

ВЛИЯНИЕ СТРЕПТОКОККОВОЙ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ CD4⁺ И CD8⁺ ПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Старикова Э.А.^{1, 2, 3}, Маммедова Дж.Т.¹, Ожиганова А.¹,
Лебедева А.М.¹, Левешко Т.А.¹, Бурова Л.А.¹, Кудрявцев И.В.^{1, 2}

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

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

³ Институт медицинского образования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Метаболизм аргинина играет важную роль в регуляции функций клеток иммунной системы у млекопитающих. Патогенные микробы используют механизм истощения аргинина для подавления иммунного ответа при инфекции. Аргининдеиминаза — микробный аргинин-гидролизующий фермент, необходимый для выживания при низком рН в очаге инфекции или внутри фаголизосом, а также в условиях низкого содержания глюкозы. Влияние бактериальной аргининдеиминазы на функции клеток адаптивного иммунного ответа остается слабо изученным. Цель исследования состояла в изучении влияния стрептококковой аргининдеиминазы на пролиферацию и аутофагию CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-лимфоцитов периферической крови человека.

Действие фермента на клетки изучали с использованием супернатантов разрушенных ультразвуком *Streptococcus pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с инактивированным геном *arcA* (*Streptococcus pyogenes* M49-16 Δ arcA). Исследование проводили с использованием крови здоровых доноров. Фракцию мононуклеарных лейкоцитов выделяли путем центрифугирования на градиенте плотности Фиколла. Для оценки пролиферации использовали метод, основанный на окрашивании внутриклеточных белков прижизненным флуоресцентным красителем carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). Исследование уровня аутофагии в клетках проводили с использованием флуоресцентного красителя Lysotracker Green DND-26. Для анализа пролиферации и аутофагии Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁻) клеточные суспензии, окрашивали антителами против CD4, CD45RA, и CD3. Долю клеток в состоянии некроза определяли путем их окрашивания флуо-

Адрес для переписки:

Старикова Элеонора Александровна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-68-68.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Address for correspondence:

Eleonora A. Starikova
Institute of Experimental Medicine
12 Acad. Pavlov St
St. Petersburg
197376 Russian Federation
Phone: +7 (812) 234-68-68.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Образец цитирования:

Э.А. Старикова, Дж.Т. Маммедова, А. Ожиганова,
А.М. Лебедева, Т.А. Левешко, Л.А. Бурова,
И.В. Кудрявцев «Влияние стрептококковой
аргининдеиминазы на функциональную активность
CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-лимфоцитов периферической
крови человека» // Медицинская иммунология, 2024.
Т. 26, № 3. С. 503-512.
doi: 10.15789/1563-0625-EOS-2910

© Старикова Э.А. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Starikova, J.T. Mammedova, A. Ozhiganova,
A.M. Lebedeva, T.A. Leveshko, L.A. Burova, I.V. Kudryavtsev
“Effect of streptococcal arginine deiminase on the function
of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 3,
pp. 503-512.
doi: 10.15789/1563-0625-EOS-2910

© Starikova E.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOS-2910

ресцентным ДНК-связывающим красителем DAPI. Нормальность распределения оценивали тестом Шапиро–Уилка. Данные были проанализированы с использованием критерия Краскела–Уоллиса с последующим применением критерия Манна–Уитни для попарных сравнений и выражены в виде медианы и межквартильных диапазонов ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$).

Сравнение эффектов супернатантов разрушенных стрептококков исходного и мутантного штаммов, которые отличались по экспрессии одного гена аргининдеиминазы, показало, что бактериальный фермент не оказывал влияния на функции неактивированных лимфоцитов. Однако стрептококковая аргининдеиминаза полностью подавляла стимулированную anti-CD2/CD3/CD28 антителами пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов. Эти эффекты сопровождалось снижением в клетках уровня аутофагии. В то же время аргининдеиминаза не обладала цитотоксическими эффектами в отношении лимфоцитов. Введение супрафизиологических концентраций L-аргинина исследуемые восстанавливало клеточные функции. Различий между исследуемыми параметрами CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-лимфоцитов выявлено не было.

Полученные данные показывают, что антипролиферативное действие аргининдеиминазы может быть связано со способностью фермента ингибировать аутофагию и доказывают способность бактериального фермента подавлять адаптивные иммунные реакции организма-хозяина.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, аргининдеиминаза, *Streptococcus pyogenes*, аргинин, пролиферация, аутофагия

EFFECT OF STREPTOCOCCAL ARGININE DEIMINASE ON THE FUNCTION OF CD4⁺ AND CD8⁺T LYMPHOCYTES

Starikova E.A.^{a, b, c}, Mammedova J.T.^a, Ozhiganova A.^a, Lebedeva A.M.^a, Leveshko T.A.^a, Burova L.A.^a, Kudryavtsev I.V.^{a, b}

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

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

^c Institute of Medical Education, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Arginine metabolism plays an important role in regulating the functions of immune cells in mammals. Pathogenic microbes use the mechanism of arginine depletion to suppress the immune response during infection. Arginine deiminase is a microbial arginine-hydrolyzing enzyme important for survival at low pH in the focus of infection, or in phagolysosomes, as well as under low-glucose conditions. The effect of bacterial arginine deiminase on the functions of adaptive immune cells remains poorly understood. The aim of our study was to evaluate the effect of streptococcal arginine deiminase on the proliferation and autophagy of CD4⁺ and CD8⁺ human peripheral blood T lymphocytes.

