

РОЛЬ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ ПИОГЕННОГО СТРЕПТОКОККА В ПОДАВЛЕНИИ СИНТЕЗА МОНООКСИДА АЗОТА (NO) МАКРОФАГАМИ

Э.А. Старикова¹, А.В. Соколов^{1,2}, Л.А. Бурова¹, А.С. Головин¹, А.М. Лебедева¹, В.Б. Васильев^{1,2}, И.С. Фрейдлин^{1,2}

¹ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Защитная роль макрофагов тесно связана с продукцией этими клетками бактерицидных молекул, в ряду которых важное место занимает монооксид азота (NO). Аргинин служит субстратом для продукции NO при участии фермента индуцибельной NO синтазы (iNOS). Экспрессия и активность iNOS регулируются доступностью субстрата (аргинина) в межклеточном пространстве. Бактериальный фермент аргининдеиминаза также использует аргинин в качестве субстрата, вызывая его дефицит для клеток организма хозяина. Целью настоящего исследования стало подтверждение возможной роли аргининдеиминазы *S. pyogenes* в ингибировании синтеза NO макрофагами. Для этого проводили сравнительное изучение влияния на синтез NO макрофагами продуктов разрушения двух штаммов: исходного *S. pyogenes* M49-16 и мутантного *S. pyogenes* M49-16 delArcA с инактивированным геном аргининдеиминазы (*arcA*). Было показано, что способность *S. pyogenes* M49-16 ингибировать продукцию макрофагами NO зависит от его аргининдеиминазной активности так как изогенный мутант *S. pyogenes* M49-16 delArcA с инактивированным геном *arcA* утратил способность ингибировать синтез NO. Это позволяет рассматривать изученные нами эффекты *S. pyogenes* как эффекты аргининдеиминазы. Анализ механизмов ингибирующего действия фермента, показал, что подавление синтеза NO не было связано с влиянием продуктов разрушения *S. pyogenes* на жизнеспособность макрофагов. По данным проточной цитометрии, инкубация клеток в присутствии продуктов разрушения *S. pyogenes* исходного и мутантного штаммов не изменяла уровень экспрессии iNOS, то есть не влияла на синтез или стабильность этого фермента. При этом, снижение продукции NO под влиянием исходного штамма *S. pyogenes* M49-16 коррелировало со снижением содержания в культуральной среде аргинина. А при добавлении в среду экзогенного аргинина, подавляющее продукцию NO действие исходного штамма нивелировалось. Это подтверждает, что основным механизмом ингибирующего действия аргининдеиминазы на продукцию NO макрофагами является истощение запасов аргинина. Недостаток продукции NO при стрептококковой инфекции может приводить к ослаблению бактерицидности макрофагов и к снижению эффективности противомикробной защиты.

Ключевые слова: *S. pyogenes*, макрофаги, аргининдеиминаза, NO, iNOS.

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Библиографическое описание:

Старикова Э.А., Соколов А.В., Бурова Л.А., Головин А.С., Лебедева А.М., Васильев В.Б., Фрейдлин И.С. Роль аргининдеиминазы пиогенного стрептококка в подавлении синтеза монооксида азота (NO) макрофагами // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 211–218. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-211-218

Citation:

Starikova E.A., Sokolov A.V., Burova L.A., Golovin A.S., Lebedeva A.M., Vasilyev V.B., Freidlin I.S. The role of arginine deiminase from streptococcus pyogenes in inhibition macrophages nitrogen monoxide (NO) synthesis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 211–218. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-211-218

THE ROLE OF ARGININE DEIMINASE FROM *STREPTOCOCCUS PYOGENES* IN INHIBITION MACROPHAGES NITROGEN MONOXIDE (NO) SYNTHESIS

Starikova E.A.^a, Sokolov A.V.^{a,b}, Burova L.A.^a, Golovin A.S.^a, Lebedeva A.M.^a, Vasilyev V.B.^{a,b}, Freidlin I.S.^{a,b}

