**ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ**

# ВЛИЯНИЕ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ *STREPTOOCCUS PYOGENES* НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И ЭКСПРЕССИЮ АКТИВАЦИОННЫХ МАРКЕРОВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ВЕНЫ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА

**© 2019 г. Дж. Т. Маммедова[1,2]*, Л. А. Бурова[1], А. Б. Малашичева[3,4], Д. С. Семёнова[3,4], И. С. Фрейдлин[1,5], Э. А. Старикова[1,5]**

**E-mail: jennet_m@mail.ru*

*[1]ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины», Санкт-Петербург, Россия;*
*[2]Санкт-Петербургский Государственный Технологический Институт (Технический Университет), Санкт-Петербург, Россия;*
*[3]ФГБУ «Национальный Медицинский Исследовательский Центр имени В. А. Алмазова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия;*
*[4]Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия;*
*[5]ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия*

**Поступила:** 18.05.2019. **Принята:** 26.06.2019

Аргинин является важнейшим нутриентом, участвующим в регуляции гомеостаза, тонуса сосудов, а также развитии воспаления и иммунного ответа. Дефицит аргинина, вызванный бактериальной аргининдеиминазой, может приводить к развитию эндотелиальной дисфункции. В настоящей работе с использованием супернатантов разрушенных стрептококков (СРС) *S.pyogenes* исходного штамма (М49-16) и его изогенного мутанта с инактивированным геном аргининдеиминазы *ArcA* (М49-16del*ArcA*), исследовали влияние фермента на пролиферативную активность и экспрессию адгезионных молекул на эндотелиальных клетках вены пупочного канатика человека (HUVEC). Распределение клеток по фазам клеточного цикла и экспрессию поверхностных молекул оценивали методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител. Было показано, что под влиянием СРС исходного штамма происходило достоверное снижение пролиферативной активности HUVEC и повышался уровень экспрессии адгезионных молекул CD62P, ICAM-1 и тканевого фактора CD142. СРС мутантного штамма не оказывал достоверного влияния на исследуемые параметры. Экспрессия рецептора VEGFR-2 в присутствии супернатантов обоих штаммов не изменялась. Полученные результаты показали, что стрептококковая аргининдеиминаза может способствовать развитию эндотелиальной дисфункции, воспаления, усилению процессов коагуляции.

**Ключевые слова:** эндотелиальные клетки, L-аргинин, аргининдеиминаза, *S. pyogenes*, пролиферация, адгезионные молекулы

**DOI:** 10.31857/S102872210007258-8

**Адрес:** 197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12, ФГБНУ «Институт Экспериментальной медицины», отдел иммунологии, Маммедова Дженнет Тумаровна.
Тел: +7(812)234–6868.

**E-mail:** starickova@yandex.ru

**Авторы:**

**Маммедова Д. Т.**, аспирант СПбГТИ(ТУ), младший научный сотрудник лаборатории общей иммунологии 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;

**Малашичева А. Б.**, к.б.н., заведующая лаборатории Молекулярной Кардиологии института Молекулярной Биологии и Генетики ФГБУ “НМИЦ им. В. А. Алмазова” Минздрава России, доцент кафедры эмбриологии биологического факультета СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия;

**Семёнова Д. С.**, аспирант СПбГУ, лаборант-исследователь лаборатории Молекулярной Кардиологии института Моле-

кулярной Биологии и Генетики ФГБУ "НМИЦ им. В. А. Алмазова" Минздрава России, младший научный сотрудник лаборатории Регенеративной Биомедицины института Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

**Фрейдлин И. С.**, д.м.н., член-корреспондент РАН, профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции отдела иммунологии ФГБНУ «Институт Экспериментальной медицины», профессор кафедры иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Старикова Э. А.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции отдела иммунологии ФГБНУ «Институт Экспериментальной медицины», доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия.

## ВВЕДЕНИЕ

Истощение нутриентов в микроокружении клеток организма-хозяина является одной из самых распространенных стратегий, которые используют патогенные микроорганизмы [1]. Экспрессия аргинин-гидролизующего фермента – аргининдеиминазы (АД) позволяет бактериям выживать в условиях гипоксии, низкой кислотности в очаге воспаления, фаголизосомах и истощает L-аргинин в микроокружении клеток организма-хозяина [2, 3]. L-аргинин играет существенную роль в регуляции функций эукариотических клеток, в первую очередь – эндотелиальных, т.к. является предшественником ряда важных для эндотелиальных клеток (ЭК) метаболитов, таких как оксид азота (NO), полиамины, пролин и агматин [4]. Также, L-аргинин работает, как сигнальная молекула, в рамках mTOR (mechanical target of rapamycin) зависимого внутриклеточного сигнального пути, контролирующего метаболизм, пролиферацию, аутофагию и синтез регуляторных молекул [5]. Активный mTOR обеспечивает гликолитический тип метаболизма, который в эндотелиальных клетках доминирует над процессами окислительного фосфорилирования. Это позволяет генерировать большие количества АТФ в единицу времени, и минимизировать потребление кислорода, чтобы улучшать его доступ в ткани. Кроме того, переключение типов метаболизма играет важную роль при дифференцировке ЭК в ходе ангиогенеза [6].

