присутствии СРС достоверно ниже по сравнению с пролиферацией клеток без СРС в тех же условиях (** – при $p < 0,01$; *** – при $p < 0,001$);
– пролиферация клеток достоверно выше в присутствии аргинина по сравнению с пролиферацией клеток в тех же условиях, но без аргинина (### – при $p < 0,001$; ## – при $p < 0,01$; # – при $p < 0,05$).

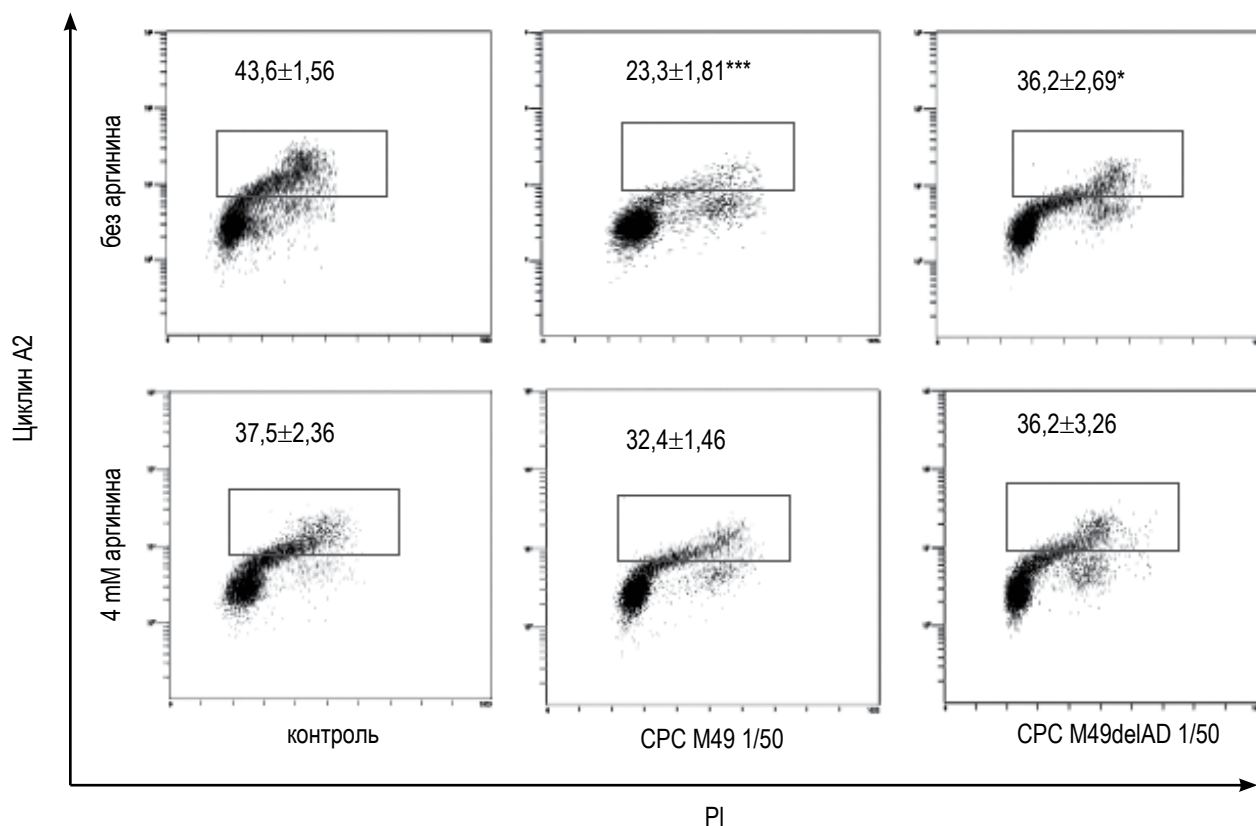


Рисунок 1. Влияние экзогенного аргинина на распределение эндотелиальных клеток EA.hy926 по фазам клеточного цикла в присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16 и M49-16delAD

Примечание. * – пролиферация клеток достоверно ниже в присутствии СРС по сравнению с пролиферацией клеток в контроле (** – при $p < 0,01$; *** – при $p < 0,001$); * – при $p < 0,05$).