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

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The protective role of macrophages closely related to the production of bactericidal molecules, in which nitrogen monoxide (NO) play an important role. Arginine serves as a substrate for inducible NO synthase (iNOS) in course of NO production. Expression and activity of iNOS are regulated by the availability of the substrate (arginine) in the intercellular space. The bacterial enzyme arginine deiminase also uses arginine as a substrate, causing its deficiency for host cells. The aim of this study was to confirm the possible role of arginine deiminase from *S. pyogenes* in inhibiting NO synthesis by macrophages. For this purpose, a comparative study was made of the effect on the synthesis of NO by macrophages of the products of destruction of two strains: the initial *S. pyogenes* M49-16 and the isogenic mutant *S. pyogenes* M49-16 delArcA with the inactivated arginine deiminase gene (*arcA*). It has been shown that the ability of *S. pyogenes* M49-16 to inhibit production of NO by macrophages depends on its arginine deiminase activity because the isogenous mutant of *S. pyogenes* M49-16 delArcA with the inactivated gene *arcA* has lost its ability to inhibit NO synthesis. This allows us to consider the effects of *S. pyogenes* M49-16 as effects of arginine deiminase. An analysis of the inhibitory mechanisms of the enzyme showed that suppression of NO synthesis was not associated with the effect of destruction products of *S. pyogenes* M49-16 on the viability of macrophages. According to data of flow cytometry, incubation of cells in the presence of *S. pyogenes* destruction products of the original and mutant strains did not affect the level of iNOS expression, i.e. did not alter synthesis or stability of this enzyme. At the same time, the decrease in NO production under the influence of the original *S. pyogenes* strain M49-16 correlated with a decrease in the content of arginine in the culture medium. When exogenous arginine to the culture medium was added, the effect of the original strain of the suppression of NO production was declined. This confirms that the depletion of arginine is the main mechanism of the inhibitory effect of arginine deiminase on the production of NO by macrophages. The deficiency of NO production in the course of streptococcal infection can lead to a weakening of bactericidal activity of macrophages and to a decrease in the effectiveness of antimicrobial protection.

Key words: *S. pyogenes*, macrophages, arginine deiminase, NO, iNOS.

Введение

Фагоцитирующие клетки образуют первую линию защиты организма от патогенных микроорганизмов, проникающих через кожу или слизистые оболочки. Макрофаги — особый тип фагоцитирующих клеток, которые не только осуществляют элиминацию патогенов, но также обеспечивают презентацию фагоцитированных объектов, формирование антиген-специфических клонов лимфоцитов и иммунологической памяти. Защитная роль макрофагов при стрептококковой инфекции была показана в исследованиях с искусственным удалением макрофагов из организма мышей, после которого наблюдали усиление диссеминации бактерий и повышение частоты гибели зараженных животных [11, 12].

S. pyogenes в большинстве случаев не способны пролиферировать внутри клеток, и происходит элиминация патогена с участием процессов аутофагии и эндолизосомной гибели бактерий. Вместе с тем *S. pyogenes* вооружены разнообразными механизмами агрессии, значительная часть которых направлена на предупреждение слияния фагосомы и лизосомы, препятствие закислению среды внутри фагосомы, нарушение продукции бактерицидных молекул [4, 6, 13, 14, 21, 23]. Наиболее вирулентные штаммы

стрептококка могут длительно выживать внутри макрофагов, которые при этом обеспечивают их защиту от других иммунных механизмов элиминации и от действия антибиотиков. Возможность пролиферации *S. pyogenes* в живых макрофагах человека на уровне клеточной популяции и на уровне отдельных клеток была убедительно показана в исследовании O'Neill [19]. Norrby-Neglund et al. выявляли живые *S. pyogenes* в макрофагах из биоптатов от больных с инвазивной инфекцией, у которых бактериальная нагрузка возрастала на фоне внутривенной антибиотикотерапии [5]. Очевидно, вирулентные штаммы *S. pyogenes* имеют механизмы устойчивости к действию бактерицидных факторов макрофагов.

Одним из факторов *S. pyogenes*, способных ослаблять фагоцитарную активность клеток иммунной системы является аргининдеиминаза (АД). Этот бактериальный фермент осуществляет гидролиз аргинина с образованием аммиака, что препятствует закислению среды в фаголизосомах. В предшествовавших исследованиях в нашей лаборатории было показано, что продукты разрушения *S. pyogenes* M49-16 оказывали ингибирующее действие на продукцию NO в культуре мышинных перитонеальных макрофагов [1]. Предположительно, активность АД ограничивает биодоступность аргинина для

iNOS и синтез NO — важнейшего фактора бактерицидности макрофагов. Все это в совокупности может способствовать внутриклеточному персистенции патогена. Для подтверждения возможной роли АД в ингибировании синтеза NO был сконструирован мутантный штамм *S. pyogenes* с инактивированным геном АД [2].

Целью настоящего исследования стало сравнительное изучение влияния на синтез NO продуктов разрушения двух штаммов: исходного *S. pyogenes* M49-16 и мутантного *S. pyogenes* M49-16 delArcA с инактивированным геном АД (*arcA*).

Материалы и методы

В работе использовали штаммы *S. pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с инактивированным геном АД, утратившего способность синтезировать АД *S. pyogenes* M49-16 delArcA, любезно предоставленные проф. А.Н. Суворовым (отдел молекулярной микробиологии, ФГБНУ ИЭМ, Санкт-Петербург). Супернатанты разрушенных стрептококков (СРС) готовили, как описано в [2].

Мыши, культуры клеток и культуральные среды. Мыши СВА/BALB (F1) из питомника «Рапполово» содержались в условиях неограниченного доступа воды и пищи, в соответствии с принятыми этическими нормами. Клетки перитонеального лаважа получали методом промывания брюшной полости мышей стерильным раствором Хенкса. Клетки вносили в 96-ти луночный планшет (Eppendorf, РФ) в количестве 300 тысяч в 100 мкл среды RPMI 1640 (Биолот, РФ) с 10% телячьей фетальной сывороткой (Flow laboratories, США), с добавлением 2 мМ глутамин (Биолот, РФ), 50 мкг/мл гентамицин (Биолот, РФ), инкубировали 24 ч при температуре 37°C, 5% CO₂.