Эндотелий сосудов участвует в ангиогенезе, регулирует гомеостаз и тонус сосудов, процессы коагуляции/фибринолиза, а также развитие воспаления и иммунный ответ [7]. Дефицит L-аргинина при бактериальной инфекции может приводить к развитию эндотелиальной дисфункции. Одним из основных маркеров активации и/или повреждения ЭК является повышение уровня экспрессии адгезионных молекул и тканевого фактора, что способствует развитию воспаления и тромбоза. Снижение процессов пролиферации тесно связано с клеточным старением и эндотелиальной дисфункцией [8].

**Цель исследования** состояла в изучении влияния аргининдеиминазы *S. pyogenes* на пролиферативную активность, экспрессию рецептора VEGFR2 и адгезионных молекул на эндотелиальных клетках вены пупочного канатика человека HUVEC.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Приготовление супернатантов разрушенных стрептококков (СРС)*

СРС оригинального штамма *S. pyogenes* тип М49-16, и его изогенного мутанта с делецией гена *ArcA* (М49-16del*ArcA*), содержащие биологически активные внутриклеточные компоненты, были получены, как описано в предыдущих исследованиях [3, 9]. СРС вносили в нетоксичном для клеток разведении 1/100.

### *Получение клеток вены пупочного канатика (HUVEC)*

Эндотелиальные клетки выделяли из вены пупочного канатика человека по адаптированной стандартной методике [10]. Пуповины получали из перинатального центра ФГБУ «НМИЦ им. Алмазова». Все пациентки подписывали информированное согласие. С момента родов до выделения клеток проходило не более 48 часов. Вены канюлировали и инкубировали с коллагеназой второго типа (Worthington, США) 140 ед./мл в DMEM (Биолот, Россия), в течение 10 минут на водяной бане при 37 °С. Полученная суспензия клеток осаждалась центрифугированием при 300 g в течение 5 мин, далее клетки ресуспендировали в полной культуральной среде ECM (Sciencell, США) и высевали в культуральные флаконы (Sarstedt, Германия), покрытые 0,2% раствором желатина (Sigma, США). Пересев производили дважды в неделю. Дезинтеграцию монослоя вызывали инкубацией в растворе Трипсин-Версена (Sigma, США) при 37 °С. В экспериментах использовали клетки 3–5 пассажа. Все работы с клетками человека соответствовали Хельсинской декларации. Клетки культиви-

ровали в среде Endothelial Cell Basal Medium-2 (ECBM-2) (Promocell, США) с добавлением ростовой добавки Supplement Mix (Promocell, США). Пересев культуры производили дважды в неделю. Дезинтеграцию монослоя осуществляли с использованием раствора Трипсин-ЭДТА (Sigma, США). Для проведения экспериментов использовали клетки 3–5 пассажа.

*Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла*

Для изучения распределения клеток по фазам клеточного цикла клетки засевали в 6-ти луночный планшет (Sarstedt, Германия) по 300 тысяч клеток в 1 мл культуральной среды. Клетки инкубировали с исследуемыми субстанциями 72 часа при 37°C во влажной атмосфере с 5% $CO_2$. Для оценки доли клеток в фазах синтеза ($S/G_2$) производили окрашивание клеточной суспензии с использованием моноклональных антител против циклина А2, Anti-Cyclin A2-FITC, кат. № PNA22327 (Becman Coulter, США). Для этого клетки пермеабилизировали 80% ледяным метанолом. После чего проводили окрашивание клеточной суспензии антителами против циклина А2 в соответствии с рекомендациями производителя. Для оценки количества ДНК в клетках дополнительно проводили окрашивание клеточной суспензии ДНК-связывающим красителем DAPI (Invitrogen, США). Для этого к клеткам вносили DAPI в концентрации 300 nM и инкубировали 10 минут. Анализ образцов проводили с использованием проточного цитофлуориметра Navios™ (Beckman Coulter, США).

*Анализ экспрессии поверхностных маркеров HUVEC*

Для анализа экспрессии поверхностных маркеров суспензию клеток вносили в 24 (Sarstedt, Германия) луночный планшет по 150 тысяч в 500 мкл полной культуральной среды ECBM-2 (Promocell, США). Клетки инкубировали 48 часов при 37°C во влажной атмосфере с 5% $CO_2$ до образования конфлюэнтного монослоя. В качестве стандартного активатора эндотелиальных клеток использовали рекомбинантный препарат цитокина TNFα – «Рефнолин» (специфическая активность препарата 1ЕД – 0,06 нг) в концентрации 50 ЕД/мл. После внесения исследуемых веществ, клетки инкубировали 24 часа при 37°C во влажной атмосфере с 5% $CO_2$. По окончании инкубации производили дезинтеграцию монослоя аккутазой (Sigma, США), клеточные суспензии переносили в пробирки для проточной цитометрии (Beckman Coulter, США). Экспрессию поверхностных молекул оценивали методом проточной цитометрии с помощью моноклональных антител анти-CD62PFITC, кат. № A07790, анти-CD106PE, кат. № PN A66085, анти-CD54PE, кат. № PN IM1239U, анти-CD142PE, кат. № 550312, анти-CD146PC5, кат. № PN A22364, анти-CD309PC7, кат. № A64616 (Becman Coulter, США). Окрашивание клеточных суспензий проводили в соответствии с рекомендацией производителя. Для оценки уровня некроза дополнительно проводили окрашивание клеточной суспензии ДНК-связывающим красителем DAPI (Invitrogen, США). Анализ образцов проводили с использованием проточного цитофлуориметра Navios™ (Beckman Coulter, США).

*Статистическая обработка данных*

Анализ и обработку данных производили с помощью программы STATISTICA 5.0 с использованием t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла*

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла показал, что в стандартных условиях культивирования доля клеток в фазах синтеза ($S/G_2$) составляла 24,3% (**Рисунок 1, а**). Инкубация клеток в присутствии СРС исходного штамма приводила к достоверному снижению доли клеток в фазах синтеза до 8,2% при одновременном повышении доли клеток в фазах покоя ($G_0/G_1$) до 91,8% (**Рисунок 1, б**). При инкубации с СРС мутантного штамма доля клеток, в фазах синтеза была достоверно ниже, чем тот же показатель для клеток, инкубируемых с СРС М49-16 и оставляла 27% (**Рисунок 1, в**). Распределение клеток по фазам клеточного цикла в присутствии СРС изогенного мутанта не отличалось от того же параметра у клеток, культивируемых в стандартных условиях.

*Анализ уровня экспрессии поверхностных молекул*

Исследование уровня экспрессии поверхностных молекул показал, что HUVEC в стандартных условиях культивирования (**Рисунок 2, б**) не экспрессировали Р-селектин CD62P и тканe-

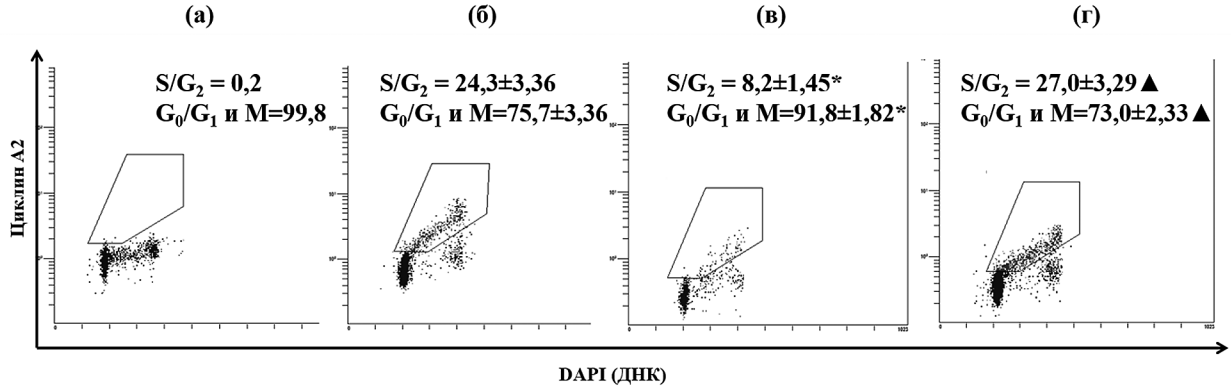


**Рисунок 1.** Репрезентативный дот-плот (циклин А2 vs DAPI), отражающий распределение клеток по фазам клеточного цикла. а – контроль изотипических антител, б – культуральная среда, в – СРС М49-16, г – СРС М49-16del*ArcA*.
**Примечание:** Представлена доля клеток в соответствующих фазах клеточного цикла (M±m,%), n=6. * Отличия от контроля достоверны при p<0,05; ▲ отличия достоверны от СРС М49-16 при p<0,05.

вой фактор CD142. При этом был выявлен низкий уровень экспрессии адгезионных молекул CD106 (VCAM-1), CD54 (ICAM-1), VEGFR-2 и высокий спонтанный уровень экспрессии адгезионной молекулы CD146 (MCAM). В качестве стандартного активатора ЭК использовали провоспалительный цитокин TNFα. В присутствии TNFα происходило значительное повышение экспрессии адгезионных молекул VCAM-1, ICAM-1 и слабое, но достоверное повышение уровня экспрессии VEGFR-2. Уровень экспрессии других исследуемых маркеров достоверно не изменялся (**Рисунок 2, д**).

Инкубация HUVEC в присутствии СРС исходного штамма (**Рисунок 2, в**) приводила к достоверному усилению экспрессии CD62P, адгезионной молекулы ICAM-1 и тканевого фактора CD142. Уровень экспрессии адгезионной молекул VCAM-1 в присутствии СРС исходного штамма повышался незначительно, и это изменение не было статистически достоверно. Уровень экспрессии MCAM и VEGFR-2 в присутствии СРС исходного штамма не изменялся.

СРС мутантного штамма не оказывал статистически значимого влияния на уровень экспрессии исследуемых молекул (**Рисунок 2, г**).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в данном исследовании результаты показали, что АД в составе СРС является фактором, который вызывает усиление адгезионной и прокоагуляторной активности ЭК. В присутствии СРС исходного штамма на эндотелиальных клетках усиливалась экспрессия адгезионных молекул Р-селектина, ICAM-1, а также тканевого фактора. При этом СРС изогенного мутанта с инактивированным геном АД таким действием не обладал. Известно, что Р-селектины опосредуют роллинг лейкоцитов на поверхности ЭК, а адгезионные молекулы иммуноглобулинового суперсемейства ICAM-1 и VCAM-1 участвуют в прочной адгезии и трансэндотелиальной миграции лейкоцитов в очаг воспаления [7]. Активация эндотелия сопровождается усилением процессов коагуляции, что выражается в повышении экспрессии тканевого фактора на ЭК, продукции фибрина и, в совокупности, приводит к тромбозу [11]. Адгезионная молекула MCAM локализуется преимущественно на латеральной поверхности ЭК и участвует в формировании межклеточных контактов, регулирует адгезию и трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов. Установлено, что снижение уровня экспрессии MCAM на ЭК приводит к повышению проницаемости сосудистого эндотелия [12]. Наши исследования показали, что при культивировании HUVEC в присутствии СРС исходного штамма и его изогенного мутанта не происходило достоверного изменения уровня экспрессии MCAM.

Характерное для сердечно-сосудистых заболеваний воспаление в эндотелиальной выстилке сосудов зачастую сопровождается снижением уровня L-аргинина в плазме [13]. При гипертонии, диабете и дислипидемии повышается экспрессия тканевого фактора на ЭК (CD142) [14]. Повышенная экспрессия на ЭК ICAM-1, VCAM-1, Р-селектина, наблюдает-

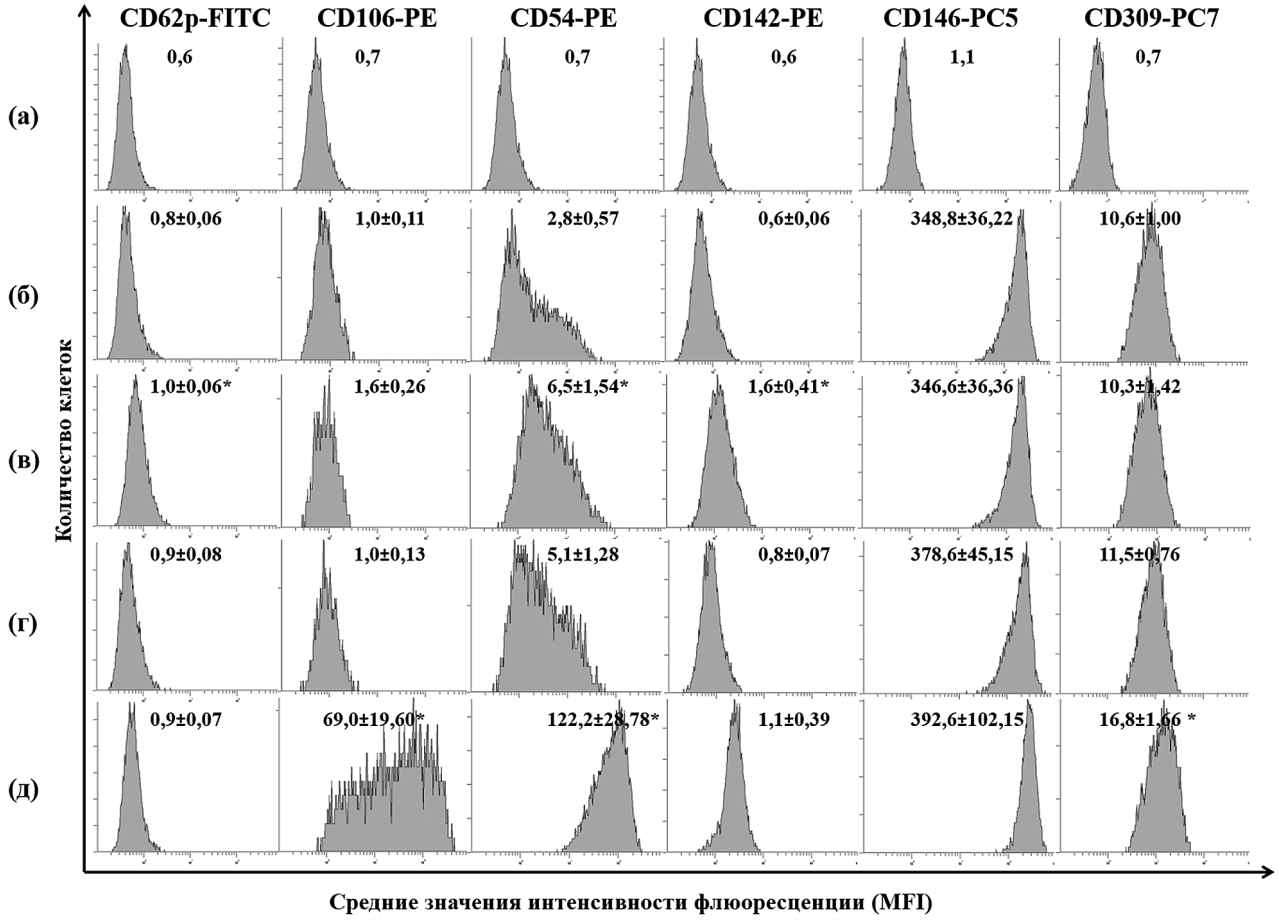


**Рисунок 2.** Репрезентативный дот-плот, отражающий уровень экспрессии поверхностных маркеров на HUVEC. а – контроль изотипических антител, б – культуральная среда, в – СРС М49-16, г – СРС М49-16del*ArcA*, д – TNFα (50 ед/мл).

**Примечание:** Представлены средние значения интенсивности флуоресценции (M±m), n=5; *-отличия от контроля достоверны при $p<0,05$.

ся при атеросклеротических поражениях, как у животных, так и у людей [15, 16]. В тоже время существуют исследования, в которых показано, что под влиянием L-аргинина снижается стимулированная IL-1β экспрессия на HUVEC адгезионных молекул ICAM-1 и VCAM-1 [17]. В работе Yang et al. было установлено, что L-аргинин подавляет экспрессию тканевого фактора в культуре HMEC (human microvascular endothelial cells) [18]. Полученные в данном исследовании результаты согласуются с данными других исследований, и указывают на возможную роль L-аргинина в регуляции экспрессии активационных маркеров на эндотелии.

Одним из механизмов активации эндотелия в условиях дефицита L-аргинина может быть нарушение активности эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS). L-аргинин является единственным субстратом eNOS. Установлено, что дефицит L-аргинина приводит к диссоциации субъединиц этого фермента, вследствие чего снижается синтез NO и повышается продукция активных форм кислорода [19]. АФК в низких концентрациях действуют как сигнальные молекулы, но их гиперпродукция приводит к развитию воспаления и повышению экспрессии адгезионных молекул на ЭК [20]. В исследовании Patel et al. на HUVEC было показано, что культивирование клеток в присутствии $H_2O_2$ сопровождалось усилением экспрессии P-селектина [21]. Установлена прямая корреляция между усилением оксидативного стресса в сосудистой стенке и повышением экспрессии ICAM-1 и VCAM-1 на ЭК у пациентов с гипергликемией и инсулин-независимым диабетом [22, 23]. Показано, что повышенная продукция АФК при сердечно-

сосудистых заболеваниях, таких как атеросклероз, гиперхолестеринемия, гипертония может приводить к усилению воспаления и коагуляции [24–26].