шалась до 70%, а в концентрации 4 мМ аргинин повышал пролиферативную активность клеток до ее уровня в контроле. Внесение в культуральную среду, содержащую M49-16delAD, экзогенного аргинина также приводило к повышению пролиферации эндотелиальных клеток. Однако достоверным эффект был только при концентрации аргинина 2мМ.

Данные о влиянии СРС M49-16 и СРС M49-16delAD на пролиферативную активность эндотелиальных клеток, полученные с помощью спектрофотометрического метода, были подтверждены результатами анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла. Культивирование в присутствии СРС M49-16 приводило к достоверному (на 20% по сравнению с контролем) снижению доли клеток в фазах синтеза G₂/S. СРС M49-16delAD также достоверно снижал долю клеток в фазах синтеза (на 5% по сравнению с контролем), однако эффект был достоверно слабее, чем антипролиферативное действие СРС M49-16 (рис. 1). При внесении в культуральную среду экзогенного аргинина доля клеток в фазах синтеза G₂/S возрастала до уровня контроля.

Обсуждение

Большинство исследований АД *S. pyogenes* посвящено изучению антипролиферативного действия фермента в отношении опухолевых клеток. В 1985 г. Yoshida J. и соавторами был выделен и охарактеризован streptococcal acidic glycoprotein (SAGP) в составе экстракта клеток *Streptococcus hemolyticus* Su, подавляющий пролиферацию разных типов эукариотических клеток [20]. Позднее было показано, что SAGP обладает аргинингидролизующей активностью и имеет высокую степень гомологии с аргининдеиминазами, выделенными из других бактерий [9]. Была доказана способность фермента, подавлять пролиферацию мононуклеарных лейкоцитов периферической крови, клеток глиобластомы, клеток карциномы кожи A431 и др. [9, 13, 21]. В то же время действие АД из *S. pyogenes* в отношении эндотелиальных клеток остается недостаточно изученным.

Известно, что при стрептококковой инфекции в участке воспаления возникают поражения сосудов. Это выражается в нарушении процесса коагуляции, снижении адгезивности эндотелиальных клеток и повышении проницаемости эндотелиального барьера [1]. Описанные эффекты связывают с индукцией экспрессии на эндотелиальных клетках тканевого фактора и активацией матриксных металлопротеаз [4, 5, 19]. Эндотелиальные клетки экспрессирует eNOS и аргиназу – ферменты, субстратом для которых является аргинин, поэтому метаболиты аргинина играют

важную роль в регуляции функций эндотелия сосудов. NO, генерируемый eNOS, аутокринно регулирует тонус сосудов, ограничивает развитие воспаления и агрегацию тромбоцитов [7]. Цитозольная и митохондриальная аргиназы эндотелиальных клеток осуществляют синтез необходимых для пролиферации и ремоделирования сосудов полиаминов и пролина [10]. Исходя из этого, можно предположить, что дефицит аргинина, вызванный активностью стрептококковой АД, может способствовать развитию эндотелиальной дисфункции.

Ранее нами была выделена и охарактеризована АД *S. pyogenes*, тип M22, штамм AL168 и показана способность фермента подавлять пролиферацию эндотелиальных клеток. В ходе настоящего исследования для доказательства ведущей роли АД в подавлении пролиферативной активности этих клеток был сконструирован изогенный мутант, не способный экспрессировать АД, и изучена его аргинингидролизующая и антипролиферативная активность. Проведенные исследования показали, что суператант разрушенных *S. pyogenes* M49-16 исходного штамма обладал аргинингидролизующей активностью и оказывал достоверное антипролиферативное действие на эндотелиальные клетки. Этот эффект был связан с деплецией аргинина в культуральной среде, т.к. при добавлении экзогенного аргинина пролиферативная активность клеток восстанавливалась до уровня контроля. СРС M49-16delAD с делецией гена АД обладал значительно сниженной по сравнению с СРС M49-16 способностью гидролизовать аргинин и подавлять пролиферацию эндотелиальных клеток (табл. 1). Однако, если дефицит аргинина, вызванный активностью СРС, компенсировали добавлением аргинина, то пролиферация эндотелиальных клеток восстанавливалась до уровня пролиферации клеток в контроле не только в случае СРС M49-16, но также в случае СРС M49-16delAD. Это может быть связано с тем, что стрептококки экспрессируют и другие (кроме АД) метаболизирующие аргинин ферменты, низкая активность которых обнаруживается в СРС M49-16delAD.