The enzyme effects were studied with supernates of ultrasonic lysates from parental *Streptococcus pyogenes* M49-16, and its isogenic mutant with inactivated *arcA* gene (*Streptococcus pyogenes* M49-16delarcA). The study was performed with blood samples of healthy donors. The fraction of mononuclear leukocytes was isolated by centrifugation in a Ficoll density gradient. To evaluate proliferation levels, a method based on the staining of intracellular proteins with vital fluorescent dye carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) was used. The level of autophagy was studied using the fluorescent Lysotracker Green DND-26 dye. To analyze the proliferation and autophagy of T helper cells (CD3⁺CD4⁺) and cytotoxic T lymphocytes (CD3⁺CD4⁻), the obtained cell suspensions were stained with antibodies against CD4, CD45RA, and CD3. The proportion of necrotic cells was determined by staining with a fluorescent DNA-binding DAPI dye. The normality of the distribution was assessed by Shapiro–Wilk test. The data were analyzed using Kruskal–Wallis criterion, followed by Mann–Whitney criterion for pairwise comparisons and expressed as median and interquartile ranges ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$).

When comparing the effects of supernatants from the parental and mutant streptococcal strains, which differed in expression of arginine deiminase gene, we have shown that the bacterial enzyme had no effect on the functions of inactive lymphocytes. However, streptococcal arginine deiminase completely suppressed proliferation of CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes stimulated with anti-CD2/CD3/CD28 antibodies. These effects were accompanied by a decrease in the autophagy levels. At the same time, arginine deiminase did not

exert cytotoxic effects upon lymphocytes. L-arginine applied at the doses exceeding physiological levels caused restoration of the cellular functions. There were no differences between the studied parameters of CD4⁺ and CD8⁺T lymphocyte subsets.

The obtained data show that the antiproliferative effect of arginine demimnase may be associated with ability of the enzyme to inhibit autophagy and confirm an opportunity of the bacterial enzyme to suppress host adaptive immune responses.

Keywords: T lymphocytes, arginine deiminase, *Streptococcus pyogenes*, arginine, proliferation, autophagy

Список сокращений

АДИ — аргининдеиминаза; СРС — супернатант разрушенных стрептококков; CD — cluster of differentiation, кластер дифференцировки; CFSE — carboxyfluorescein succinimidyl ester; DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole, 4', 6-диамидин-2-фенилиндол; IL — interleukin, интерлейкин.

Введение

Аргинин — условно незаменимая аминокислота, которая участвует в ключевых метаболических процессах детоксикации аммиака, действует как секретагог, поддерживает гомеостаз сосудов и цитотоксические функции макрофагов, в качестве субстрата для синтеза оксида азота [29]. Опубликовано большое количество данных, которые доказывают важную роль метаболизма этой аминокислоты в регуляции иммунных реакций [21, 26, 29] при физиологических иммунодефицитах [19], в ходе опухолевого роста [25] и инфекционных заболеваний [6, 8].

Многие патогенные микробы — *Salmonella typhimurium* [20], *Mycobacterium tuberculosis* [7], *Leishmania mexicana* [10] и *Schistosoma mansoni* [30], *Helicobacter pylori* [12] *Candida spp.* [11] используют механизм истощения аргинина с целью иммунной эвазии. Аргининдеиминаза (АДИ) — микробный аргинингидролизующий фермент, необходимый для выживания при низком pH в очаге инфекции или внутри фаголизосом, а также синтеза аденозинтрифосфата в условиях низкого содержания глюкозы [15]. Модификация конъюгированного с полиэтиленгликолем рекомбинантного белка активно исследуется как препарат для противоопухолевой терапии [14]. Относительно немного работ направлено на изучение влияния этого фермента на защитные иммунные реакции. Установлено, что *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) используют АДИ для подавления выработки оксида азота макрофагами хозяина [1, 3]. *S. pyogenes* с инактивированным геном АДИ имеют сниженную вирулентность [28]. Также известно, что АДИ подавляет пролиферацию разных типов трансформированных клеток [13, 17], а также индуцированную митогенами пролиферацию лейкоцитов периферической крови человека [4, 16, 27]. Также было установлено, что

действие АДИ на опухолевые клетки связано с их голоданием, в ходе которого происходит mTOR/S6 — опосредованная индукция аутофагии [18]. Механизмы регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов под действием АДИ остаются не изученными.

Целью данного исследования было изучение влияния стрептококковой АДИ на пролиферацию и аутофагию CD4- и CD8-популяции Т-лимфоцитов периферической крови человека.

Материалы и методы

Получение супернатантов разрушенных стрептококков

В работе использовали супернатанты разрушенных стрептококков (СРС) *Streptococcus pyogenes* штамм М49-16 и его изогенного мутанта М49-16delArcA с инактивированным геном аргининдеиминазы (штаммы любезно предоставлены зав. отд. молекулярной микробиологии, д.м.н. проф. Суворовым А.Н., ФБГНУ «ИЭМ»). Методики получения мутантного штамма *S. pyogenes* М49-16delArcA и приготовления СРС описаны ранее [28].

Выделение фракции мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека

Кровь здоровых доноров в возрасте от 20 до 50 лет была собрана в пробирки, содержащие антикоагулянт К₃EDTA. Исследование с участием людей было рассмотрено и одобрено Этическим комитетом ФБГНУ «Институт экспериментальной медицины», разрешение № 2/19 от 25 марта 2019 года. Выделение мононуклеарных лейкоцитов осуществляли методом осаждения клеток в градиенте фикола (ООО «БиолоТ», Россия) плотностью 1,077 г/мл. Жизнеспособность клеток определяли с помощью окраски 0,2%-ным раствором трипанового синего и последующим подсчетом живых и мертвых клеток в камере Горяева. Жизнеспособность клеток составляла не менее 98%. Клетки ресуспендировали и культивировали в среде RPMI-1640 (НПП «ПанЭко», Россия), содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Invitrogen, США), 2 mM глутамин (ООО «БиолоТ», Россия), 50 мкг/мл гентамицин (ООО «БиолоТ», Россия) и 50 мкМ β-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США). Кон-

центрацию клеток доводили до 1 млн/1 мл. Клетки культивировали при 37 °С во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂. В дальнейшем клеточную суспензию использовали для оценки влияния СРС на активацию, дифференцировку клеток и активность процессов аутофагии.