Клетки перевиваемой линии J774 (полученной из культуры макрофагов мышей Balb/c) культивировали в среде DMEM с повышенным содержанием глюкозы (Sigma, США), с добавлением глутамин 2 мМ (ICN, США), 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco, Германия), 50 мкг/мл гентамицин (АО «Самсон», РФ). Дезинтеграцию монослоя осуществляли путем инкубации клеток в растворе Версена (Биолот, РФ). Клетки переносили в 96-луночный планшет (Eppendorf, РФ) в количестве 200 тыс. в 100 мкл среды на одну лунку, затем инкубировали 24 ч при температуре 37°C, 5% CO₂.

Определение концентрации аргинина в среде после культивирования клеток в присутствии СРС. За основу метода определения аргинина была взята модифицированная реакция Сукагучи для колориметрического определения аргинина, основанная на образовании окрашенного в красный цвет соединения при реакции аргинина

с 8-оксихинолином и гипобромитом натрия в щелочной среде [24]. Для анализа к 100 мкл пробы, содержащей культуральную среду (100, 50 либо 25%), добавляли 50 мкл 5 мМ 8-оксихинолина и 100 мкл 8 мМ гипобромита натрия, растворенных в 2 М NaOH. В качестве контрольной пробы использовали PBS. Реакцию проводили в 96-луночных микропланшетах и регистрировали оптическую плотность с помощью планшетного спектрофотометра ClarioStar (BMG Labtech, Германия) при 505 нм. Для каждого эксперимента строили калибровочный график зависимости поглощения при 505 нм от концентрации аргинин-гидрохлорида (диапазон 4–500 мкМ) в PBS. Расчет концентрации аргинина в пробах проводили с помощью программного обеспечения Mars прибора ClarioStar, учитывая объемную долю культуральной среды в анализируемой пробе.

Определение концентрации нитритов и нитратов. После смены культуральной среды к клеткам вносили супернатанты разрушенных стрептококков в разных концентрациях. Для стимуляции продукции NO в лунки вносили LPS (*Escherichia coli* 055:B5, Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 1 мкг/мл. В целях создания избытка субстрата в некоторые лунки добавляли L-аргинин (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 2 мМ. После 24-часовой инкубации при 37°C и 5% CO₂ клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 200g. После этого отбирали по 70 мкл надосадка, переносили в 96-луночный планшет (Eppendorf, РФ) и добавляли 70 мкл реактива Грисса. Спектротрический анализ проводили при длине волны 540 нм (Microplate reader, Model 680, Bio-Rad). Концентрацию нитритов и нитратов в экспериментальных пробах определяли математически, в соответствии с линейной аппроксимацией по методу наименьших квадратов, на основании калибровочной кривой, построенной с использованием раствора нитрита натрия (NaNO₂) известной концентрации.

Анализ доли клеток в состоянии апоптоза и некроза. После 24-часовой инкубации клеток в присутствии разных концентраций СРС проводили дезинтеграцию монослоя, для чего в каждую лунку добавляли 25 мкл на лунку фермента аккутаза (Sigma-Aldrich, Германия) и инкубировали 3–10 мин при 37°C, 5% CO₂. Затем клетки ресуспендировали в 100 мкл раствора Версена (Биолот, РФ) и переносили в микропробирки. Для инактивации аккутазы в каждую пробу вносили по 500 мкл полной культуральной среды и центрифугировали 5 мин при 200 g, надосадок удаляли и вносили пропиций-йодид (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 1 мкг/мл и YO-PRO (Invitrogen, США) в концентрации 250 нМ (Sigma-Aldrich,

Германия). Анализ образцов проводили с помощью проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США).

Анализ экспрессии iNOS клетками линии J774. После 24-часовой инкубации в присутствии СРС клетки линии J774 переносили в пробирки, центрифугировали при 200 g, в течение 7 мин. Клетки фиксировали и пермеабилizировали в 500 мкл ледяного 80% р-ра метанола (Вектон, РФ) в течение 10 мин при -20°C . После однократной отмывки от метанола производили окрашивание клеточной суспензии с помощью моноклональных антител против iNOS мыши, меченных FITC (BD Transduction Laboratories, Cat. No. 610330), в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ образцов проводили с помощью проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США). Результаты выражали средними значениями интенсивности флуоресценции (Mean Fluorescence Intensity — MFI).

Статистическая обработка. Все эксперименты повторяли как минимум трижды. Статистическую обработку данных проводили в программе STATISTICA 5.0 при помощи t-теста Стьюдента для независимых выборок.

Результаты

Предварительно проводили подбор концентрации, в которой СРС *S. pyogenes* M49-16 обладали максимальной способностью гидролизовать аргинин и максимальной ингибирующей

активностью в отношении продукции NO клетками линии J774. Для этого оценивали количество аргинина и его метаболита — NO в пробах при инкубации с различными концентрациями СРС исходного штамма (рис. 1А). СРС исходного штамма *S. pyogenes* M49-16 достоверно дозозависимо снижал концентрацию аргинина в культуральной среде и достоверно подавлял продукцию NO макрофагами. Максимально эффект был выражен при разведении 1:100 (v/v) — СРС:культуральная среда. СРС *S. pyogenes* M49-16 delArcA такими эффектами не обладал (рис. 1Б). Для дальнейшей работы было выбрано разведение СРС:культуральная среда = 1:100 (v/v), так как в этом случае наблюдалось максимальное снижение продукции NO клетками и достоверное снижение количества аргинина в среде.

Чтобы убедиться, что снижение продукции NO клетками не является результатом их гибели, проводили анализ влияния исследуемых факторов на жизнеспособность клеток линии J774. Не было выявлено достоверных изменений суммарной доли клеток в состоянии апоптоза и некроза после инкубации в присутствии СРС в концентрациях 1/500, 1/100 и 1/50 (табл.).

Исследования показали, что СРС *S. pyogenes* M49-16 в разведениях 1/100 достоверно подавлял индуцированную ЛПС продукцию NO клетками линии J774 ($p < 0,0001$), а в присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16 delArcA продукция NO достоверно не изменялась (рис. 2). Добавление экзо-

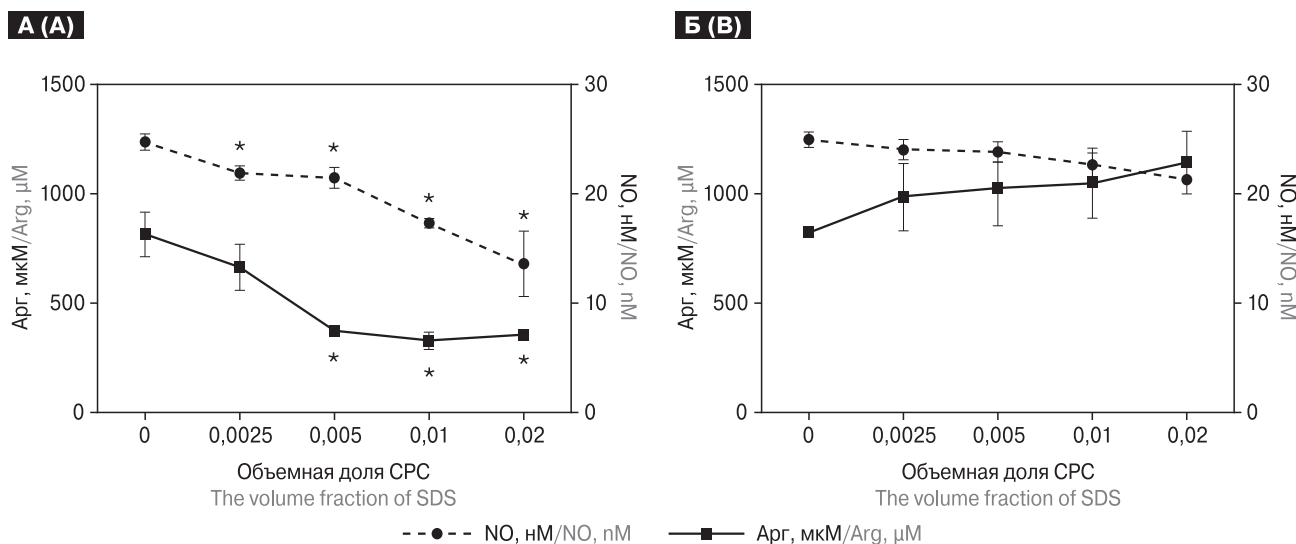


Рисунок 1. Концентрация аргинина и NO в культуральной среде при инкубации клеток J774 в присутствии разных разведений СРС *S. pyogenes*

Figure 1. The concentration of arginine and NO in the culture medium with the incubation of J774 cells in the presence of different dilutions of the SDS *S. pyogenes*

А — СРС исходного штамма (*S. pyogenes* M49-16), Б — СРС мутантного штамма (*S. pyogenes* M49-16 delArcA).

* — статистически достоверные отличия от контрольного уровня при $p < 0,05$.

А — SDS of the original strain (*S. pyogenes* M49-16), Б — SDS of the mutant strain (*S. pyogenes* M49-16 delArcA).

* — statistically significant differences from the control level at $p < 0.05$.

Таблица. Влияние CPC *S. pyogenes* M49-16 и M49-16 delArcA на жизнеспособность клеток линии J774
 Table. Effect of the SDS *S. pyogenes* M49-16 and M49-16 delArcA on the viability of J774 line cells

CPC <i>S. pyogenes</i> SDS <i>S. pyogenes</i>	Суммарная доля клеток в состоянии некроза и апоптоза (M±m, %, N = 3) при инкубации в присутствии CPC в разведении: The total proportion of cells in the state of necrosis and apoptosis (M±m, %, N = 3) when incubated in the presence of SDS in the dilution:			
	0	1/500	1/100	1/50
M49-16	14,02±1,38	13,76±2,20	13,66±0,69	12,70±0,76
M49-16 delArcA	14,02±1,38	14,93±2,24	13,60±0,98	14,60±0,85

генного аргинина в концентрации 2 мМ приводило к повышению подавленной супернатантом *S. pyogenes* M49-16 продукции NO более чем в 3 раза ($p < 0,0001$). При добавлении аргинина к клеткам в контроле уровень продукции NO повышался на 30%, так же, как при добавлении аргинина к клеткам, инкубированным в присутствии CPC M49-16 delArcA ($p < 0,05$).

Аналогичные результаты были получены при изучении влияния CPC и экзогенного аргинина на продукцию NO клетками перитонеального лаважа. В этом случае при культивировании клеток в присутствии CPC *S. pyogenes* M49-16 происходило достоверное снижение индуцированной под влиянием LPS продукции NO ($p < 0,05$). CPC *S. pyogenes* M49-16 delArcA не оказывал достоверного влияния на продукцию NO клетками перитонеального лаважа, индуциро-

ванную под действием LPS. Добавление экзогенного аргинина приводило к достоверному увеличению продукции NO более чем в 3 раза по сравнению с продукцией NO в присутствии *S. pyogenes* M49-16 ($p < 0,05$) (рис. 3).

Для уточнения механизма подавления продукции NO в присутствии CPC исходного штамма проводили анализ уровня экспрессии iNOS — фермента, который осуществляет синтез NO в макрофагах. Инкубация клеток в присутствии CPC как исходного, так и мутантного штаммов не приводило к изменению уровня экспрессии iNOS (рис. 4А). Добавление в культуральную среду аргинина также не влияло на уровень экспрессии данного фермента (рис. 4Б). Таким образом, подавление синтеза NO под влиянием АД не было связано с влиянием CPC на синтез либо стабильность iNOS.

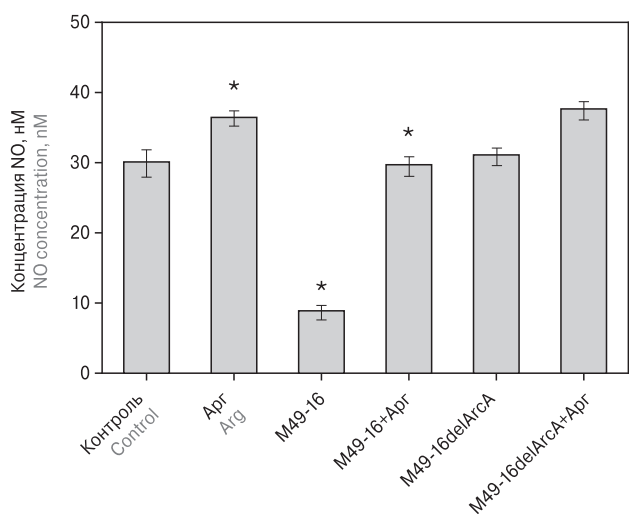


Рисунок 2. Влияние CPC *S. pyogenes* M49-16, *S. pyogenes* M49-16 delArcA и 2 мМ экзогенного аргинина на продукцию NO клетками линии J774, индуцированную 1 мкг/мл LPS

Figure 2. The effect of SDS *S. pyogenes* M49-16, *S. pyogenes* M49-16 delArcA and 2 mM exogenous arginine on the J774 cells NO production induced by 1 µg/ml LPS

* — статистически достоверные отличия от контрольного уровня, при $p < 0,05$.

* — statistically significant differences from the control level, with $p < 0.05$.

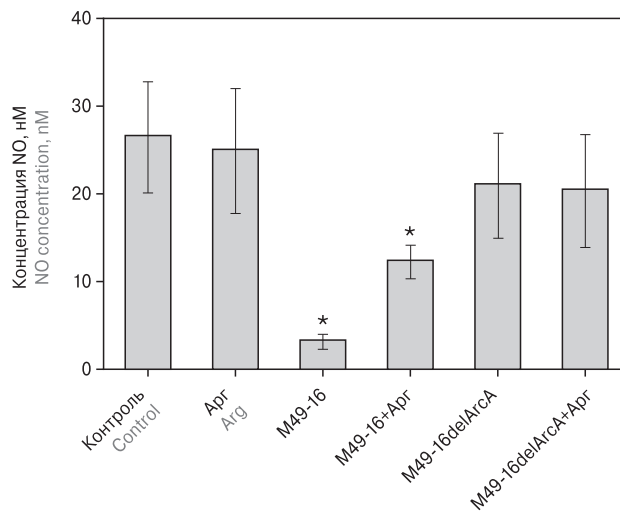


Рисунок 3. Влияние CPC *S. pyogenes* M49-16, *S. pyogenes* M49-16 delArcA и 2 мМ экзогенного аргинина на продукцию NO клетками перитонеального лаважа, индуцированную 1 мкг/мл LPS

Figure 3. The Effect of SDS *S. pyogenes* M49-16, *S. pyogenes* M49-16 delArcA and 2 mM exogenous arginine on the peritoneal exudate cells NO production induced by 1 µg/ml LPS

* — статистически достоверные отличия от контрольного уровня, при $p < 0,05$.

* — statistically significant differences from the control level, with $p < 0.05$.

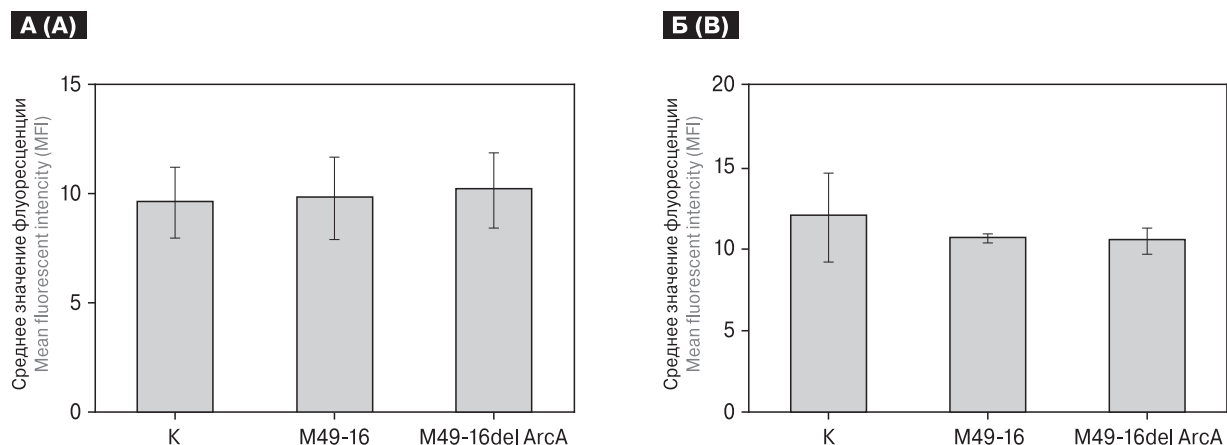


Рисунок 4. Влияние CPC *S. pyogenes* M49-16 и *S. pyogenes* M49-16 delArcA на уровень индуцированной LPS экспрессии iNOS клетками J774

Figure 4. The effect of SDS *S. pyogenes* M49-16 and *S. pyogenes* M49-16 delArcA on LPS-induced iNOS expression by J774 cells

K — контроль (1 мкг/мл LPS), M49-16 — исходный штамм, M49-16 delArcA — мутантный штамм. А) Без добавления аргинина. Б) С добавлением 2 мМ аргинина.

K — control (1 µg/ml LPS), M49-16 — original strain, M49-16 delArcA — mutant strain. A) Without arginine. B) With 2 mM arginine.

Обсуждение

В метаболизме аргинина у пиогенного стрептококка участвуют 3 ключевых фермента: аргининдеиминаза, орнитинкарбомойлтрансфераза и карбаматкиназа. Аргинин транспортируется внутрь клетки, катаболизируется перечисленными ферментами с образованием одной молекулы CO₂, одной молекулы АТФ и двух ионов аммония (NH₄⁺). За счет продукции аммония система ферментов АД выполняет защитную функцию [3, 8], а за счет продукции АТФ — энергетическую. При этом АД использует аргинин в качестве субстрата, вызывая его дефицит. Защитная роль макрофагов тесно связана с продукцией этими клетками бактерицидных молекул, в ряду которых важное место занимает NO. Аргинин служит субстратом для продукции NO при участии индуцибельной NO синтазы (iNOS) [17]. Синтез и активность iNOS регулируются доступностью субстрата (аргинина) в межклеточном пространстве [16, 20]. Кроме того, макрофаги продуцируют аргиназу — другой фермент, также использующий аргинин в качестве субстрата [7, 10]. Синтез iNOS и аргиназы в клетках регулируется реципрокно [16, 20]. Многие микроорганизмы используют этот регуляторный механизм, индуцируя продукцию аргиназы организма хозяина или синтезируя собственные, метаболизирующие аргинин ферменты [7, 10]. Наши исследования показали, что CPC исходного штамма *S. pyogenes* M49-16 ингибировал продукцию NO макрофагами как в первичной культуре клеток перитонеального лаважа мышей, так и в перевиваемой культуре клеток J774. Было показано, что способность CPC *S. pyogenes* инги-

бировать продукцию макрофагами оксида азота (NO) зависит от его аргининдеиминазной активности, так как изогенный мутант *S. pyogenes* M49-16delArcA с инактивированным геном АД утратил способность ингибировать синтез NO. Это позволяет рассматривать изученные нами эффекты CPC *S. pyogenes* M49-16 как эффекты фермента АД. Отмеченное снижение продукции NO макрофагами является результатом истощения запасов аргинина в среде, вызванной стрептококковой АД. В пользу этого говорят результаты экспериментов с параллельным измерением в культуральной среде клеток J774 уровней NO и аргинина. Максимальное снижение продукции NO коррелировало с достоверным снижением содержания аргинина. А при добавлении в культуральную среду клеток J774 одновременно с CPC экзогенного аргинина ингибирующее действие CPC исходного штамма существенно нивелировалось. Это также подтверждает, что именно истощение запасов аргинина является основным механизмом ингибирующего действия АД на продукцию NO макрофагами.

Полученные в нашем исследовании результаты согласуются с данными литературы. Так, ранее было показано, что в присутствии исходного штамма *S. pyogenes* HSC5 был зарегистрирован достоверно более низкий уровень продукции NO клетками линии RAW 264.7 по сравнению с уровнем продукции NO у клеток, культивируемых в присутствии изогенного мутанта с делецией гена АД [9]. При моделировании подкожной стрептококковой инфекции у мышей было показано, что в первые сутки после заражения повышается уровень экспрессии гена iNOS в клетках, но дефицит аргинина,

вызванный активностью АД, приводил к снижению продукции NO [9]. Аналогичные данные были получены при изучении влияния на продукцию NO АД, выделенной из микоплазмы [18, 22], когда было показано, что фермент снижал активность iNOS за счет быстрого истощения запасов аргинина в среде. В наших экспериментах было показано, что уровень экспрессии фермента iNOS клетками J774, индуцированной LPS, при инкубации в присутствии СРС обоих изученных штаммов *S. pyogenes* не изменялся. Таким образом, подавление синтеза NO не было связано с влиянием СРС на синтез или стабильность iNOS. Эти данные частично согласуются с результатами других исследователей [9, 11].

Проведено сравнительное исследование влияния на продукцию NO в культуре макрофагов СРС двух штаммов *S. pyogenes*: исходного М49-16 и мутантного М49-16 delArcA с инактивированным геном *arcA*, лишённого способности синтезировать АД. Доказано, что действие АД в составе СРС *S. pyogenes* М49-16, ингибирующее продукцию NO, не было связано ни с гибелью клеток, ни с изменением экспрессии iNOS, но нивелировалось при добавлении экзогенного аргинина. Недостаток продукции NO при стрептококковой инфекции может приводить к ослаблению бактерицидности макрофагов и к снижению эффективности противомикробной защиты.

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. [Golovin A.S., Starikova E.A., Freidlin I.S. Effect of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* on the bactericidal activity of macrophages. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academical Journal*, 2016, vol. 16, no. 4, p. 152. (In Russ.)]
2. Старикова Э.А., Карасева А.Б., Бурова Л.А., Суворов А.Н., Соколов А.В., Васильев В.Б., Фрейдлин И.С. Роль аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes* М49-16 в ингибции пролиферации эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 6. С. 559–566. [Starikova E.A., Karaseva A.B., Burova L.A., Suvorov A.N., Sokolov A.V., Vasilyev V.B., Freidlin I.S. A role of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* М49-16 in promoting infection and inhibition of endothelial cell proliferation. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 6, pp. 555–562. doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-555-562 (In Russ.)]
3. Abdelal A.T. Arginine catabolism by microorganisms. *Annual Rev. Microbiol.*, 1979, vol. 33, no. 1, pp. 139–168. doi: 10.1146/annurev.mi.33.100179.001035
4. Barnett T.C., Liebl D., Seymour L.M., Gillen Ch.M., Lim J.Y., LaRock Ch.N., Davies M.R., Schulz B.L., Nizet V., Teasdale R.V., Walker M.J. The globally disseminated MIT1 clone of group A streptococcus evades autophagy for intracellular replication. *Cell Host Microbe*, 2013, vol. 14, iss. 6, pp. 675–682. doi: 10.1016/j.chom.2013.11.003
5. Basma H., Norrby-Teglund A., Guedez Y., McGeer A., Low D.E., El-Ahmedy O., Schwartz B., Kotb M. Risk factors in the pathogenesis of invasive group A streptococcal infections: role of protective humoral immunity. *Infect. Immun.*, 1999, vol. 67, no. 4, pp. 1871–1877.
6. Bastiat-Sempe B., Love J.F., Lomayeva N., Wessels M.R. Streptolysin O and NAD-glycohydrolase prevent phagolysosome acidification and promote group A *Streptococcus* survival in macrophages. *MBio*, 2014, vol. 5, no. 5, pp. 1–11. doi: 10.1128/mBio.01690-14
7. Bronte V., Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, vol. 5, pp. 641–654. doi: 10.1038/nri1668
8. Cotter P.D., Hill C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2003, vol. 67, no. 3, pp. 429–453. doi: 10.1128/MMBR.67.3.429-453.2003
9. 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. doi: 10.1128/IAI.00916-13
10. Das P., 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, iss. 6: e1000899. doi: 10.1371/journal.ppat.1000899
11. Goldmann O., von Kockritz-Blickwede M., Holtje C., Chhatwal G.S., Geffers R., Medina E. Transcriptome analysis of murine macrophages in response to infection with *Streptococcus pyogenes* reveals an unusual activation program. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, no. 8, pp. 4148–4157. doi: 10.1128/IAI.00181-07
12. Goldmann O., Rohde M., Chhatwal G.S., Medina E. Role of macrophages in host resistance to group A streptococci. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 5, pp. 2956–2963. doi: 10.1128/IAI.72.5.2956-2963.2004
13. Lin A.E., Beasley F.C., Keller N., Hollands A., Urbano R., Troemel E.R., Hoffman H.M., Nizet V. A group A *Streptococcus* ADP-ribosyltransferase toxin stimulates a protective interleukin 1 β -dependent macrophage immune response. *MBio*, 2015, vol. 6, no. 2, pp. 1–12. doi: 10.1128/mBio.00133-15
14. Lu S.-L., Kuo C.-F., Chen H.-W., Yang Y.-S., Liu C.-C., Anderson R., Wu J.-J., Lin Y.-S. Insufficient acidification of autophagosomes facilitates group A streptococcus survival and growth in endothelial cells. *MBio*, 2015, vol. 6, no. 5, pp. 1–12. doi: 10.1128/mBio.01435-15
15. Mishalian I., Ordan M., Peled A., Maly A., Eichenbaum M.B., Ravins M., Aychek T., Jung S., Hanski E. Recruited macrophages control dissemination of group A *Streptococcus* from infected soft tissues. *J. Immunol.*, 2011, vol. 187, iss. 11, pp. 6022–6031. doi: 10.4049/jimmunol.1101385
16. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J. Nutr.*, 2007, vol. 137, iss. 6, pp. 1616S–1620S.
17. Nathan C., Shiloh M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, no. 16, pp. 8841–8848. doi: 10.1073/pnas.97.16.8841

18. Noh E.J., Kang S.W., Shin Y.J., Kim D.C., Park I.S., Kim M.Y., Chun B.G., Min B.H. Characterization of mycoplasma arginine deiminase expressed in *E. coli* and its inhibitory regulation of nitric oxide synthesis. *Mol. Cells*, 2002, vol. 13, no. 1, pp. 137–143.
19. O'Neill A.M., Thurston T.L.M., Holden D.W. Cytosolic replication of group A streptococcus in human macrophages. *MBio*, 2016, vol. 7, no. 2, pp. 1–16. doi: 10.1128/mBio.00020-16
20. Pautz A., Art J., Hahn S., Nowag S., Voss C., Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*, 2010, vol. 23, no. 2, pp. 75–93. doi: 10.1016/j.niox.2010.04.007
21. Sakurai A., Maruyama F., Funao J., Nozawa T., Aikawa Ch., Okahashi N., Shintani S., Hamada Sh., Ooshima T., Nakagawa I. Specific behavior of intracellular streptococcus pyogenes that has undergone autophagic degradation is associated with bacterial streptolysin O and host small G proteins Rab5 and Rab7. *J. Biol. Chem.*, 2010, vol. 285, no. 29, pp. 22666–22675. doi: 10.1074/jbc.M109.100131
22. 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. doi: 10.1016/S0006-2952(03)00555-0
23. Timmer A.M., Timmer J.C., Pence M.A., Hsu L.-C., Ghochani M., Frey T.G., Karin M., Salvesen G.S., Nizet V. Streptolysin O promotes group A streptococcus immune evasion by accelerated macrophage apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, no. 2, pp. 862–871. doi: 10.1074/jbc.M804632200
24. Wang H., Liang X.H., Zhao R.X., Feng L.D., Li H. Spectrophotometer determination of arginine in grape juice using 8-hydroquinoline. *Agr. Sci. China*, 2008, vol. 7, no. 10, pp. 1210–1215. doi: 10.1016/S1671-2927(08)60166-2

Авторы:

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

Соколов А.В., д.б.н., зав. лабораторией биохимической генетики отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия;

Бурова Л.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Головин А.В., аспирант 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;

Васильев В.Б., д.м.н., зав. отделом молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия;

Фрейдлин И.С., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

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

Sokolov A.V., PhD, MD (Biology), Head of the Laboratory of Biochemical Genetics, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Burova L.A., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Golovin A.S., PhD Student, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

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

Vasilyev V.B., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Freidlin I.S., PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Main Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.10.2017
Отправлена на доработку 07.05.2018
Принята к печати 30.05.2018

Received 31.10.2017
Revision received 07.05.2018
Accepted 30.05.2018