В данной работе с использованием СРС M49-16 и СРС мутанта M49-16delAD, не способного синтезировать АД, были получены дополнительные доказательства того, что антипролиферативное действие СРС в отношении эндотелиальных клеток обусловлено аргинин-гидролизующей активностью АД. Эндотелий сосудов играет важную роль в регуляции процесса воспаления и иммунного ответа. В период острой фазы воспаления быстрый рост сосудов обеспечивает поддержание необходимого уровня метаболизма

в тканях, поступление медиаторов воспаления, а также миграцию лейкоцитов. Пролиферация эндотелиальных клеток и формирование новых сосудов сопровождается регенерацию тканей в участке альтерации. Дизрегуляция этих процессов, вызванная эндотелиальной дисфункцией, может служить дополнительным патогенетическим фактором, усугубляющим тяжесть инфек-

ционного процесса, и способствовать его переходу в хроническую форму. Результаты данного исследования раскрывают новые патогенетические механизмы эндотелиальной дисфункции при стрептококковой инфекции и позволяют предположить, что противоопухолевые эффекты АД частично связаны с антиангиогенными свойствами этого фермента.

Список литературы / References

1. Киселев П.Н. Токсикология инфекционных процессов. Л.: Медицина, 1971. 359 с. [Kiselev P.N. Infectious processes toxicology]. Leningrad: Medicine, 1971. 359 p.
2. Старикова Э.А., Лебедева А.М., Бурова Л.А., Фрейдлин И.С. Изменения функциональной активности эндотелиальных клеток под влиянием лизата *Streptococcus pyogenes* // Цитология, 2012. Т. 54, № 1. С. 49-57. [Starikova E.A., Lebedeva A.M., Burova L.A., Freidlin I.S. Regulation of endothelial cells functions by ultrasonic supernatant of *Streptococcus pyogenes*. *Tsitologiya = Citology*, 2012, Vol. 54, no. 1, pp. 49-57. (In Russ.)]
3. Beloussow K., Wang L., Wu J., Ann D., Shen W.C. Recombinant arginine deiminase as a potential antiangiogenic agent. *Cancer Lett.*, 2002, Vol. 183, no. 2, pp. 155-162.
4. Burns E., Marsiel A., Musser J. Activation of a 66-Kilodalton human endothelial cell matrix metalloprotease by *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease. *Infection and Immunity*, 1996, Vol. 64, pp. 4744-4750.
5. Bryant A.E. Biology and pathogenesis of thrombosis and procoagulant activity in invasive infections caused by group A streptococci and *Clostridium perfringens*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2003, Vol. 16, no. 3, pp. 451-462.
6. Casiano-Colon A., Marquis R.E. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, Vol. 54, no. 6, pp. 1318-1324.
7. Chen F., Lucas R., Fulton D. The subcellular compartmentalization of arginine metabolizing enzymes and their role in endothelial dysfunction. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, p. 184.
8. Das P., Lahiri A., Lahiri A., Chakravorty D. Modulation of the Arginase Pathway in the Context of Microbial Pathogenesis: A Metabolic Enzyme Moonlighting as an Immune Modulator. *PLoS Pathog.*, 2010, Vol. 6, no. 6, e1000899.
9. Degnan B.A., Palmer J.M., Robson T., Jones C.E., Fischer M., Glanville M., Mellor G.D., Diamond A.G., Kehoe M.A., Goodacre J.A. Inhibition of human peripheral blood mononuclear cell proliferation by *Streptococcus pyogenes* cell extract is associated with arginine deiminase activity. *Infect. Immun.*, 1998, Vol. 66, no. 7, pp. 3050-3058.
10. Durante W. Role of arginase in vessel wall remodeling. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, p. 111.
11. Edgell C.-J.S., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Nati. Acad. Sci. USA*, 1983, Vol. 80, no. 12, pp. 3734-3737.
12. Feun L.G., Kuo M.T., Savaraj N. Arginine deprivation in cancer therapy. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2015, Vol. 18, no. 1, pp. 78-82.
13. Fiedler T., Strauss M., Hering S., Redanz U., William D., Rosche Y., Classen C.F., Kreikemeyer B., Linnebacher M., Maletzki C. Arginine deprivation by arginine deiminase of *Streptococcus pyogenes* controls primary glioblastoma growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biol. Ther.*, 2015, Vol. 16, no. 7, pp. 1047-1055.
14. Kim R.H., Bold R.J., Kung H.J. ADI, autophagy and apoptosis: metabolic stress as a therapeutic option for prostate cancer. *Autophagy*, 2009, Vol. 5, no. 4, pp. 567-568.
15. Kuo M.T., Savaraj N., Feun L.G. Targeted cellular metabolism for cancer chemotherapy with recombinant arginine-degrading enzymes. *LG.Oncotarget.*, 2010, Vol. 1, no. 4, pp. 246-251.
16. Park I.-S., Kang S.-W., Shin Y.-J., Chae K.-Y., Park M.-O., Kim M.-Y., Wheatley D.N., Min B.-H. Arginine deiminase: a potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *British Journal of Cancer*, 2003, Vol. 89, pp. 907-914.
17. Shen L.J., Lin W.C., Beloussow K., Hosoya K., Terasaki T., Ann D.K., Shen W.C. Recombinant arginine deiminase as a differential modulator of inducible (iNOS) and endothelial (eNOS) nitric oxide synthetase activity in cultured endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2003, Vol. 66, no. 10, pp. 1945-1952.
18. Starikova E.A., Sokolov A.V., Vlasenko A.Y., Burova L.A., Freidlin I.S., Vasilyev V.B. Biochemical and biological activity of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22. *Biochem. Cell Biol.*, 2016, Vol. 94, no. 2, pp. 129-137.
19. Stockbauer K.E., Magoun L., Liu M., Burns E.H., Gubba S., Renish S., Pan X., Bodary S.C., Baker E., Coburn J., Leong J.M., Musser J.M. A natural variant of the cysteine protease virulence factor of group A *Streptococcus* with an arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif preferentially binds human integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha I I b\beta 3$. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, Vol. 96, pp. 242-247.

20. Yoshida J., Yoshimura M., Takamura S., Kobayashi S. Purification and characterization of an antitumor principle from *Streptococcus hemolyticus*, Su strain. *Jpn. J. Cancer. Res.*, 1985, Vol. 76, no. 3, pp. 213-223.
21. Yoshida J., Ishibashi T., Nishio M. Growth-inhibitory effect of a streptococcal antitumor glycoprotein on human epidermoid carcinoma A431 cells: involvement of dephosphorylation of epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.*, 2001, Vol. 61, no. 16, pp. 6151-6157.
22. Zhuo W., Song X., Zhou H., Luo Y. Arginine deiminase modulates endothelial tip cells via excessive synthesis of reactive oxygen species. *Biochem. Soc. Trans.*, 2011, Vol. 5, pp. 1376-1381.
23. Zuniga M., Perez G., Gonzalez-Candelas F. Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2002, Vol. 2, no. 3, pp. 429-444.

Авторы:

Старикова Э.А. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Карасева А.Б. — научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Бурова Л.А. — д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Суворов А.Н. — д.м.н., заведующий отделом молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Соколов А.В. — д.б.н., заведующий лабораторией, отдел молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Васильев В.Б. — д.м.н., заведующий отделом молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Фрейдлин И.С. — д.м.н., член-корр. РАН, главный научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Starikova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Karaseva A.B., Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Burova L.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Suvorov A.N., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Sokolov A.V., PhD, MD (Biology), Head of Laboratory, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Vasilyev V.B., PhD, MD (Medicine), Chief, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Freidlin I.S., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Main Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 04.07.2016

Отправлена на доработку 29.08.2016

Принята к печати 31.08.2016

Received 04.07.2016

Revision received 29.08.2016

Accepted 31.08.2016