Изучение пролиферативной активности Т-клеток

Для оценки пролиферации использовали метод, основанный на окрашивании внутриклеточных белков прижизненным флуоресцентным красителем CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) (Sigma-Aldrich, США). Выделенные, как описано ранее, мононуклеарные лейкоциты периферической крови человека доводили до концентрации 1×10^6 клеток на мл физиологического раствора (ООО «БиолоТ», Россия) содержащего CFSE (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 0,5 мкг/мл и оставляли на 10 мин на водяной бане при 37 °С. После этого клетки дважды отмывали от красителя центрифугированием при 300g, 4 °С в течение 15 мин в холодном растворе Хенкса, содержащем 1% ЭТС (Sigma-Aldrich, США). Окрашенные CFSE клетки ресуспендировали в полной культуральной среде RPMI 1640 (ООО «БиолоТ», Россия), содержащий 10% ЭТС (Invitrogen, США), 50 мкг/мл гентамицина (ООО «БиолоТ», Россия), 2 мМ glutamina (ООО «БиолоТ», Россия) и 50 мМ β-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США). Клетки вносили в лунки 24-луночного планшета в концентрации 2 млн/мл. Для индукции пролиферации использовали T Cell Activation/Expansion Kit (Miltenyi Biotec Inc., GmbH, США), содержащий бусы, нагруженные anti-CD2/CD3/CD28 антителами, в соответствии с рекомендациями производителя. СРС исходного и мутантного штаммов вносили в разведении 1/200, в некоторые лунки добавляли L-аргинин в концентрации 2 мМ (Sigma-Aldrich, США). Клетки инкубировали в течение 96 часов, на 3-й день проводили частичную замену культуральной среды на свежую среду с добавками. После инкубации клетки переносили в пробирки для проточной цитометрии (Beckman Coulter, США). Далее, для анализа пролиферации Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁻), полученные клеточные суспензии, окрашивали антителами против: CD4, меченными APC (кат. № IM2468); CD45RA, меченными PC7 (кат. № B10821) CD3, меченными APC-Alexa 750 (кат. № A66329) (все — Beckman Coulter, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для анализа доли клеток в состоянии некроза проводили окрашивание образцов ДНК-связывающим красителем DAPI (Invitrogen, США) в концен-

трации 300 нМ. Здесь и далее, пробы анализировали на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США). Для анализа данных проточной цитометрии использовали FCS Express (De Novo Software, США) демоверсию. Результаты выражали как Индекс деления — параметр, отражающий среднее число делений, которым подверглась клетка исходной популяции.

Изучение аутофагии Т-клеток

Для исследования процессов аутофагии клетки активировали с использованием T Cell Activation/Expansion Kit (Miltenyi Biotec Inc., GmbH, США) и инкубировали с исследуемыми веществами, как описано выше, 48 либо 96 ч при 37 °С во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂. В последнем случае на третий день производили частичную замену культуральной среды с добавкой всех исследуемых компонентов. Для оценки интенсивности аутофагии Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁻) производили окрашивание клеточной суспензии коктейлем антител, как это было описано выше. Далее в пробы вносили краситель Lysotracker Green DND-26 (Invitrogen, США) в концентрации 50 нМ. Через 15 мин клетки отмывали центрифугированием в 1 мл фосфатно-солевого буфера 5 мин при 300 g и вносили 300 нМ красителя DAPI. Для анализа данных проточной цитометрии использовали Kaluza (Beckman Coulter Software, США). Позитивные по DAPI клетки в состоянии некроза исключали из анализа. Результаты измерения уровня аутофагии выражали в средних значениях интенсивности флуоресценции — MFI.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ и графическое представление были выполнены с использованием программного обеспечения Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., США), Microsoft Excel 2010 и Statistica 7.0, Kaluza Analysis и программное обеспечение Navios (Beckman Coulter, США). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро—Уилка и Колмогорова—Смирнова. Данные были проанализированы с использованием критерия Краскела—Уоллиса с последующим применением критерия Манна—Уитни для попарных сравнений и выражены в виде медианы и межквартильных диапазонов (Q_{0,25}–Q_{0,75}), по меньшей мере, из 8 измерений. Нулевая гипотеза была отвергнута при $p < 0,05$.

Результаты

Сравнение влияния СРС исходного и мутантного штаммов на пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-клеток

В контроле без стимуляции Индекс деления составил 3,1 (2,29–3,96) для CD4⁺, и 3,2 (2,11–

4.02) для CD8⁺Т-клеток. СРС исходного и мутантного штаммов, также как добавка аргинина не оказывали достоверного влияния на пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток (рис. 1). При активации клеток под действием бус, нагруженных anti-CD2/CD3/CD28 антителами, происходило достоверное повышение Индекса деления до 9,1 (6,88-14,53) для CD4⁺ и 13,6 (8,75-14,80) для CD8⁺Т-клеток в контроле. Индексы деления Т-клеток в присутствии СРС мутантного штамма не отличались от таковых в контроле и составляли 10,7 (8,24-15,40) для CD4⁺ и 11,1 (7,28-14,14) для CD8⁺Т-клеток. СРС исходного штамма полностью подавлял индуцированную антителами пролиферацию Т-клеток. В этих условиях Индекс пролиферации лимфоцитов фактически оставался на уровне нестимулированных клеток (2,2 (2,11-3,49) для CD4⁺ и 2,2 (2,11-3,45) для CD8⁺), а введение добавки аргинина достоверно повышало их пролиферативную активность. При этом добавка аргинина подавляла стимулированную нагруженными anti-CD2/CD3/CD28 антителами бусами пролиферацию CD8⁺ (9,5 (6,51-11,48)) Т-клеток в контроле. Во всех остальных случаях влияние добавки аргинина не было достоверным. Статистически значимых отличий интенсивности пролиферации CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток в разных условиях культивирования выявлено не было.