Обнаруженное в наших исследованиях снижение пролиферативной активности HUVEC под влиянием АД указывает на возможную роль этого фермента в развитии эндотелиальной дисфункции при инфекции. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла, показал, что СРС исходного штамма подавлял пролиферативную активность HUVEC, тогда как СРС мутантного штамма не влиял на исследуемую функцию. Предполагают, что снижение пролиферации ЭК под влиянием АД происходит в результате аргинингидролазной активности фермента из-за истощения L-аргинина [27, 28]. Вследствие деплеции этой аминокислоты, в ЭК происходит угнетение процессов адгезии, пролиферации, миграции, подавление формирования капилляроподобных структур на матригеле, что было показано как в наших собственных исследованиях, так и в работах других авторов [3, 27–31]. Park et al. при изучении влияния АД, выделенной из *Mycoplasma spp*. на HUVEC, обнаружили, что пролиферация клеток и синтез NO в условиях дефицита L-аргинина подавляются. Внесение избытка L-аргинина приводит к восстановлению этих показателей [27].

Регуляция процессов пролиферации ЭК происходит с участием рецептора VEGFR2, который осуществляет трансдукцию сигналов от ростовых факторов [32]. Наши эксперименты показали, что экспрессия рецептора VEGFR-2 при инкубации HUVEC в присутствии СРС обоих штаммов не изменялась. Эти результаты указывают на то, что в подавлении пролиферации ЭК под влиянием АД задействованы другие механизмы. Предполагают, что снижение пролиферации ЭК может быть связано с дефицитом L-аргинина в качестве предшественника NO [27], пролина [33], полиаминов [4] и агматина [34]. Повышенная продукция АФК при дефиците субстрата для eNOS [35] и нарушение посттрансляционного аргинилирования белков цитоскелета также может быть причиной ингибиции пролиферативной активности ЭК [36]. Дефицит L-аргинина может приводить к ингибиции mTOR внутриклеточного сигнального пути и переключению метаболизма с гликолиза на окислительное фосфорилирование, ингибиции процессов, связанных с ангиогенезом, в том числе и пролиферации [5, 6].

## ВЫВОДЫ

Сравнение влияния СРС исходного штамма *S. pyogenes* и его изогенного мутанта с инактивированным геном аргининдеиминазы на поверхностный фенотип и пролиферативную активность ЭК показало, что АД может являться фактором, который приводит к старению клеток, эндотелиальной дисфункции из-за развития тромбозов и воспаления.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES


1. *Cusumano Z. T., Watson M. E. Jr., Caparon M. G.*. *Streptococcus pyogenes* arginine and citrulline catabolism promotes infection and modulates innate immunity. Infection and Immunity 2014, 82(1), 233–242.
2. *Gallego P., Planell R., Benach J., Querol E., Perez-Pons J. A., Reverter D.* Structural characterization of the enzymes composing the arginine deiminase pathway in Mycoplasma penetrans. PLoS One 2012, 7(10), e47886.
3. *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. Biochemistry and Cell Biology 2016, 94(2), 129–37.
4. *Morris S. M. Jr.* Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. Journal of Nutrition 2007, 137(6), 1602S-1609S.
5. *Saxton R. A., Sabatini D. M.* mTOR signaling in Growth, Metabolism, and Disease. Cell 2017, 168(6), 960–976.
6. *Laplante M., Sabatini D. M.* mTOR signaling in growth control and disease. Cell 2012, 149(2), 274–293.
7. *Danese S., Dejana E., Fiocchi C.* Immune Regulation by Microvascular Endothelial Cells: Directing Innate and Adaptive Immunity, Coagulation, and Inflammation. Journal of Immunology 2007, 178(10), 6017–6022.
8. *Bochenek M. L., Schütz E., Schäfer K.* Endothelial cell senescence and thrombosis: Ageing clots. Thrombosis Research 2016, 147, 36–45.
9. *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* M49-16 в ингибиции пролиферации эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926. Медицинская иммунология 2016, 18(6), 555–562. [*Starikova E., Karaseva A., Burova L., Suvorov A., Sokolov A., Vasilyev V., Freydlin I.* Role of *Streptococcus pyogenes* M49-16 arginine deiminase in inhibition proliferation of human endothelial cell line EA.hy926. Medical Immunology, 2016, 18(6) 555–562]
10. *Baudin B., Bruneel A., Bosselut N., Vaubourdolle M.* A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. Nature Protocols 2007, 2, 481–485.
11. *O'Reilly F. M., Casper K. A., Otto K. B., Sexton S. A., Swerlick R. A.* Regulation of tissue factor in microvascular dermal endothelial cells. Journal of Investigative Dermatology 2003, 120(3), 489–494.

12. *Kratzer A., Chu H. W., Salys J., Moumen Z., Leberl M., Bowler R., Cool C., Zamora M., Taraseviciene-Stewart L.* Endothelial cell adhesion molecule CD146: implications for its role in the pathogenesis of COPD. Journal of Pathology 2013, 230(4), 388–398.
13. *Rosenthal M. D., Carrott P. W., Patel J., Kiraly L., Martindale R. G.* Parenteral or Enteral Arginine Supplementation Safety and Efficacy. Journal of Nutrition 2016, 146(12), 2594S-2600S
14. *Breitenstein A., Tanner F. C., Lüscher T. F.* Tissue Factor and Cardiovascular Disease. Circulation Journal 2010, 7 (1), 3.
15. *Sakai A., Kume N., Nishi E., Tanoue K., Miyasaka M., Kita T.* P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are focally expressed in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocytes. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 1997; 17, 310–316.
16. *Davies M. J., Gordon J. L., Gearing A. J., Pigott R., Woolf N., Katz D., Kyriakopoulos A.* The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. Journal of Pathology 1993, 171, 223–229.
17. *Adams M. R., Jessup W., Hailstones D., Celermajer D. S.* L-arginine reduces human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial expression of cell adhesion molecules. Circulation 1997, 95(3), 662–668.
18. *Yang Y., Loscalzo J.* Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. Circulation 2000, 101, 2144–2148
19. *Romero M., Jiménez R., Sánchez M., López-Sepúlveda R., Zarzuelo M. J., O'Valle F., Zarzuelo A., Pérez-Vizcaíno F., Duarte J.* Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. Atherosclerosis 2009, 202, 58–67.
20. *Kim S. R., Bae Y. H., Bae S. K., Choi K. S., Yoon K. H., Koo T. H., Jang H. O., Yun I., Kim K. W., Kwon Y. G., Yoo M. A., Bae M. K.* Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. Biochimica et Biophysica Acta 2008, 1783 (5), 886–895.
21. *Patel H., Chen J., Kavdia M.* Induced peroxidase and cytoprotective enzyme expressions support adaptation of HUVECs to sustain subsequent H2O2 exposure. Microvascular Research 2016, 103, 1–10.
22. *Ceriello A., Novials A., Ortega E., La S. L., Pujadas G., Testa R., Bonfigli A. R., Esposito K., Giugliano D.* Evidence that hyperglycemia after recovery from hypoglycemia worsens endothelial function and increases oxidative stress and inflammation in healthy control subjects and subjects with type 1 diabetes. Diabetes 2012, 61, 2993–2997.
23. *Nappo F., Esposito K., Cioffi M., Giugliano G., Molinari A. M., Paolisso G., Marfella R., Giugliano D.* Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. Journal of the American College of Cardiology 2002, 39, 1145–1150.
24. *Huo Y., Ley K.* Adhesion molecules and atherogenesis. Acta Physiologica Scandinavica 2001, 173, 35–43.
25. *Krieglstein C. F., Granger D. N.* Adhesion molecules and their roles in vascular disease. American Journal of Hypertension 2001, 14, 44S-54S.
26. *Blann A. D., Nadar S. K., Lip G. Y. H.* The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. European Heart Journal 2003, 24(24), 2166–2179.
27. *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 Cancer2003, 89(5), 907–914.
28. *Beloussow K., Wang L., Wu J., Ann D., Shen W. C.* Recombinant arginine deiminase as a potential antiangiogenic agent. Cancer Letters 2002, 183(2), 155–162.
29. *Старикова Э. А., Маммедова Дж. Т., Бурова Л. А., Соколов А. В., Васильев В. Б., Фрейдлин И. С.* Влияние аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes* на миграционную активность и структуру цитоскелета эндотелиальных клеток человека. Медицинская Иммунология 2017, 19(5), 521–528. [*Starikova E. A., Mammedova J. T., Burova L. A., Sokolov A. V., Vasilyev V. B., Freidlin I. S.* The effect of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* on migration activity of the human endothelial cells and their cytoskeleton structure. Medical Immunology 2017, 19(5), 521–528].
30. *Старикова Э. А., Лебедева А. М., Бурова Л. А., Фрейдлин И. С.* Изменение функциональной активности эндотелиальных клеток под влиянием лизата *S. pyogenes*. Цитология 2012, 54, (1) 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*. Tsitologiia 2012, 54(1), 49–57.]
31. *Маммедова Дж. Т., Старикова Э. А., Бурова Л. А., Малашичева А. Б., Семёнова Д. С., Фрейдлин И. С.* Влияние аргининдеиминазы *S. pyogenes* на пролиферативную и миграционную активность эндотелиальных клеток вены пупочного канатика человека// Цитокины и воспаление 2017, 3, 48–51. [*Mammedova J. T., Starikova E. A., Burova L. A., Malashicheva A. B., Semenova D. S., Freidlin I. S.* The effect of arginine deiminase from *S. pyogenes* on the proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells. Cytokines and inflammation 2017, 3, 48–51.]
32. *Shibuya M.* Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E. Endothelium 2006, 13(2), 63–69.
33. *Grillo M. A., Colombatto S.* Arginine revisited: minireview article. Amino Acids 2004, 26(4), 345–51.
34. *Grillo M. A., Colombatto S.* Metabolism and function in animal tissues of agmatine, a biogenic amine formed from arginine. Amino Acids 2004, 26(1), 3–8.
35. *Förstermann U., Li H.* Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. British Journal of Pharmacology 2011, 164(2), 213–23.
36. Kwon, Y.T., Kashina, A.S., Davydov, I.V., Hu, R.G., An, J.Y., Seo, J.W., Du, F., Varshavsky, A. An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development. Science 2002, 297(5578), 96–99.

# THE EFFECT OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ARGININE DEIMINASE ON HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS PROLIFERATION AND ACTIVATION MARKERS EXPRESSION

**© 2019 J. T. Mammedova[1,2]*, L. A. Burova[1], A. B. Malashicheva[3,4], D. S. Semenova[3,4], I. S. Freidlin[1,5], E. A. Starikova[1,5]**

**E-mail: jennet_m@mail.ru*
*[1]FSBSI "Institute of Experimental Medicine", Saint-Petersburg, Russia;*
*[2]St. Petersburg State Technological University (Technical University), Saint-Petersburg, Russia;*
*[3]FSBSI "Almazov National Medical Research Centre", Saint-Petersburg, Russia;*
*[4]St. Petersburg University, Saint-Petersburg, Russia;*
*[5]Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia;*

**Received:** 18.05.2019. **Accepted:** 26.06.2019

Arginine is an important nutrient involved in the regulation of homeostasis, vascular tone, as well as the development of inflammation and immune response. Arginine deficiency caused by bacterial arginine-deiminase can lead to endothelial dysfunction. In the present study, using the Supernatants of Destroyed Streptococcal Cells (SDSCs) of the original strain (*S. pyogenes* M49-16) and its isogenic mutant with the inactivated gene of arginine-deiminase *ArcA* (M49-16del*ArcA*), the effect of arginine deiminase on the proliferative activity and expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was evaluated. Cell distribution by cell cycle phases and expression of surface molecules were investigated by flow cytometry using monoclonal antibodies. It was shown that the original strain SDSC significantly reduced the proliferative activity of HUVEC and increased the expression of adhesion molecules CD62P, ICAM-1 and tissue factor CD142. The SDSC of the mutant strain did not have any effect. In the presence of supernatants of both strains, the expression of VEGFR-2 receptor did not change. The results showed that streptococcal arginine deiminase promotes development of endothelial dysfunction, inflammation, and coagulation.

*Key words*: HUVEC, L-arginine, arginine deiminase, *Streptococcus pyogenes*, proliferation, adhesion molecules

**Authors:**

**Mammedova J. T.**, ✉ post-graduate student of St. Petersburg State Technological University (Technical University), Junior scientific researcher, Dept. of immunology, FSBSI "Institute of Experimental Medicine", Saint-Petersburg, Russia;
197376, Saint-Petersburg, Academic Pavlov st., 12, FSBSI "Institute of Experimental Medicine". Phone: +7(812)234-6868, **E-mail:** jennet_m@mail.ru;

**Burova L. A.**, MD, Leading Researcher scientific researcher, Dept. of molecular microbiology of FSBSI "Institute of Experimental Medicine", Saint-Petersburg, Russia;

**Malashicheva A. B.**, PhD, Group Leader, Laboratory of Molecular Cardiology, Federal Almazov Medical Research Centre, Associate Professor, Dept. of Embryology, Biological Faculty, St.-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia;

**Semenova D. S.**, post-graduate student of St.-Petersburg University, Laboratory Technician Researcher Laboratory of Molecular Cardiology, Federal Almazov Medical Research Centre, Junior Researcher, Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology, RAS, Saint-Petersburg, Russia;

**Freidlin I. S.**, MD, corresponding member of RAS, Professor, Chief scientific researcher, Dept. of immunology, FSBSI "Institute of Experimental Medicine", professor, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia;

**Starikova E. A.**, PhD, Senior scientific researcher, Dept. of immunology, FSBSI "Institute of Experimental Medicine", assistant professor, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia.