

DOI: <https://doi.org/10.17816/C1646331>

Влияние стрептококковой аргининдеиминазы на дифференцировку Th17-лимфоцитов *in vitro*

Э.А. Старикова^{1, 2, 3}, Дж.Т. Маммедова^{1, 4}, А.В. Соколов⁵, А.А. Рубинштейн¹, Е.Ю. Егидарова¹, А.М. Якупов^{1, 4}, Н.Ш. Абдулкадырова⁴, И.В. Кудрявцев¹

¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

³ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия;

⁵ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородиной, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. mTOR/S6K-метаболический внутриклеточный сигнальный каскад играет ключевую роль в регуляции активации и дифференцировки Th17-/Treg-популяций лимфоцитов. Патогенные микробы, используя механизм истощения аргинина, могут нарушать программу дифференцировки Т-лимфоцитов и снижать эффективность иммунного ответа.

Цель исследования — оценка влияния бактериального аргинин-гидролизующего фермента аргининдеиминазы на баланс поляризации Th17-/Treg-популяций Т-хелперов *in vitro*.

Материалы и методы. Эксперименты проводили с использованием мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров. Активацию и дифференцировку лимфоцитов осуществляли с помощью активирующих антител и коктейля цитокинов. В работе использовали рекомбинантную аргининдеиминазу *Streptococcus pyogenes*. Аргинин-гидролизующую активность фермента подтверждали с помощью модифицированного метода Сакагучи. В ММТ-тесте анализировали активность процессов окислительного фосфорилирования. Долю клеток Th17, Treg, а также клеток переходной популяции IL-17A⁺/Foxp3⁺ лимфоцитов оценивали с использованием моноклональных антител и проточной цитометрии.

Результаты. Было установлено, что фермент вызывал достоверное семикратное снижение концентрации аргинина в культуре мононуклеарных лейкоцитов. Дефицит аргинина, вызванный активностью аргининдеиминазы, не удалось компенсировать даже за счёт добавки супрафизиологической концентрации аминокислоты. В ходе дифференцировки происходило достоверное снижение процессов окислительного фосфорилирования ($p < 0,001$). Аргининдеиминаза подавляла митохондриальное дыхание как в интактных ($p < 0,001$), так и в дифференцированных клетках ($p < 0,05$). Активность фермента ингибировала дифференцировку Th17-клеток ($p < 0,05$), но не влияла на долю переходных IL-17A⁺/Foxp3⁺ клеток, Treg-лимфоцитов и соотношения Th17/Treg.

Заключение. Аргининдеиминаза может нарушать программу развития адаптивного иммунитета и снижать эффективность защитных реакций.

Ключевые слова: аргинин; аргининдеиминаза; *Streptococcus pyogenes*; Т-лимфоциты; дифференцировка; Th17-клетки; Treg-клетки.

Как цитировать:

Старикова Э.А., Маммедова Дж.Т., Соколов А.В., Рубинштейн А.А., Егидарова Е.Ю., Якупов А.М., Абдулкадырова Н.Ш., Кудрявцев И.В. Влияние стрептококковой аргининдеиминазы на дифференцировку Th17-лимфоцитов *in vitro* // Цитокины и воспаление. 2024. Т. 21, № 2. С. 111–120. DOI: <https://doi.org/10.17816/C1646331>

DOI: <https://doi.org/10.17816/Ci646331>

The effect of streptococcal arginine deiminase on Th17 lymphocyte differentiation *in vitro*

Eleonora A. Starikova^{1,2,3}, Jennet T. Mammedova^{1,4}, Alexey V. Sokolov⁵, Artem A. Rubinshtein¹, Elena Yu. Egidarova¹, Arslan M. Yakupov^{1,4}, Nazkhanum Sh. Abdulkadyrova⁴, Igor V. Kudryavtsev¹

¹ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

² I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia;

³ V.A. Almazov National Medical Research Center, Saint Petersburg, Russia;

⁴ Saint-Petersburg State Institute of Technology (Technical University), Saint Petersburg, Russia;

⁵ Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: The mTOR/S6K metabolic intracellular signaling cascade plays a key role in regulating the activation and differentiation of Th17/Treg lymphocyte populations. Pathogens can disrupt T-lymphocyte differentiation programs and weaken immune responses through arginine depletion mechanisms.

AIM: To evaluate the effect of bacterial arginine-hydrolyzing enzyme arginine deiminase on the balance of Th17/Treg helper T-cell polarization *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS: Experiments were conducted using mononuclear leukocytes from healthy donors. Lymphocyte activation and differentiation were induced with activating antibodies and a cytokine cocktail. Recombinant *Streptococcus pyogenes* arginine deiminase was used. The enzyme's arginine-hydrolyzing activity was confirmed by a modified Sakaguchi method. Mitochondrial oxidative phosphorylation activity was analyzed via MTT assay. The proportion of Th17, Treg, and IL-17A⁺/Foxp3⁺ transitional lymphocyte populations was assessed using monoclonal antibodies and flow cytometry.

RESULTS: The enzyme caused a significant sevenfold decrease in arginine concentration in mononuclear leukocyte cultures. The arginine deficiency induced by arginine deiminase activity could not be compensated even by supplementing supraphysiological concentrations of the amino acid. Differentiation was accompanied by a significant reduction in oxidative phosphorylation ($p < 0.001$). Arginine deiminase inhibited mitochondrial respiration in both intact ($p < 0.001$) and differentiated cells ($p < 0.05$). The enzyme's activity suppressed Th17 cell differentiation ($p < 0.05$) but did not affect IL-17A⁺/Foxp3⁺ transitional cells, Treg lymphocytes, or the Th17/Treg ratio.

CONCLUSIONS: Arginine deiminase may disrupt adaptive immune development and diminish the effectiveness of protective immune responses.

Keywords: arginine; arginine deiminase; *Streptococcus pyogenes*; T-lymphocytes; differentiation; Th17 cells; Treg cells.

To cite this article:

Starikova EA, Mammedova JT, Sokolov AV, Rubinshtein AA, Egidarova EYu, Yakupov AM, Abdulkadyrova NSh, Kudryavtsev IV. The effect of streptococcal arginine deiminase on Th17 lymphocyte differentiation *in vitro*. *Cytokines and Inflammation*. 2024;21(2):111–120. DOI: <https://doi.org/10.17816/Ci646331>

ОБОСНОВАНИЕ

CD4⁺ Т-лимфоциты (Th) — ключевые клетки системы приобретённого иммунитета, которые определяют стратегию иммунного ответа. Регуляция Т-клеточных функций является важным фактором поддержания толерантности к собственным антигенам, а также играет ключевую роль в защитных реакциях на патогены и в противоопухолевом иммунном ответе [1]. В частности, нарушение баланса дифференцировки Th17-эффекторных и Т-регуляторных (Treg) популяций лежит в основе развития аутоиммунных заболеваний [2–4], патологии беременности (преэклампсии) [5], аутизма [6] и опухолевых процессов [7]. Активация Th17 и повышенная продукция IL-17 описаны у пациентов, инфицированных вирусами MERS-CoV и SARS-CoV [8]. Примечательно, что на ранних этапах дифференцировки в периферических лимфоидных органах Th17-клетки и периферические Treg имеют общую клетку-предшественницу («наивную» CD4⁺ Т-клетку), а также нуждаются в сигнале от трансформирующего ростового фактора (TGF)-β, однако по завершении дифференцировки выполняют противоположные функции — про- и противовоспалительные соответственно [9]. Th17 посредством продукции цитокинов поддерживают воспаление нейтрофильного типа, направленное на элиминацию внеклеточных бактерий и грибов. Кроме того, Th17 и Treg обладают «пластичностью» и могут, в зависимости от цитокинов в очаге воспаления, трансдифференцироваться друг в друга [10]. Высокие концентрации экзогенных цитокинов, продуцируемые Th17, могут превращать Treg в клетки, секретирующие IL-17. При этом Treg теряют экспрессию транскрипционного фактора Foxp3, регулирующего их дифференцировку, и приобретают воспалительную функцию. Некоторые исследования также показывают, что во время трансдифференцировки Th17 в Treg образуются клетки с промежуточным фенотипом, которые являются дважды положительными по Foxp3 и IL-17 [10].

В настоящее время биологическая доступность аргинина рассматривается как одна из возможных стратегий регуляции иммунных реакций. Подавление функциональной активности Т-клеток в условиях истощения аргинина считается физиологическим фактором, снижающим численность и функциональную активность Т-лимфоцитов [11, 12]. Значимость этого механизма также подтверждают исследования, в которых установлено, что катаболизм аргинина опосредует взаимодействия клеток иммунной системы, опухолевых клеток и патогенных микробов с клетками иммунной системы в очаге воспаления [13]. Кроме того, аргинин-зависимые механизмы иммуносупрессии, связанные с повышенной аргиназной активностью CD71⁺ клеток эритроидного роста, были описаны у беременных женщин [14] и недоношенных новорождённых [15–17].

Следует отметить, что mTOR/S6K-метаболический внутриклеточный сигнальный каскад, который регулирует

активацию и дифференцировку лимфоцитов [18], интегрирует сигналы от провоспалительных цитокинов, ростовых факторов, а также сигналы биологической доступности нутриентов в микроокружении клеток [19]. Аргинин является сигнальной молекулой, которая способна активировать сигнальный каскад mTOR/S6K [20, 21]. Патогенные микробы за счёт истощения аргинина [22] могут создавать дефицит этой аминокислоты, нарушать mTOR/S6K-метаболическую регуляцию дифференцировки Т-лимфоцитов и снижать эффективность иммунного ответа как на местном, так и на системном уровне.

Цель исследования — оценка влияния бактериальной аргининдеиминазы (АДИ) на баланс поляризации Th17-/Treg-популяций Т-хелперов *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и культивирование мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека

Для проведения экспериментов *in vitro* при помощи градиентного центрифугирования с использованием фиколла (Биолот, Россия) плотностью 1,077 г/мл получали фракцию мононуклеарных лейкоцитов по общепринятой методике (400 g, 40 мин при 21 °C). Затем клетки собирали и дважды отмывали (300 g, 15 мин при 4 °C) избытком раствора Версена (Биолот, Россия). Подсчёт живых клеток осуществляли при помощи камеры Горяева, окрашивая погибшие клетки 0,2% раствором трипанового синего (в экспериментах использовали образцы мононуклеарных клеток, в которых доля негативных по трипановому синему клеток составляла не менее 98%). Затем клетки переносили в полную культуральную среду, приготовленную на основе среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 2 mM глутамин и 50 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия), 50 мкM β-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США), а также 10% инактивированной эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Invitrogen, США), получая итоговую концентрацию клеток, равную 1 млн/мл. Дальнейшее культивирование клеток осуществляли в культуральных флаконах (Jet Biofil, Китай) в CO₂-инкубаторе (37 °C, 5% CO₂, влажная атмосфера).

Индукция дифференцировки Th17

Для активации клеток использовали набор реагентов T Cell Activation/Expansion Kit (Miltenyi Biotec Inc., GmbH, Германия), содержащий в своём составе латексные частицы, покрытые антителами к биотину, и биотинилированные антитела против поверхностных молекул CD2, CD3 и CD28 для активации Т-лимфоцитов. Клетки культивировали в чашках Петри размером 35×10 мм (Nunc, Германия) в присутствии рекомбинантной АДИ *Streptococcus pyogenes* в концентрации 40 нМ, полученной в отделе молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной

медицины», как описано в [23, 24]. Для подтверждения зависимости исследуемых эффектов от биодоступности аргинина в некоторые лунки вносили L-аргинин (Sigma-Aldrich, США) в супрафизиологических концентрациях (2 мМ). Каждые 3 дня культивирования проводили замену половины среды с добавками соответствующих факторов. Через 7 дней культивирования для индукции дифференцировки Th17-лимфоцитов в культуры вносили коктейль цитокинов: человеческий рекомбинантный IL-1 β , человеческий рекомбинантный IL-6, человеческий рекомбинантный TGF- β 1 (все производства HiMedia, Индия), человеческий рекомбинантный IL-23 (R&D Systems, США), блокирующие антитела anti-IFN- γ и anti-IL-4 (все реагенты производства Miltenyi Biotec, США) — и культивировали ещё 5 дней. Каждые 3 дня культивирования половину объёма клеточной суспензии переносили в новые чашки Петри, содержащие свежую среду с добавками соответствующих факторов. Клеточные суспензии собирали в микропробирки объёмом 0,5 мл (Sarstedt, Германия) и использовали для анализа доли Th17- и Treg-лимфоцитов.

Анализ доли Th17 и Treg

Клетки осаждали центрифугированием (7 мин, 330 g), ресуспендировали в забуференном фосфатами солевом растворе (ЗФР), после чего окрашивали коктейлем антител мыши против поверхностных антигенов человека следующего состава: CD4-APC (cat. 317415, BioLegend, США), CD3-APC/Cyanine7 (cat. 344817, BioLegend, США), а также набором для выявления живых клеток Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (cat. 423101, BioLegend, США). После окраски пробы инкубировали 15 мин при комнатной температуре в защищённом от света месте. Далее в образцы добавляли 4,5 мл ЗФР, после чего осаждали центрифугированием (7 мин, 330 g). Затем клетки фиксировали при помощи набора Fixation/Permeabilization™ buffer (cat. 554722, BD Biosciences, США) на протяжении 20 мин при 4 °C, после чего во все пробы для пермеабилзации клеток вносили по 1 мл Perm/Wash™ buffer (cat. 554723, BD Biosciences, США). Пробы дважды центрифугировали (7 мин, 330 g, при комнатной температуре). Затем клетки ресуспендировали в 50 мкл Perm/Wash™ buffer (cat. 554723, BD Biosciences, США) с последующей окраской коктейлем антител мыши против внутриклеточных антигенов человека следующего состава: FoxP3-AlexaFluor488 (cat. 320112, BioLegend, США), IL-17A-AlexaFluor647 (cat. 512310, BioLegend, США). Окраску внутриклеточными антителами проводили 30 мин в защищённом от света месте при 4 °C, после чего все образцы дважды отмывали (7 мин, 330 g) 1 мл Perm/Wash™ buffer (cat. 554723, BD Biosciences, США). По завершении второй отмывки клеточный осадок переводили в фиксирующий раствор на основе ЗФР с 2% нейтрального формалина (Sigma-Aldrich, США). Измерение параметров проводили на проточном цитометре Navios™ 3/10 (Beckman Coulter, США), анализируя не менее 40 000 одиночных клеток в каждом образце.

Оценка активации лейкоцитов периферической крови человека в МТТ-тесте

В рамках отдельной серии экспериментов при помощи МТТ-теста проводили оценку влияния стрептококковой АДИ на активность митохондриальных дегидрогеназ. При постановке реакции в лунки 24-луночного плоскостонного планшета (Nunc, Германия) вносили по 100 мкл суспензии клеток (1 млн/мл). АДИ вносили в концентрации 40 нМ. Для восполнения дефицита аргинина вносили 2 мМ L-аргинина (Sigma, США). За 4 ч до завершения эксперимента во все лунки планшетов добавляли раствор МТТ (0,5 мг/мл, Sigma-Aldrich, США). По завершении инкубации для разрушения клеток и экстракции гранул формазана в лунки вносили по 100 мкл лизирующего буфера, приготовленного на основе 0,01N соляной кислоты с добавлением 10% додецилсульфата натрия (Serva, Германия). Время инкубации с лизирующим раствором составляло 18 ч при 37 °C. Оптическую плотность оценивали при помощи спектрофотометрии (длина волны — 570 нм). Результаты МТТ-теста выражали в процентах, принимая за 100% оптическую плотность контрольных лунок.

Анализ концентрации аргинина в надосадках клеточных культур

Для анализа концентрации L-аргинина в культуральной среде применяли методику Сакагучи, согласно протоколу, описанному ранее [25]. Надосадки, полученные после центрифугирования, смешивали с равными объёмами следующих растворов: 10% раствор ZnSO $_4$ ·7H $_2$ O (ЛенРеактив, Россия), 0,5 М NaOH (ЛенРеактив, Россия) и 6% BSA (Sigma-Aldrich, США). Полученные образцы центрифугировали (5 мин, 13 000 g) в 0,5 мл микропробирках (Sarstedt, Германия), после чего по 20 мкл надосадочной жидкости из каждого образца перемещали в 96-луночные плоскостонные планшеты (Sarstedt, Германия). Для определения уровня L-аргинина в лунки планшета вносили по 100 мкл 5 мМ C $_6$ H $_7$ NO и 200 мкл 8 мМ NaBrO в 2 М NaOH. В качестве контроля применяли 6% раствор бычьего сывороточного альбумина, а при получении калибровочного графика для расчёта концентраций аргинина в образцах — серию проб гидрохлорида аргинина в диапазоне 0,31–4 мМ. Оптическую плотность измеряли при помощи планшетного спектрофотометра при 495 нм ClarioStar (BMG Labtech, Германия). Калибровочную кривую и определение концентраций аргинина в культуральной среде проводили при помощи пакета программ Mars ClarioStar (BMG Labtech, Германия).

Этическая экспертиза

Исследование проводили с использованием образцов периферической крови условно здоровых добровольцев (возраст — 20–50 лет). Данное исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (протокол № 3/22 от 23.06.2022).

Статистический анализ

Обработку данных проточной цитометрии проводили с помощью пакета программ Kaluza Analysis 2.1 (Beckman Coulter, США), формирование баз данных для статистической обработки — с помощью Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, США), статистическую обработку полученных результатов — с помощью программ Statistica 12.0 (Statsoft, США) и GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Для анализа нормальности распределения выборки использовали критерий Шапиро—Уилка, достоверности различий определяли при помощи критерия Краскела—Уоллиса, а для поиска попарных достоверных различий использовали критерий Данна. Результаты представляли как медиану [25 квартиль; 75 квартиль] (Me [Q25; Q75]). Различия определяли как значимые при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе предварительных исследований проводили оценку способности АДИ истощать аргинин в культуре мононуклеарных клеток периферической крови человека. Было установлено, что в надосадках клеточных культур, которые инкубировались в стандартных условиях, концентрация аминокислоты составляла 353,1 [332,0; 369,9] мкМ и сохранялась на этом же уровне после индукции дифференцировки клеток (рис. 1). Внесение АДИ приводило к достоверному семикратному снижению концентрации аргинина вне зависимости от других условий культивирования. Введение добавки аргинина при каждой смене среды (каждые 3–4 дня) в количестве, значительно выше физиологических значений (2 мМ), не приводило к статистически значимому изменению уровня аминокислоты в культуральной среде. Таким образом, дефицит аргинина, вызванный активностью АДИ, не удалось компенсировать за счёт добавки супрафизиологической концентрации субстрата.

Известно, что дифференцировка лимфоцитов в эффекторные клетки сопровождается перестройками

метаболизма, повышением уровня гликолиза и снижением уровня окислительного фосфорилирования, поэтому были проведены эксперименты по изучению влияния АДИ на активность митохондриальных дегидрогеназ — параметра, косвенно отражающего мембранный потенциал митохондрий. Было установлено, что в условиях дифференцировки происходило достоверное снижение активности митохондриальных дегидрогеназ по сравнению с контролем (табл. 1). АДИ подавляла активность ферментов митохондрий в интактных клетках (контроль), а также достоверно снижала этот показатель в дифференцированных клетках. Добавка аргинина оказывала достоверное ингибирующее действие только на активность митохондриальных дегидрогеназ клеток в контроле.

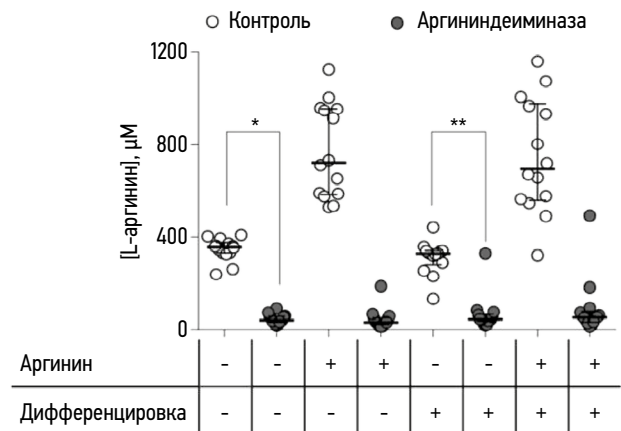


Рис. 1. Влияние стрептококковой аргининдеиминазы на концентрацию аргинина в культуральной среде мононуклеарных лейкоцитов периферической крови. Данные анализировали с помощью теста Краскела—Уоллиса, парные множественные сравнения проводили с использованием апостериорного критерия Данна. Данные представлены в виде Me [Q25; Q75], $n=8-13$. Отличия достоверны при: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Fig. 1. Effect of streptococcal arginine deiminase on arginine concentration in the culture medium of peripheral blood mononuclear leukocytes. Data were analyzed using the Kruskal–Wallis test, and pairwise multiple comparisons were conducted using Dunn's post hoc test. Data are presented as Me [Q25; Q75], $n=8-13$. Significant differences at: ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

Таблица 1. Влияние аргининдеиминазы на активность митохондриальных дегидрогеназ мононуклеарных лейкоцитов периферической крови

Table. 1. Effect of arginine deiminase on the activity of mitochondrial dehydrogenases in peripheral blood mononuclear leukocytes

Добавка аргинина, мМ	Активность митохондриальных дегидрогеназ, % (Me [Q25; Q75], $n=3$)			
	Без дифференцировки		Дифференцировка	
	Контроль	Аргининдеиминаза	Контроль	Аргининдеиминаза
0	100	55,02 [50,36; 59,68]***	63,45 [56,93; 69,98]***	40,81 [39,52; 42,1]#
2	79,53 [68,21; 90,85]*	48,22 [44,49; 51,95]	60,48 [55,33; 65,63]	40,45 [38,99; 41,92]

Примечание. Проверку нормальности распределения данных проводили тестами Шапиро—Уилка и Колмогорова—Смирнова. Данные анализировали с помощью теста Краскела—Уоллиса, парные множественные сравнения проводили с использованием апостериорного теста Данна. Отличия от контроля достоверны при: *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; отличия от контроля дифференцировки достоверны при: # $p < 0,05$.

Note. Normality of data distribution was assessed using the Shapiro–Wilk and Kolmogorov–Smirnov tests. Data were analyzed using the Kruskal–Wallis test, and pairwise multiple comparisons were performed using Dunn's post hoc test. Differences from the control are considered significant at: *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$; differences from the differentiation group are significant at: # $p < 0.05$.

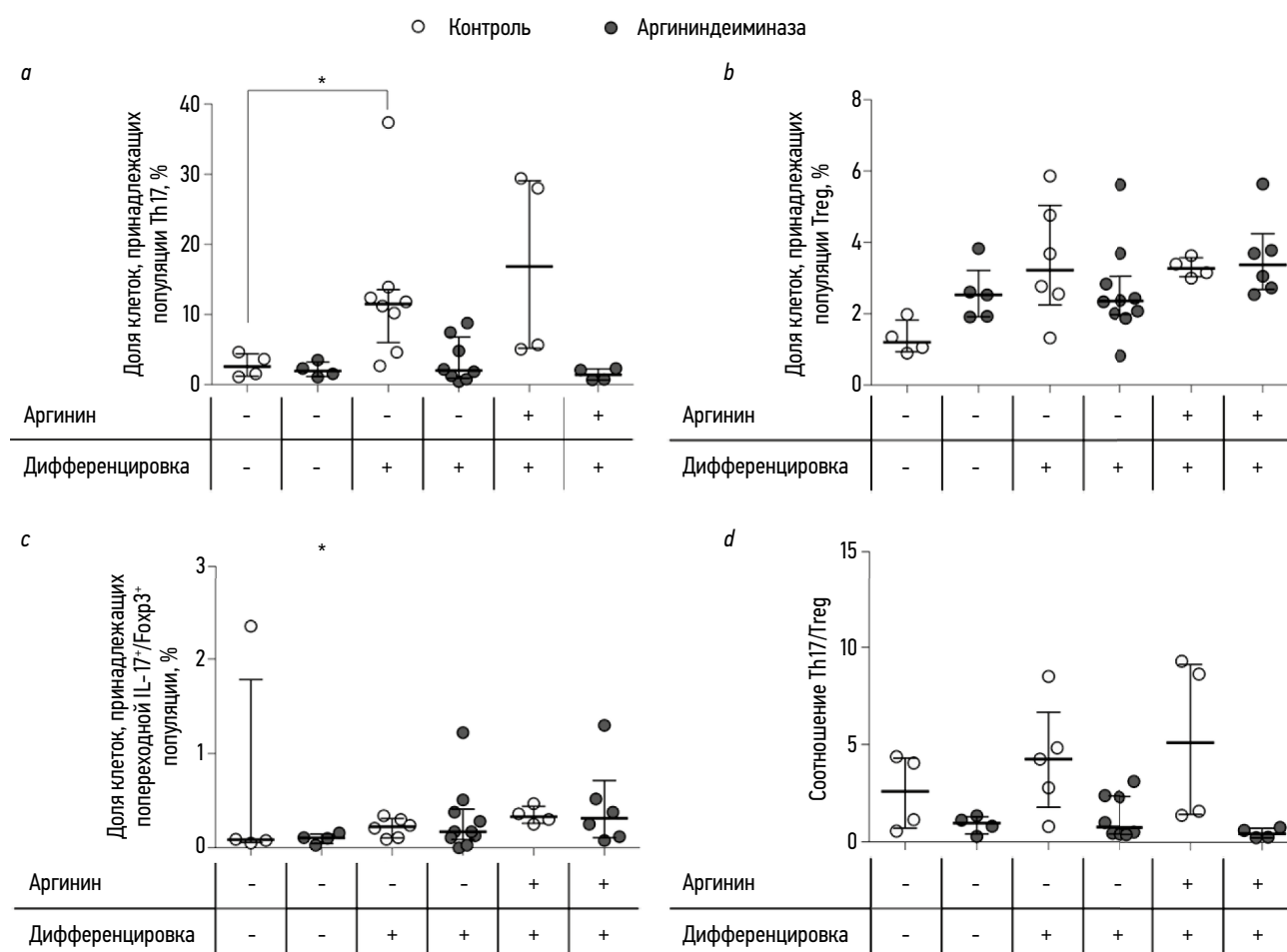


Рис. 2. Влияние стрептококковой аргининдеиминазы на баланс поляризации Th17/Treg. Гистограммы отражают: долю клеток, принадлежащих к популяциям Th17 (a), Treg (b) и переходным популяциям IL-17A⁺Foxp3⁺ (c), и соотношение популяций Th17/Treg (d). Данные были проанализированы с использованием критерия Краскела–Уоллиса, парные множественные сравнения проводили с использованием апостериорного критерия Данна. Данные представлены в виде Me [Q25; Q75], $n=4-10$. Различия значимы при: * $p < 0.05$.

Fig. 2. Effect of streptococcal arginine deiminase on Th17/Treg polarization balance. Histograms representing: proportion of Th17 cells (a); proportion of Treg cells (b); proportion of transitional IL-17A⁺Foxp3⁺ cells (c); Th17/Treg ratio (d). Data were analyzed using the Kruskal–Wallis test, and pairwise multiple comparisons were performed using Dunn's post hoc test. Data are presented as Me [Q25; Q75], $n=4-10$. Significant differences at: * $p < 0.05$.

В дальнейших исследованиях изучали влияние фермента на баланс дифференцировки Th17-/Treg-популяций лимфоцитов *in vitro*. В стандартных условиях культивирования доля Th17-клеток составляла 2,60 [1,21; 4,40]% (рис. 2, a). АДИ не оказывала влияния на долю Th17 в стандартных условиях культивирования (контроль). Инкубация клеток в присутствии поляризующего коктейля цитокинов приводила к достоверному повышению доли Th17-лимфоцитов до 11,51 [6,03; 13,54]%. Если дифференцировка происходила в присутствии АДИ, то доля Th17-лимфоцитов оставалась на уровне контрольных значений. Однако нами было отмечено, что доля переходных IL-17A⁺Foxp3⁺ клеток значительно не отличалась во всех условиях культивирования (рис. 2, c). Также не было обнаружено статистически значимых отличий по содержанию Treg-клеток (рис. 2, b) и соотношению Th17/Treg (рис. 2, d). Введение добавки аргинина не оказывало достоверного влияния на исследуемые параметры.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе было установлено, что АДИ *S. pyogenes* вызывала снижение концентрации аргинина в микроокружении клеток, которое не удавалось восстановить с помощью введения добавки аргинина при каждой замене среды для культивирования (каждые 3–4 дня). Причём имело место снижение концентрации аминокислоты до уровня ниже физиологического, из-за чего на протяжении всего эксперимента клетки находились в условиях дефицита аргинина.

Необходимо отметить, что в ходе дифференцировки CD4⁺ Т-лимфоцитов в эффекторные популяции, как правило, происходит усиление процессов гликолиза и, напротив, подавление окислительного фосфорилирования [25]. Снижение активности процессов окислительного фосфорилирования, обнаруженное в наших экспериментах под действием поляризующего «коктейля» цитокинов, согласуется с этими данными.

Впервые было установлено, что АДИ подавляет дифференцировку Th17-лимфоцитов. Это подтверждают данные исследований, в которых показано, что у пациентов с серповидноклеточной анемией маркеры гемолиза и повышенный уровень аргиназы обратно коррелируют с уровнем цитокинов, характерных для Th17 [26]. Вероятно, это связано с изменением метаболической программы в иммунных клетках в условиях пониженной концентрации аргинина. Биологическая доступность аргинина влияет на способность к пролиферации, ключевую функцию Т-клеток [27–29], без которой невозможна клональная экспансия и развитие эффекторной фазы приобретённого иммунитета. По-видимому, это объясняется тем, что в условиях дефицита аргинина происходит снижение уровня экспрессии ζ -цепи — важнейшего элемента Т-рецепторного комплекса, отвечающего за формирование активационного сигнала [30]. Кроме того, другим эффектом дефицита аргинина является снижение активности циклина D3 и циклин-зависимой киназы 4 (cdk4), что сопровождается блокадой Т-клеток в фазе G₀/G₁ клеточного цикла [31, 32]. При культивировании Т-лимфоцитов в среде, лишённой аргинина, наблюдается характерное изменение профиля секретируемых цитокинов [11], снижение экспрессии CD2, CD45 и активационного маркера CD69 [13].

Активация «наивных» CD4⁺ Т-клеток и последующая их дифференцировка в эффекторные популяции клеток сопровождается перестройками их метаболизма [25]. Сигнальный каскад mTOR/S6K действует как важнейший внутриклеточный регулятор этих биохимических процессов, основная функция которого состоит в контроле процессов гликолиза и окислительного фосфорилирования [3]. Установлено, что для Th17-лимфоцитов характерным является метаболический профиль с активацией синтеза жирных кислот и процессов гликолиза. Напротив, Treg-лимфоциты больше зависят от окислительного фосфорилирования и транспорта жирных кислот из внеклеточного пространства [3]. Активация mTOR усиливает гликолитический путь и экспрессию транскрипционного фактора ROR γ t, регулирующего дифференцировку Th0 в Th17 [3]. Однако подавление активности mTOR/S6K снижает способность «наивных» CD4⁺ Т-клеток к регуляции гликолитических процессов, необходимых для поддержания их эффекторной функции, что приводит к активации экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 и дифференцировке клеток в сторону Treg [33]. Подавление активности mTOR/S6K влияет на соотношение Th17-/Treg-клеток, повышая чувствительность «наивных» Т-клеток к TGF- β , параллельно снижая влияние на них провоспалительных цитокинов [34]. В подтверждение этого было показано, что ингибитор mTOR/S6K-сигнального каскада — рапамицин — способствует экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 и дифференцировке «наивных» CD4⁺ Т-лимфоцитов в сторону Treg [35, 36]. Кроме того, применение рапамицина

на культурах клеток *ex vivo* и при трансплантации у человека тоже смещает баланс поляризации Th17/Treg в сторону Treg [37]. Однако в нашем исследовании было установлено, что *in vitro* АДИ не оказывает достоверного влияния на долю переходной популяции, на поляризацию Treg, а также на соотношение этих популяций в клеточной культуре. Вероятно, это связано с тем, что дефицит аргинина разного происхождения подавляет продукцию ростового фактора лимфоцитов IL-2 [38], который одинаково важен как для клональной экспансии лимфоцитов, так и для дифференцировки Treg [39]. Нельзя исключать, что именно снижение продукции этого цитокина ограничивало дифференцировку Treg, о чём свидетельствует отсутствие изменений по содержанию как этой популяции клеток, так и переходной популяции Т-лимфоцитов под действием АДИ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стрептококковая АДИ подавляет поляризацию Th17-лимфоцитов, что может нарушать нормальное течение реакций адаптивного иммунитета, приводить к хроническому течению инфекций, вызываемых стрептококками и другими патогенными бактериями.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. 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 14.04.2022 № 45/2022).

Информированное согласие на участие в исследовании. Все участники исследования до включения в исследование добровольно подписали форму информированного согласия, утверждённую в составе протокола исследования этическим комитетом.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов (личных, профессиональных или финансовых), связанных с третьими лицами (коммерческими, некоммерческими, частными), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи, а также иных отношений, деятельности и интересов за последние три года, о которых необходимо сообщить.

Вклад авторов. Э.А. Старикова — идея работы и планирование эксперимента, сбор данных, написание и редактирование рукописи; Дж.Т. Маммедова — сбор данных, статистический анализ, графическое оформление статьи; А.В. Соколов — сбор и обработка данных, редактирование рукописи; А.А. Рубинштейн, Е.Ю. Егидарова, А.М. Якупов, Н.Ш. Абдулкадырова — сбор и обработка данных; И.В. Кудрявцев — сбор и анализ данных и редактирование статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. The research was supported by a grant of the Russian Science Foundation No. 22-24-20013, <https://rscf.ru/en/project/22-24-20013/>, and Region (grant of St. Petersburg Science Foundation in accordance with the agreement No. 45/2022 dated 14 April 2022).

Patients' consent. Written consent was obtained from all the study participants before the study screening in accordance to the study protocol approved by the local ethic committee.

Disclosure of interest. The authors declare the absence of relationships, activities, and interests (personal, professional, or financial) with third parties (commercial, non-commercial, private) whose interests may be affected by the content of the article, as well

as other relationships, activities, and interests during the last three years that must be disclosed.

Authors' contribution. E.A. Starikova — the idea of the work and planning of the experiment, data collection, collection and analysis of literary sources, writing and editing of the manuscript; J.T. Mammedova — data collection, statistical analysis, graphic design of the article; A.V. Sokolov — data collection and processing, editing of the manuscript; A.A. Rubinstein, E.Yu. Egidarova, A.M. Yakupov, N.Sh. Abdulkadyrova — data collection and processing, I.V. Kudryavtsev — collection and analysis of data and editing the article. All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made significant contributions to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Zhu X, Zhu J. CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):8011. doi: 10.3390/ijms21218011 EDN: YQPJQJ
2. Shao S, Yu X, Shen L. Autoimmune thyroid diseases and Th17/Treg lymphocytes. *Life Sci.* 2018;192:160–165. doi: 10.1016/j.lfs.2017.11.026
3. Lee GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):730. doi: 10.3390/ijms19030730
4. Yan JB, Luo MM, Chen ZY, He BH. The Function and Role of the Th17/Treg Cell Balance in Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res.* 2020;2020:8813558. doi: 10.1155/2020/8813558 EDN: NHXBRD
5. Zhang Y, Liu Z, Tian M, et al. The altered PD-1/PD-L1 pathway delivers the “one-two punch” effects to promote the Treg/Th17 imbalance in pre-eclampsia. *Cell Mol Immunol.* 2018;15(7):710–723. doi: 10.1038/cmi.2017.70
6. Moaaz M, Youssry S, Elfatraty A, El Rahman MA. Th17/Treg cells imbalance and their related cytokines (IL-17, IL-10 and TGF- β) in children with autism spectrum disorder. *J Neuroimmunol.* 2019;337:577071. doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.577071
7. Knochelmann HM, Dwyer CJ, Bailey SR, et al. When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. *Cell Mol Immunol.* 2018;15(5):458–469. doi: 10.1038/s41423-018-0004-4 EDN: MDURLV
8. Wu D, Yang XO. TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: An emerging target of JAK2 inhibitor Fedratinib. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020;53(3):368–370. doi: 10.1016/j.jmii.2020.03.005 EDN: LUZFB5
9. Cluxton D, Petrasca A, Moran B, Fletcher JM. Differential Regulation of Human Treg and Th17 Cells by Fatty Acid Synthesis and Glycolysis. *Front Immunol.* 2019;10:115. doi: 10.3389/fimmu.2019.00115
10. Sun L, Fu J, Zhou Y. Metabolism Controls the Balance of Th17/T-Regulatory Cells. *Front Immunol.* 2017;8:1632. doi: 10.3389/fimmu.2017.01632
11. Werner A, Koschke M, Leuchner N, et al. Reconstitution of T Cell Proliferation under Arginine Limitation: Activated Human T Cells Take Up Citrulline via L-Type Amino Acid Transporter 1 and Use It to Regenerate Arginine after Induction of Argininosuccinate Synthase Expression. *Front Immunol.* 2017;8:864. doi: 10.3389/fimmu.2017.00864
12. 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;8(11):1557–1576. doi: 10.4161/auto.21315
13. Shyer JA, Flavell RA, Bailis W. Metabolic signaling in T cells. *Cell Res.* 2020;30(8):649–659. doi: 10.1038/s41422-020-0379-5 EDN: HJHBGQ
14. Dunsmore G, Koleva P, Ghobakhloo N, et al. Lower Abundance and Impaired Function of CD71+ Erythroid Cells in Inflammatory Bowel Disease Patients During Pregnancy. *J Crohns Colitis.* 2019;13(2):230–244. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjy147
15. Wu G, Jaeger LA, Bazer FW, Rhoads JM. Arginine deficiency in preterm infants: biochemical mechanisms and nutritional implications. *J Nutr Biochem.* 2004;15(8):442–451. doi: 10.1016/j.jnutbio.2003.11.010
16. Badurdeen S, Mulongo M, Berkley JA. Arginine depletion increases susceptibility to serious infections in preterm newborns. *Pediatr Res.* 2015;77(2):290–297. doi: 10.1038/pr.2014.177
17. Elahi S, Ertelt JM, Kinder JM, et al. Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. *Nature.* 2013;504(7478):158–162. doi: 10.1038/nature12675
18. Chapman NM, Chi H. mTOR Links Environmental Signals to T Cell Fate Decisions. *Front Immunol.* 2014;5:686. doi: 10.3389/fimmu.2014.00686 EDN: QXCXZZ
19. Coquillard C, Vilchez V, Marti F, Gedaly R. mTOR Signaling in Regulatory T Cell Differentiation and Expansion. *SOJ Immunol.* 2015;3(1). doi: 10.15226/soji/3/1/00122
20. Martí I, Líndez AA, Reith W. Arginine-dependent immune responses. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(13):5303–5324. doi: 10.1007/s00018-021-03828-4
21. Takahara T, Amemiya Y, Sugiyama R, et al. Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):87. doi: 10.1186/s12929-020-00679-2 EDN: MUXJRB
22. Das P, Lahiri A, Lahiri A, Chakravorty D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog.* 2010;6(6):e1000899. doi: 10.1371/journal.ppat.1000899
23. Egidarova EYu, Grudinina NA, Karaseva AB, et al. Purification of Recombinant Arginine Deiminase of *Streptococcus pyogenes* M22 and Its Enzymatic Activity Assay. In: *SYMBIOSIS-RUSSIA 2022. Collection of Articles from the XIII International Conference of Biologists. Perm, 2023.* Perm, Permskii gosudarstvennyi natsional'nyi issledovatel'skii universitet; 2023. P. 258–261. (In Russ.) doi: 10.17072/simbioz-2022-263-267 EDN: RMFGZU
24. Egidarova EYu, Filatenkova TA, Grudinina NA, et al. Recombinant Arginine Deiminase of *Streptococcus pyogenes* Inhibits Tumor Cell

Growth. In: *Human Biochemistry: Proceedings of the All-Russian Conference with International Participation, Moscow, October 17–19, 2024*. Moscow: E-noto; 2024. P. 243. (In Russ.) EDN: GIYRLQ

25. Ma S, Ming Y, Wu J, Cui G. Cellular metabolism regulates the differentiation and function of T-cell subsets. *Cell Mol Immunol*. 2024;21(5):419–435. doi: 10.1038/s41423-024-01148-8 EDN: FPRSFK

26. Vilas-Boas W, Cerqueira BAV, Zanette AMD, et al. Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state sickle cell anemia patients. *Ann Hematol*. 2010;89(9):877–882. doi: 10.1007/s00277-010-0954-9

27. Starickova EA, Leveshko TA, Churakina DV, Kudryavtsev IV, Burova LA, Freidlin IS. S. pyogenes M49-16 arginine deiminase inhibits proliferative activity of human peripheral blood lymphocytes. *Russ J Infect Immun*. 2021;11(2):349–356. doi: 10.15789/2220-7619-ADF-1363 EDN: DCQBCY

28. Starikova EA, Mammedova JT, Ozhiganova A, et al. Streptococcal arginine deiminase inhibits T lymphocyte differentiation in vitro. *Microorganisms*. 2023;11(10):2585. doi: 10.3390/microorganisms11102585 EDN: SVDCEI

29. Starikova EA, Mammedova JT, Ozhiganova A, et al. Effect of streptococcal arginine deiminase on the function of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *Med Immunol (Russ)*. 2024;26(3):503–512. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-EOS-2910 EDN: MIIATG

30. Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, et al. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem*. 2002;277(24):21123–21129. doi: 10.1074/jbc.M110675200

31. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*. 2007;109(4):1568–1573. doi: 10.1182/blood-2006-06-031856

32. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol*. 2009;158(3):638–651. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x

33. Barbi J, Pardoll D, Pan F. Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunol Rev*. 2013;252(1):52–77. doi: 10.1111/imr.12029 EDN: RIMFCZ

34. Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB, Horton MR. Regulation of immune responses by mTOR. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:39–68. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075024

35. Kang J, Huddleston SJ, Fraser JM, Khoruts A. De novo induction of antigen-specific CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in vivo following systemic antigen administration accompanied by blockade of mTOR. *J Leukoc Biol*. 2008;83(5):1230–1239. doi: 10.1189/jlb.1207851

36. Brandler WM, Antaki D, Gujral M, et al. Frequency and Complexity of De Novo Structural Mutation in Autism. *Am J Hum Genet*. 2016;98(4):667–679. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.02.018

37. Kim KW, Chung BH, Kim BM, et al. The effect of mammalian target of rapamycin inhibition on T helper type 17 and regulatory T cell differentiation in vitro and in vivo in kidney transplant recipients. *Immunology*. 2015;144(1):68–78. doi: 10.1111/imm.12351

38. Abbas AK. The Surprising Story of IL-2: From Experimental Models to Clinical Application. *Am J Pathol*. 2020;190(9):1776–1781. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.05.007 EDN: JOHBKG

39. Harris F, Berdugo YA, Tree T. IL-2-based approaches to Treg enhancement. *Clin Exp Immunol*. 2023;211(2):149–163. doi: 10.1093/cei/uxac105 EDN: GROYTQ

ОБ АВТОРАХ

* **Старикова Элеонора Александровна**, канд. биол. наук;

адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург,

ул. Академика Павлова, д. 12;

ORCID: 0000-0002-9687-7434;

eLibrary SPIN: 6488-4036;

e-mail: starickova@yandex.ru

Маммедова Джаннет Тумаровна;

ORCID: 0000-0003-4381-6993;

eLibrary SPIN: 1418-6373;

e-mail: jennet_m@mail.ru

Соколов Алексей Викторович, д-р биол. наук;

ORCID: 0000-0001-9033-0537;

eLibrary SPIN: 7427-7395;

e-mail: biochemsokolov@gmail.com

Рубинштейн Артём Аркадьевич;

ORCID: 0000-0002-8493-5211;

eLibrary SPIN: 6025-1790;

e-mail: arrubin6@mail.ru

Егидарова Елена Юрьевна;

ORCID: 0000-0002-5716-0836;

eLibrary SPIN: 3449-0970;

e-mail: lena.egidarova.97@mail.ru

Якупов Арслан Маратович;

ORCID: 0009-0007-0829-3978;

e-mail: arsl@n-yakupov.ru

AUTHORS' INFO

* **Eleonora A. Starikova**, Cand. Sci. (Biology);

address: 12 Akademika Pavlova st, Saint Petersburg,

Russia, 197022;

ORCID: 0000-0002-9687-7434;

eLibrary SPIN: 6488-4036;

e-mail: starickova@yandex.ru

Jennet T. Mammedova;

ORCID: 0000-0003-4381-6993;

eLibrary SPIN: 1418-6373;

e-mail: jennet_m@mail.ru

Alexey V. Sokolov, Dr. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0001-9033-0537;

eLibrary SPIN: 7427-7395;

e-mail: biochemsokolov@gmail.com

Artem A. Rubinstein;

ORCID: 0000-0002-8493-5211;

eLibrary SPIN: 6025-1790;

e-mail: arrubin6@mail.ru

Elena Yu. Egidarova;

ORCID: 0000-0002-5716-0836;

eLibrary SPIN: 3449-0970;

e-mail: lena.egidarova.97@mail.ru

Arslan M. Yakupov;

ORCID: 0009-0007-0829-3978;

e-mail: arsl@n-yakupov.ru

Абдулкадырова Назханум Шамильевна;

ORCID: 0009-0000-4345-4967;

e-mail: naza.v2003@gmail.com

Кудрявцев Игорь Владимирович, канд. биол. наук, доцент;

ORCID: 0000-0001-7204-7850;

eLibrary SPIN: 4903-7636;

e-mail: igorek1981@yandex.ru

Nazkhanum Sh. Abdulkadyrova;

ORCID: 0009-0000-4345-4967;

e-mail: naza.v2003@gmail.com

Igor V. Kudryavtsev, Cand. Sci. (Biology), Assistant Professor;

ORCID: 0000-0001-7204-7850;

eLibrary SPIN: 4903-7636;

e-mail: igorek1981@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author