Сравнение влияния СРС исходного и мутантного штаммов на аутофагию CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-клеток

Усиление процессов аутофагии является необходимым условием активации и пролиферации Т-клеток [2]. В следующей серии экспериментов изучали влияние АДИ на процессы аутофагии. Уровень аутофагии в контроле без стимуляции для CD4⁺Т-лимфоцитов составил 3,0 (2,60-3,66) MFI через 48 часов и 3,1 (2,69-3,86) MFI через 96 часов. В этих условиях уровень аутофагии CD8⁺Т-лимфоцитов значительно не отличался и составлял 3,5 (3,04-3,95) MFI через 48 часов и 3,6 (2,94-4,22) MFI через 96 часов (рис. 2). Было установлено, что ни один из исследуемых факторов (ни СРС исходного, ни СРС мутантного штаммов, ни добавка аргинина) не изменяли уровень аутофагии Т-клеток (рис. 2). При активации под действием бус, нагруженных anti-CD2/CD3/CD28 антителами, в течение 48 часов происходило достоверное повышение уровня аутофагии как CD4⁺ (5,9 (4,53-7,67) MFI), так и CD8⁺ (5,6 (4,64-6,84) MFI) Т-клеток, которое сохранялось на протяжении всего срока наблюдения (96 часов). Значения аутофагии у клеток, которые культивировали в присутствии СРС исходного штамма, были ниже по сравнению с этим параметром в контроле и в присутствии СРС мутантного штамма. Однако достоверная разница наблюдалась только для CD8⁺Т-клеток на сроке 96 часов. Введение добавки аргинина приводило к достовер-

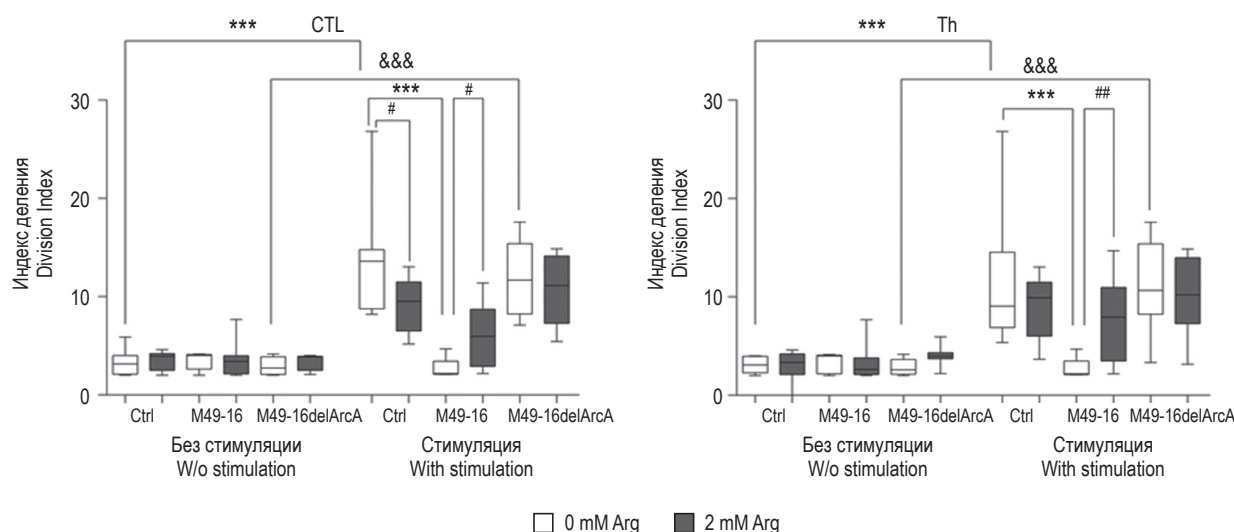


Рисунок 1. Сравнение влияния супернатантов разрушенных *Streptococcus pyogenes* исходного и мутантного штаммов на пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-клеток

Примечание. Данные представлены как Ме ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$), n = 8. Отличия статистически значимы: 3 символа – p < 0,001; 2 символа – p < 0,005; 1 символ – p < 0,05. CTL – CD8⁺Т-лимфоциты; Th – CD4⁺Т-лимфоциты; Arg – аргинин; ctrl – контроль.

Figure 1. Comparison of the effect of destroyed *Streptococcus pyogenes* supernatants of the parental and mutant strains on the CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets proliferation

Note. The data is presented as Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$), n = 8. The differences are statistically significant: 3 characters, p < 0.001; 2 character, p < 0.005; 1 character, p < 0.05. CTL, CD8⁺ T lymphocytes; Th, CD4⁺ T lymphocytes; Arg, arginine; ctrl, control.

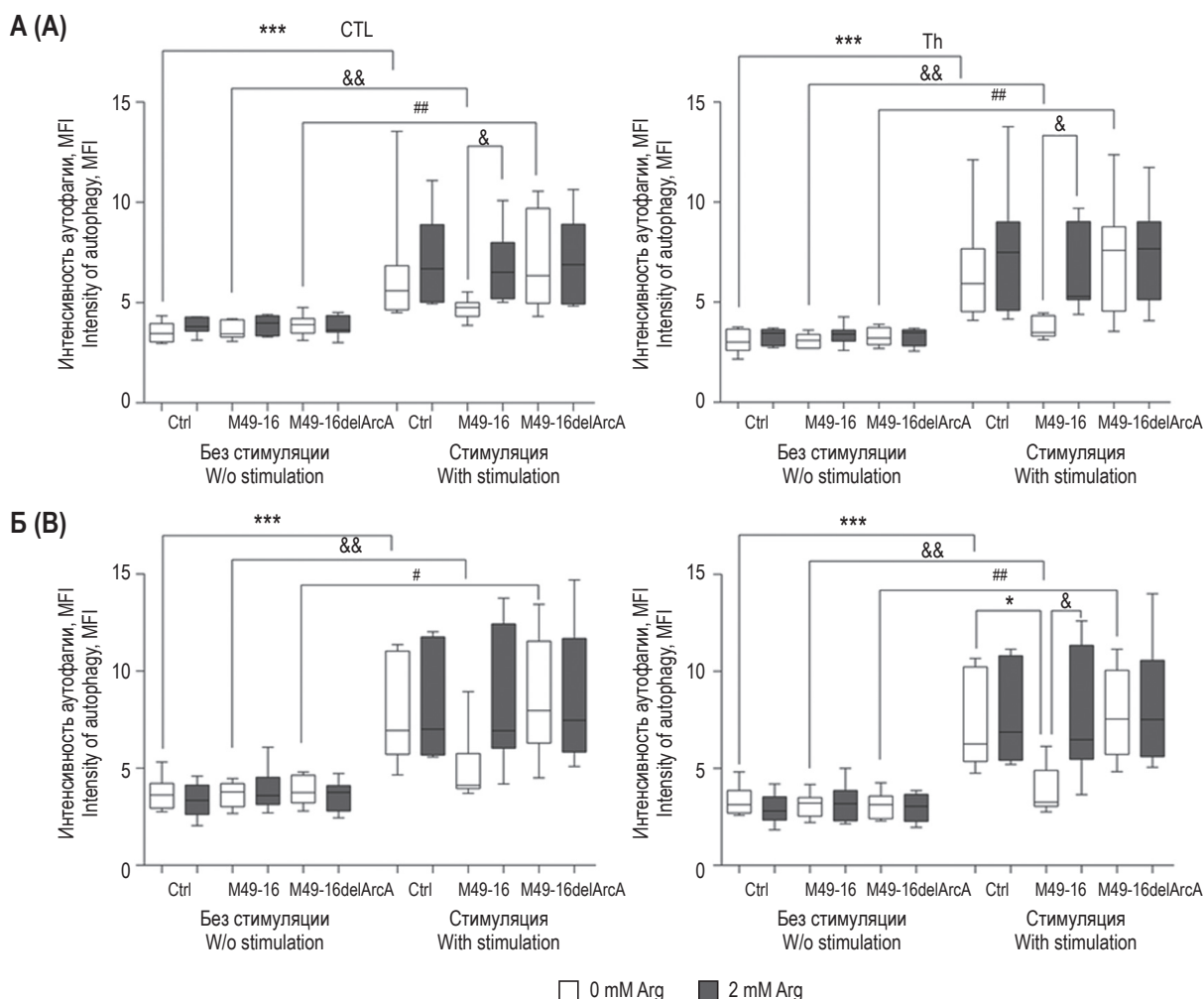


Рисунок 2. Сравнение влияния супернатантов разрушенных *Streptococcus pyogenes* исходного и мутантного штаммов на аутофагию CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-клеток (А) 48 часов инкубации; (Б) 96 часов инкубации

Примечание. См примечание к рисунку 1.

Figure 2. Comparison of the effect of destroyed *Streptococcus pyogenes* supernatants of the parental and mutant strains on the CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets autophagy. (A) 48 hours of incubation; (B) 96 hours of incubation

Note. As for Figure 1.

ному повышению аутофагии CD4⁺Т-клеток, подавленной под влиянием СРС исходного штамма на сроке 48 часов до 5,29 (5,13-9,03) MFI. Для CD8⁺Т-клеток достоверное повышение уровня аутофагии под действием добавки аргинина наблюдалось и на сроке 48 (6,52 (5,19-7,99) MFI) и сроке 96 часов (6,93 (6,04-12,4) MFI). Уровень аутофагии CD4⁺, так и CD8⁺Т-клеток в разных условиях культивирования значительно не отличался.

Сравнение влияния СРС исходного и мутантного штаммов на жизнеспособность Т-клеток

Принимая во внимание, обнаруженные ингибиторные эффекты АДИ в отношении лимфоцитов, в последующих экспериментах проверяли, не связано ли действие фермента с его токсическим действием на клетки. Для этого проводили оценку доли Т-клеток в состоянии некроза (DAPI-

позитивных) в разных условиях культивирования. Анализ данных показал, что после 48 часов культивирования доля клеток в состоянии некроза в стандартных условиях (контроль) составила (83,72 (80,32-87,97) %) (рис. 3). Культивирование клеток в присутствии СРС исходного и мутантного штаммов в течение 48 часов не оказывало влияния на их жизнеспособность. Более того, на сроке 96 часов в условиях без стимуляции в присутствии СРС исходного и мутантного штаммов происходило достоверное повышение жизнеспособности Т-клеток по сравнению с этим показателем в контроле. СРС не оказывали влияния на исследуемый показатель в отношении клеток стимулированных под действием бус, нагруженных anti-CD2/CD3/CD28 антителами. Стимуляция клеток с использованием бус, нагруженных

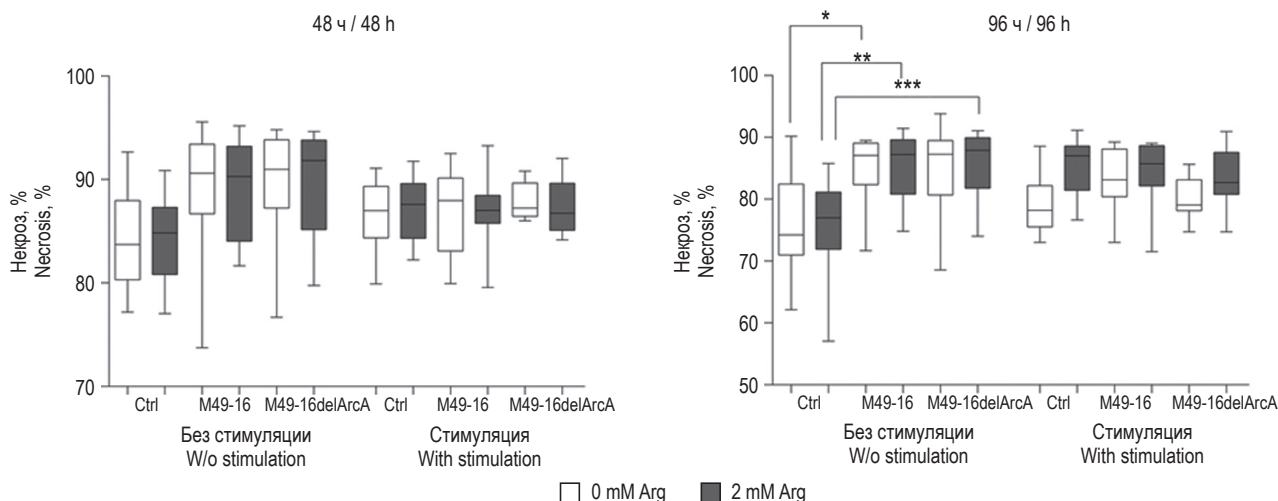


Рисунок 3. Сравнение влияния супернатантов разрушенных *Streptococcus pyogenes* исходного и мутантного штаммов на жизнеспособность Т-лимфоцитов

Примечание. Данные представлены как Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$), $n = 13$. Отличия статистически значимы: 3 символа – $p < 0,001$; 2 символа – $p < 0,005$; 1 символ – $p < 0,05$. Arg – аргинин; ctrl – контроль.

Figure 3. Comparison of the effect of destroyed *Streptococcus pyogenes* supernatants of the parental and mutant strains on the viability of T lymphocytes

Note. The data is presented as Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$), $n = 13$. The differences are statistically significant: 3 characters, $p < 0.001$; 2 characters, $p < 0.005$; 1 character, $p < 0.05$. Arg, arginine; ctrl, control.

anti-CD2/CD3/CD28 антителами, клеток также не оказывала влияния на их жизнеспособность.

Обсуждение

Сравнение эффектов СРС исходного и мутантного штаммов, которые отличаются по экспрессии гена *arcA*, позволяет заключить, что стрептококковая АДИ оказывает одинаковое антипролиферативное действие в отношении CD8⁺ и CD4⁺Т-клеток периферической крови человека, сопровождающееся снижением уровня аутофагии.

Полученные при изучении пролиферации результаты согласуются с ранее проведенными исследованиями, в которых было установлено, что экстракты клеток *S. pyogenes* типа M5 (штамм Manfredo) обладали мощным и дозозависимым ингибирующим действием на антиген, суперантиген или митоген-стимулированную пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови человека *in vitro*, которое было обусловлено активностью АДИ [4]. В нашем предыдущем исследовании также было доказано ингибирующее влияние АДИ *S. pyogenes* M49-16 на пролиферативную активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови, индуцированную конканавалином А. Снижение пролиферации сопровождалось подавлением уровня экспрессии тирозинфосфатазы CD45, которая модулирует сигнал от Т клеточного рецептора [27]. При изучении

патогенной роли *Granulicatella elegans* в развитии эндокардита, было исследовано влияние внеклеточных продуктов этой бактерии на мононуклеарные клетки периферической крови человека. Культуральные супернатанты, полученные из пероральных изолятов *G. elegans* и содержащие АДИ значительно подавляли пролиферацию мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека, индуцированную под действием фитогемагглютинаина-Р, форбол-12-миристат-13-ацетата, конканавалина А и стафилококкового энтеротоксина В [16].

Недавние исследования показали, что активация и поддержание высокого уровня макроавтофагии необходимо для устойчивой пролиферации, выживания, а также дифференцировки CD4⁺Т-клеток [5]. А подавление лизосомальной активности в CD4⁺Т-клетках снижает необходимый для их активации уровень гликолиза и окислительного фосфорилирования [22]. Во время дифференцировки Т-клеток аутофагия также служит для удаления накопленных нефункциональных митохондрий, что снижает уровень окислительного стресса в клетках, подвергшихся множественным делениям [22, 24, 31]. Полученные в этом исследовании данные показывают, что снижение интенсивности аутофагии под действием стрептококковой АДИ может быть причиной снижения пролиферативной активности Т-клеток. Эти данные противоречат результатам

другого исследования, в котором изучали изменение функциональной активности Т-клеток в условиях абсолютного дефицита аргинина [9]. В частности, было показано, что при активации Т-клеток митогеном в дефицитной по аргинину среде происходила индукция аутофагии и остановка клеточного цикла в G₀/G₁. Авторы показали, что в отсутствие аргинина аутофагия была необходима для выживания Т-лимфоцитов и делала остановку клеточного цикла обратимой. Нельзя исключать, что Т-клетки усиливают аутофагию в условиях голодания абсолютного дефицита аргинина, а частичное снижение концентрации аминокислоты под действием АДИ [23] приводит к подавлению аутофагии.

Заключение

В данном исследовании получены дополнительные данные, раскрывающие некоторые механизмы, с помощью которых стрептококковая АДИ, может подавлять иммунные реакции организма-хозяина. Принимая во внимание, что конкуренция между хозяином и патогеном за аргинин может определять исход инфекционных заболеваний, терапевтические стратегии, направленные на регулирование аргинин-метабо-

лизирующих ферментов, могут оказаться полезным инструментом для терапии инфекционных заболеваний.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования — Старикова Э.А., сбор данных — Маммедова Д.Т., Старикова Э.А., Ожиганова А., Лебедева А.М., Левешко Т.А., Бурова Л.А., обработка данных — Старикова Э.А., Маммедова Д.Т., Лебедева А.М., Ожиганова А., написание и редактирование рукописи — Старикова Э.А., Бурова Л.А., Кудрявцев И.В.

Благодарности

Авторы выражают благодарность руководителю отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, профессору А.Н. Суворову за предоставленные штаммы *S. pyogenes*.

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-20013, <https://rscf.ru/project/22-24-20013/>, и Региона (грант Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от «14» апреля 2022 г. № 45/2022).

Список литературы / References

1. Головин А.С., Старикова Э.А., Фрейдлин И.С. Влияние аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes* на бактерицидную активность макрофагов // Медицинский академический журнал, 2016. Т. 16, № 4. С. 152-152. [Golovin A.S., Starikova E.A., Freidlin I.S. Effect of *Streptococcus pyogenes* arginine deiminase on bacterial activity of macrophages. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal*, 2016, Vol. 16, no. 4, pp. 152-152. (In Russ.)]
2. Arbogast F., Gros F. Lymphocyte autophagy in homeostasis, activation, and inflammatory diseases. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1801. doi: 10.3389/fimmu.2018.01801.
3. Cusumano Z.T., Watson M.E., Caparon M.G. *Streptococcus pyogenes* arginine and citrulline catabolism promotes infection and modulates innate immunity. *Infect. Immun.*, 2014, Vol. 82, no. 1, pp. 233-242.
4. Degnan B.A., Palmer J.M., Robson T., Jones C.E.D., Fischer M., Glanville M., Mellor G.D., Diamond A.G., Kehoe M.A., Goodacre J. 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.
5. Dowling J.K., Afzal R., Gearing L.J., Cervantes-Silva M.P., Annett S., Davis G.M., de Santi C., Assmann N., Dettmer K., Gough D.J., Bantug G.R., Hamid F.I., Nally F.K., Duffy C.P., Gorman A.L., Liddicoat A.M., Lavelle E.C., Hess C., Oefner P.J., Finlay D.K., Davey G.P., Robson T., Curtis A.M., Hertzog P.J., Williams B.R.G., McCoy C.E. Mitochondrial arginase-2 is essential for IL-10 metabolic reprogramming of inflammatory macrophages. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 1460. doi: 10.1038/s41467-021-21617-2.
6. Dross S.E., Munson P.V., Kim S.E., Bratt D.L., Tunggal H.C., Gervassi A.L., Fuller D.H., Horton H. Kinetics of myeloid-derived suppressor cell frequency and function during simian immunodeficiency virus infection, combination antiretroviral therapy, and treatment interruption. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, no. 2, pp. 757-766.
7. El Kasmi K.C., Qualls J.E., Pesce J.T., Smith A.M., Thompson R.W., Henao-Tamayo M., Basaraba R.J., König T., Schleicher U., Koo M.-S., Kaplan G., Fitzgerald K.A., Tuomanen E.I., Orme I.M., Kanneganti T.-D., Bogdan C., Wynn T.A., Murray P.J. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat. Immunol.*, 2008, Vol. 9, no. 12, pp. 1399-1406.

8. Gabrilovich D.I. The dawn of myeloid-derived suppressor cells: identification of arginase I as the mechanism of immune suppression. *Cancer Res.*, 2021, Vol. 81, no. 15, pp. 3953-3955.
9. García-Navas R., Munder M., Mollinedo F. Depletion of L-arginine induces autophagy as a cytoprotective response to endoplasmic reticulum stress in human T lymphocytes. *Autophagy*, 2012, Vol. 8, no. 11, pp. 1557-1576.
10. Gaur U., Roberts S.C., Dalvi R.P., Corraliza I., Ullman B., Wilson M.E. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 12, pp. 8446-8453.
11. Ghosh S.; Navarathna D.H.M.L.P.; Roberts D.D.; Cooper J.T.; Atkin A.L.; Petro T.M.; Nickerson K.W. Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. *Infect. Immun.*, 2009, Vol. 77, no. 4, pp. 1596-1605.
12. Gobert A.P., McGee D.J., Akhtar M., Mendz G.L., Newton J.C., Cheng Y., Mobley H.L., Wilson K.T. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2001, Vol. 98, no. 24, pp. 13844-13849.
13. Gong H., Zölzer F., von Recklinghausen G., Rössler J., Breit S., Havers W., Fotsis T., Schweigerer L. Arginine deiminase inhibits proliferation of human leukemia cells more potently than asparaginase by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Leukemia*, 2000, Vol. 14, no. 5, pp. 826-829.
14. Han R.Z., Xu G.C., Dong J.J., Ni Y. Arginine deiminase: recent advances in discovery, crystal structure, and protein engineering for improved properties as an anti-tumor drug. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, Vol. 100, no. 11, pp. 4747-4760.
15. Hirose Y., Yamaguchi M., Sumitomo T., Nakata M., Hanada T., Okuzaki D., Motooka D., Mori Y., Kawasaki H., Coady A., Uchiyama S., Hiraoka M., Zurich R.H., Amagai M., Nizet V., Kawabata S. *Streptococcus pyogenes* upregulates arginine catabolism to exert its pathogenesis on the skin surface. *Cell Rep.*, 2021, Vol. 34, no. 13, 108924. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108924.
16. Kanamoto T., Sato S., Nakashima H., Inoue M. Proliferation of mitogen-stimulated human peripheral blood mononuclear cells is inhibited by extracellular arginine deiminase of *Granulicatella elegans* isolated from the human mouth. *J. Infect. Chemother.*, 2007, Vol. 13, no. 5, pp. 353-355.
17. Kim R.H., Coates J.M., Bowles T.L., Mc Nerney G.P., Sutcliffe J., Jung J.U., Gandour-Edwards R., Chuang F.Y.S., Bold R.J., Kung H.-J. Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspase-independent apoptosis. *Cancer Res.*, 2009, Vol. 69, no. 2, pp. 700-708.
18. Kim J.-E., Kim S.Y., Lee K.W., Lee H.J. Arginine deiminase originating from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* American Type Culture Collection (ATCC) 7962 induces G1-phase cell-cycle arrest and apoptosis in SNU-1 stomach adenocarcinoma cells. *Br. J. Nutr.*, 2009, Vol. 102, no. 10, pp. 1469-1476.
19. Köstlin-Gille N., Gille C. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Pregnancy and the Neonatal Period. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 584712. doi: 10.3389/fimmu.2020.584712.
20. Lahiri A., Das P., Chakravorty D. Arginase modulates *Salmonella* induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophages and is required for *Salmonella* pathogenesis in mice model of infection. *Microbes Infect.*, 2008, Vol. 10, no. 10-11, pp. 1166-1174.
21. Lahmar Q., Schoupe E., Morias Y., van Overmeire E., de Baetselier P., Movahedi K., Laoui D., Sarukhan A., van Ginderachter J.A. Monocytic myeloid-derived suppressor cells home to tumor-draining lymph nodes via CCR2 and locally modulate the immune response. *Cell. Immunol.*, 2021, Vol. 362, 104296. doi: 10.1016/j.cellimm.2021.104296.
22. Macian F. Autophagy in T Cell Function and Aging. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2019, Vol. 7, 213. doi: 10.3389/fcell.2019.00213.
23. Mammedova J.T., Sokolov A.V., Burova L.A., Karaseva A.B., Grudinina N.A., Gorbunov N.P., Malashicheva A.B., Semenova D.S., Kiseleva E.P., Starikova E.A. Streptococcal arginine deiminase regulates endothelial inflammation, mTOR pathway and autophagy. *Immunobiology*, 2023, Vol. 228, no. 2, 152344. doi: 10.1016/j.imbio.2023.152344.
24. Murera D., Arbogast F., Arnold J., Bouis D., Muller S., Gros F. CD4 T cell autophagy is integral to memory maintenance. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 5951. doi: 10.1038/s41598-018-23993-0.
25. Peyraud F., Guégan J.-P., Bodet D., Nafia I., Fontan L., Auzanneau C., Cousin S., Roubaud G., Cabart M., Chomy F., Le Loarer F., Chaput N., Danlos F.-X., Planchard D., Even C., Khettab M., Tselikas L., Besse B., Barlesi F., Soria J.-C., Marabelle A., Bessede A., Italiano A. Circulating L-arginine predicts the survival of cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Ann. Oncol.*, 2022, Vol. 33, no. 10, pp. 1041-1051.
26. Rath M., Müller I., Kropf P., Closs E.I., Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 532. doi: 10.3389/fimmu.2014.00532.
27. Starickova E.A., Leveshko T.A., Churakina D.V., Kudryavtsev I.V., Burova L.A., Freidlin I.S. *S. pyogenes* M49-16 arginine deiminase inhibits proliferative activity of human peripheral blood lymphocytes. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, Vol. 11, no. 2, 2. doi: 10.15789/2220-7619-ADF-1363.

28. Starikova E.A., Golovin A.S., Vasilyev K.A., Karaseva A.B., Serebriakova M.K., Sokolov A.V., Kudryavtsev I.V., Burova L.A., Voynova I.V., Suvorov A.N., Vasilyev V.B., Freidlin I.S. Role of arginine deiminase in thymic atrophy during experimental *Streptococcus pyogenes* infection. *Scand. J. Immunol.*, 2019, Vol. 89, no. 2, e12734. doi: 10.1111/sji.12734.
29. Starikova E.A., Rubinstein A.A., Mammedova J.T., Isakov D.V., Kudryavtsev I.V. Regulated arginine metabolism in immunopathogenesis of a wide range of diseases: is there a way to pass between scylla and charybdis? *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2023, Vol. 45, no. 4, pp. 3525-3551.
30. Thompson R.W., Pesce J.T., Ramalingam T., Wilson M.S., White S., Cheever A.W., Ricklefs S.M., Porcella S.F., Li L., Ellies L.G., Wynn T.A. Cationic amino acid transporter-2 regulates immunity by modulating arginase activity. *PLoS Pathog.*, 2008, Vol. 4, no. 3, e1000023. doi: 10.1371/journal.ppat.1000023.
31. Xu X., Araki K., Li S., Han J.-H., Ye L., Tan W.G., Konieczny B.T., Bruinsma M.W., Martinez J., Pearce E.L., Green D.R., Jones D.P., Virgin H.W., Ahmed R. Autophagy is essential for effector CD8(+) T cell survival and memory formation. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 12, pp. 1152-1161.

Авторы:

Старикова Э.А. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ; доцент кафедры клеточной биологии и гистологии, Институт медицинского образования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Маммедова Дж.Т. — научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Ожиганова А. — младший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

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

Левешко Т.А. — лаборант-исследователь отдела иммунологии 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

Кудрявцев И.В. — к.б.н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «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; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Associate Professor, Department of Cell Biology and Histology, Institute of Medical Education, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Mammedova J.T., Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Ozhiganova A., Junior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Lebedeva A.M., PhD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Leveshko T.A., Laboratory Assistant-Researcher, 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

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Cellular Immunology, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation