

## ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛИЗАТА *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

© Э. А. Старикова,<sup>1</sup> А. М. Лебедева, Л. А. Бурова, И. С. Фрейдлин

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН,  
Санкт-Петербург;

<sup>1</sup>электронный адрес: Starickova@yandex.ru

Формирование новых кровеносных сосудов в участке воспаления обеспечивает миграцию лейкоцитов и поступление биологически активных субстанций. Ангиогенез является результатом миграции и пролиферации эндотелиальных клеток, образующих выстилку кровеносных сосудов. В ходе развития бактериальной инфекции эндотелий подвергается влиянию продуктов, секретируемых живыми бактериальными клетками, а также продуктов их деградации. В данном исследовании изучали влияние лизата разрушенных ультразвуком *Streptococcus pyogenes* (тип M22) на свойства эндотелиальных клеток линии EA.hy926, связанные с ангиогенезом. В максимальной исследуемой концентрации лизат стрептококковых клеток не влиял на некроз и апоптоз в культуре эндотелиальных клеток, при этом достоверно и дозозависимо ингибировал их метаболизм, миграцию, пролиферацию и адгезию на фоне двукратного снижения уровня фосфо-ERK1/2 и фосфо-FAK. Изменения свойств эндотелиальных клеток под влиянием разрушенных *S. pyogenes* могут способствовать развитию характерных для стрептококковых инфекций снижению перфузии, развитию гипоксии и некрозу тканей.

Ключевые слова: ангиогенез, воспаление, эндотелиальные клетки, адгезия, миграция, пролиферация, *Streptococcus pyogenes*.

Эндотелиальные клетки выполняют многие физиологические функции, включая регуляцию сосудистого тонуса, гемостаза, фибринолиза, воспалительных процессов, поддержание барьера проницаемости для обеспечения обмена и активного транспорта субстанций в ткани (Cines et al., 1999). В ходе развития бактериальной инфекции эндотелий сосудов подвергается влиянию продуктов деградации бактериальных клеток, а также токсинов и факторов патогенности, секретируемых живыми бактериальными клетками, что приводит к поражениям сосудов местного и общего характера (Киселев, 1971). Патогенетические механизмы токсического действия стрептококка в отношении сосудов связывают в первую очередь с нарушениями процессов коагуляции, снижением адгезивности эндотелиальных клеток и повышением проницаемости эндотелиального барьера. Описанные эффекты обусловлены индукцией экспрессии эндотелиальными клетками тканевого фактора, активацией секретируемых ими матриксных металлопротеаз, нарушением их взаимодействия с молекулами внеклеточного матрикса, повышением проницаемости межклеточного вещества, приводящего к облегчению диффузии токсинов (Burns et al., 1996; Kerr, 1999; Stockbauer et al., 1999; Bryant et al., 2003; Rohde et al., 2003; Khan et al., 2006; Atkin et al., 2010).

В период острой фазы воспаления быстрый рост сосудов (ангиогенез) обеспечивает поддержание необходимого уровня метаболизма в тканях, поступление медиаторов воспаления, других активных субстанций, а также миграцию лейкоцитов (Danese et al., 2007). Не вызывает сомнения ключевая роль ангиогенеза по окончании острой

фазы воспаления на этапе регенерации. Влияние компонентов стрептококков на свойства эндотелиальных клеток, связанные с ангиогенезом, остается слабо изученным. Целью данной работы являлось изучение влияния лизата разрушенных ультразвуком *S. pyogenes* (тип M22) на свойства эндотелиальных клеток линии EA.hy926, связанные с ангиогенезом. В работе впервые показано, что лизат стрептококковых клеток (ССК) обладает антиангиогенным действием, ингибирует адгезию, миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток *in vitro*.

### Материал и методика

Эндотелиальные клетки линии EA.hy 926 были любезно предоставлены д-ром Cora-Jean S. Edgell (Университет Северная Каролина, США). Линия воспроизводит основные фенотипические и функциональные характеристики эндотелиальных клеток макрососудов человека (Edgell et al., 1983). Клетки культивировали в среде DMEM (Биолот, РФ), содержащей 10 % сыворотки эмбрионов коров (Sigma, США), Нурохантин, Aminopterin, Thymidine (HAT) (Sigma, США), 4 мМ L-глутамин и 100 мкг/мл гентамицина (Биолот, РФ). Пересев производили дважды в неделю. Дезинтеграцию монослоя клеток вызывали инкубацией в 0.02%-ном растворе этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (Биолот, РФ).

В работе использовали *S. pyogenes* (тип M22, штамм AL168), которые выращивали в течение 18–20 ч при

37 °С в среде Todd-Hewitt (Difco, США) в аэробных условиях, осаждали центрифугированием и производили двукратную отмывку забуференным фосфатом физиологическим раствором, не содержащим липополисахарида. Концентрацию суспензии бактериальных клеток стандартизировали по оптической плотности и доводили до  $2.5\text{--}5 \cdot 10^8$  колониеобразующих единиц. Для приготовления лизата суспензию бактерий обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин при частоте 22 кГц и мощности 0.3—0.4 мА на дезинтеграторе (MSE, Англия). Полноту разрушения бактериальных клеток контролировали микроскопически, после чего суспензию центрифугировали и полученный надосадок стерилизовали, пропуская через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм (Sarstedt, Германия); хранили при –20 °С.

Интенсивность пролиферации эндотелиальных клеток оценивали по включению в ДНК клеток синтетического аналога тимидина 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) с использованием BrdU Cell Proliferation assay Kit (Chemicon International, США и Канада). Клетки вносили в лунки 96-луночного плоскодонного планшета (Sarstedt, Австрия) в концентрации 5000 клеток на лунку в 100 мкл культуральной среды DMEM. Клетки культивировали при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> и 90 % влажности в течение 4 ч, после чего в некоторые лунки вносили ССК в разной концентрации и культивировали еще 72 ч. За 24 ч до окончания культивирования в лунки вносили BrdU, клетки пермеабилizировали, фиксировали и окрашивали антителами против BrdU в соответствии с рекомендацией производителя. Включение BrdU оценивали спекрофотометрически, используя мультипланшетный ридер (BioRad, Япония) при длине волны 450. Результат выражали в процентах, принимая за 100 % среднее значение оптической плотности в контрольных лунках, содержащих культуральную среду.

Адгезионную активность эндотелиальных клеток определяли по их способности адгезировать к культуральному пластику. Клетки вносили в лунки планшета в концентрации 50 000 клеток на 100 мкл культуральной среды; в некоторые лунки вносили ССК в разных концентрациях и культивировали 15 мин при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> и 90 % влажности. Затем производили трехкратную отмывку от неадгезировавших клеток. Адгезировавшие клетки фиксировали и окрашивали в 0.5%-ном (w/v) растворе кристаллического фиолетового на 4%-ном (v/v) метаноле в течение 5 мин. Избыток красителя удаляли отмывкой дистиллированной H<sub>2</sub>O, экстракцию красителя производили в 10%-ной (v/v) уксусной кислоте. Количество адгезировавших клеток оценивали спекрофотометрически, используя мультипланшетный ридер (BioRad, Япония) при длине волны 570. Результат выражали в процентах, принимая за 100 % среднее значение оптической плотности в контрольных лунках, содержащих культуральную среду.

Для оценки миграционной активности эндотелиальные клетки вносили в лунки планшета в концентрации 25 000 клеток на 100 мкл культуральной среды и выращивали до образования конфлюэнтного монослоя. После этого производили механическое разрушение части монослоя клеток пластиковым наконечником. Разрушенные клетки удаляли путем однократной отмывки фосфатно-солевым буфером (рН 7.0), после чего производили фотографирование лунок на микроскопе (Axio Observer.D1, Zeiss, Германия) при увеличении объектива 100× для фиксации исходного положения клеток. В контроль-

ные лунки вносили культуральную среду, а в опытные лунки — культуральную среду, содержащую ССК. После 24-часовой инкубации производили фотографирование лунок. Размеры свободной от клеток площади оценивали с помощью программы AxioVision (Zeiss, Германия). Результат выражали в процентах, принимая за 100 % размер площади, свободной от клеток в лунках сразу после разрушения монослоя (исходное положение).

Для оценки процессов некроза и апоптоза 2 500 000 эндотелиальных клеток в 2 мл культуральной среды вносили в лунки 6-луночного планшета (Sarstedt, Австрия), культивировали 72 ч без ССК или в присутствии ССК в максимальной концентрации (разведение 1 : 25), после чего производили дезинтеграцию монослоя в 0.02%-ном растворе ЭДТА (Биолот, РФ) и переносили клеточную суспензию в микропробирки. Для определения количества клеток в состоянии некроза и апоптоза использовали Annexin V-FITC 7-AAD kit I (Beckman Coulter, США). Эндотелиальные клетки окрашивали аннексином V согласно инструкции производителя. Анализ образцов производили с помощью проточной цитометрии на приборе Coulter Apics Altra (Beckman Coulter, США) с использованием программы EXPO 32 ADC Software (Beckman Coulter, США). Опыт проводили в трех повторностях, количество клеток в стадии некроза и апоптоза выражали в процентах от общего количества (10 000) анализируемых клеток.

Интенсивность внутриклеточного метаболизма оценивали по активности митохондриальных дегидрогеназ с помощью МТТ-теста (Newman et al., 2000). Метод основан на способности дегидрогеназ митохондрий живых клеток восстанавливать МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) с образованием кристаллов формазана фиолетового цвета. Эндотелиальные клетки вносили в лунки 96-луночного планшета из расчета 25 000 клеток в 100 мкл культуральной среды, культивировали до образования конфлюэнтного монослоя во влажной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С; в некоторые лунки вносили ССК в разных концентрациях. Через 1 ч в каждую лунку вносили по 10 мкл МТТ, так чтобы конечная концентрация составляла 1 мкг/мл. Через 4 ч в каждую лунку вносили по 100 мкл лизирующего буфера (Mosmann, 1983; Newman et al., 2000) и инкубировали в течение ночи до полного растворения. Результаты анализировали при помощи автоматического спектрофотометра при длине волны 540 нм. Изменение уровня метаболизма оценивали по изменению оптической плотности. Результаты выражали в процентах, принимая за 100 % оптическую плотность в контрольных лунках, содержащих культуральную среду.

Анализ уровня Focal Adhesion Kinase (FAK) и Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK) фосфокиназ в клетках проводили с использованием проточной цитометрии. Для этого клетки при достижении субконфлюэнтного монослоя инкубировали 20 мин в присутствии ССК в разведении 1 : 50. После этого клетки собирали в пробирки, фиксировали и пермеабилizировали с помощью IntraPrep fixation/permeabilisation Kit (Beckman Coulter, США). Далее производили окрашивание образцов с использованием моноклональных антител против фосфо-ERK1/2 (pT202/pY204), меченных Alexa fluor-488, и фосфо-FAK, меченных FITC (все антитела от BD Pharmingen, США). Негативный контроль содержал клетки, меченные изотопическими антителами к антигенам других животных (BD Pharmingen, США). Опыт проводили в трех повтор-

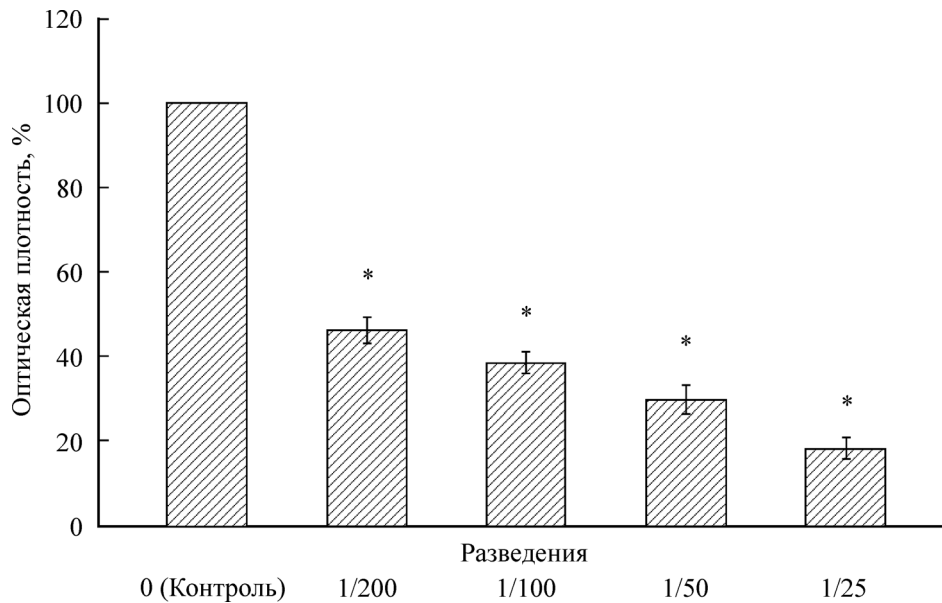


Рис. 1. Гистограмма, отражающая уровни включения BrdU клетками EA.hy926 в присутствии лизата стрептококковых клеток. По горизонтали — разведения лизата; по вертикали — средние значения оптической плотности ( $M \pm SD$ ,  $n = 16$ ), %; за 100 % принято среднее значение оптической плотности в контрольных лунках; звездочкой отмечено, что отличия от контроля достоверны при  $P < 0.001$ .

ностях. Образцы анализировали с использованием проточного цитофлуориметра Coulter Apics Altra (Beckman Coulter, США) и программы EXPO 32 ADC Software (Beckman Coulter, США). Результат выражали средними значениями интенсивности флуоресценции.

Анализ экспрессии поверхностных молекул на эндотелиальных клетках проводили с использованием проточной цитометрии. Для этого клетки при достижении субконфлюэнтного монослоя собирали в пробирки и производили окрашивание образцов с использованием моноклональных антител против TLR-2, меченных Alexa Fluor 488 (BD Pharmingen, США), CD36, меченных FITC

(Beckman Coulter, USA), CD29, меченных FITC (Beckman Coulter, США), CD47, меченных PE (BD Pharmingen, США). Негативный контроль содержал клетки, меченные изотипическими антителами к антигенам других животных соответствующей фирмы-производителя. Образцы анализировали с использованием проточного цитофлуориметра Coulter Apics Altra (Beckman Coulter, США) и программы EXPO 32 ADC Software (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку данных производили с использованием  $t$ -критерия Стьюдента, программы STATISTICA 6.0.

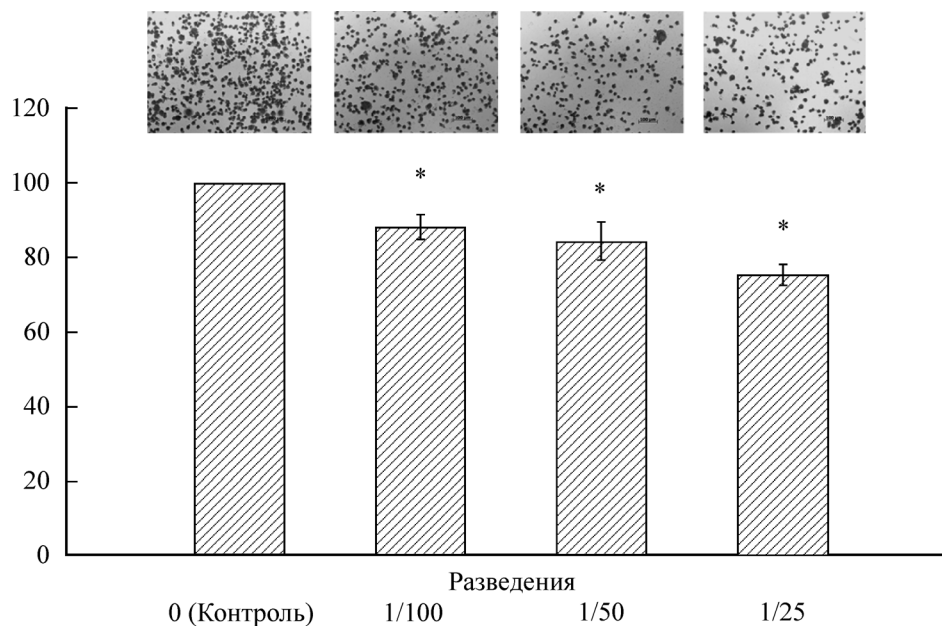


Рис. 2. Гистограмма и сравнительная микроскопическая картина, отражающие интенсивность адгезии клеток EA.hy926 к пластику в присутствии лизата стрептококковых клеток.

Обозначения те же, что и на рис. 1;  $n = 12$ . Микроскопия после окраски кристаллическим фиолетовым; об. 100 $\times$ .

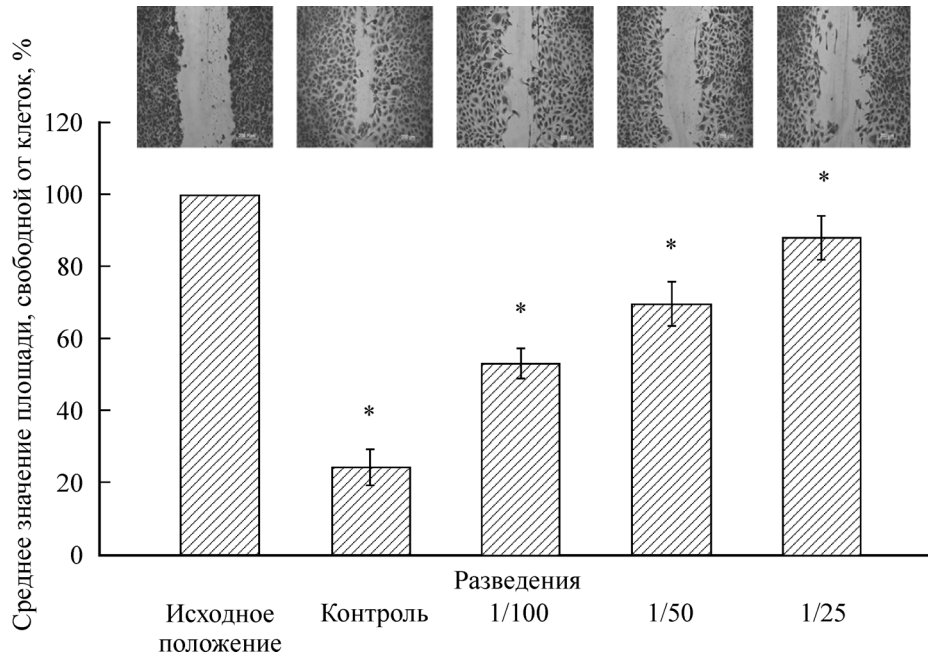


Рис. 3. Гистограмма и сравнительная микроскопическая картина, отражающие интенсивность миграции клеток EA.hy926 в присутствии лизата стрептококковых клеток.

По горизонтали — разведения лизата; по вертикали — средние значения свободной от клеток площади ( $M \pm SD$ ,  $n = 12$ ), %; за 100 % принято среднее значение исходных размеров свободной от клеток площади сразу после нанесения «раны»; звездочкой отмечено, что отличия от контроля достоверны при  $P < 0.001$ . Микроскопия после окраски кристаллическим фиолетовым; об. 100 $\times$ .

## Результаты

Показатель интенсивности включения BrdU отражает уровень синтеза ДНК в клетках и косвенно отражает активность пролиферации клеточной популяции. В присутствии ССК в разведениях 1/200, 1/100, 1/50 и 1/25 наблюдали достоверное дозозависимое снижение интенсивности включения BrdU в культуре эндотелиальных клеток (рис. 1).

Для оценки влияния компонентов стрептококка на адгезивность эндотелиальных клеток к поверхности культу-

ральной посуды клеточную суспензию инкубировали в присутствии ССК в течение 15 мин. При этом во всем диапазоне исследуемых концентраций наблюдали снижение интенсивности адгезии эндотелиальных клеток к пластику. Эффект был статистически достоверным и дозозависимым (рис. 2).

В присутствии ССК происходило существенное снижение миграционной активности эндотелиальных клеток, что выражалось в снижении интенсивности заполнения клетками площади экспериментальной «раны» (рис. 3). Так, если в контрольных лунках через 24 ч после повреж-

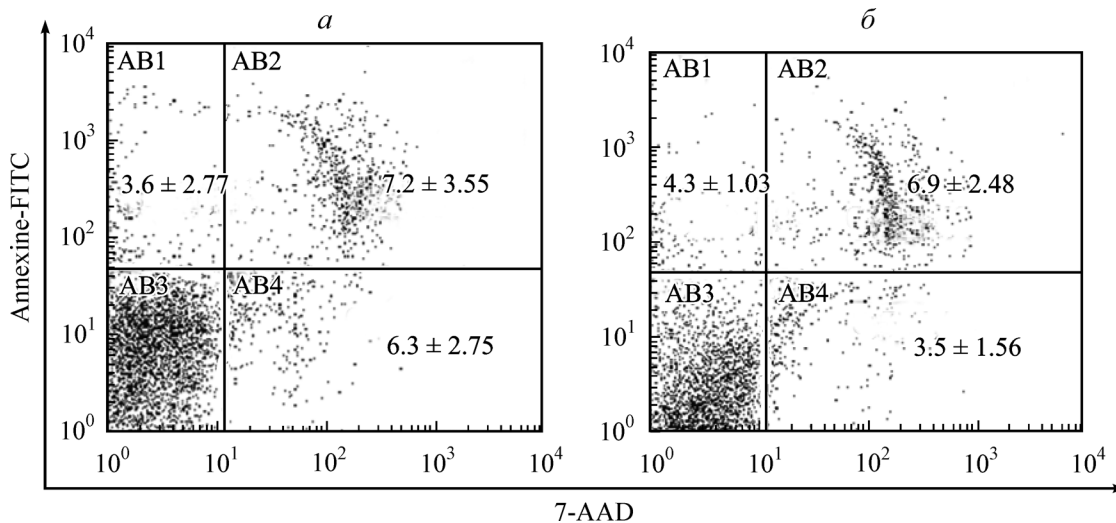


Рис. 4. Двухмерные гистограммы, отражающие интенсивность некроза и апоптоза в культуре клеток EA.hy926.

а — доля клеток (% от общего количества анализируемых клеток) в состоянии некроза и апоптоза в контроле, б — после культивирования в присутствии лизата стрептококковых клеток (разведение 1/25); представлены средние значения ( $M \pm SD$ ) по результатам 4 независимых экспериментов.

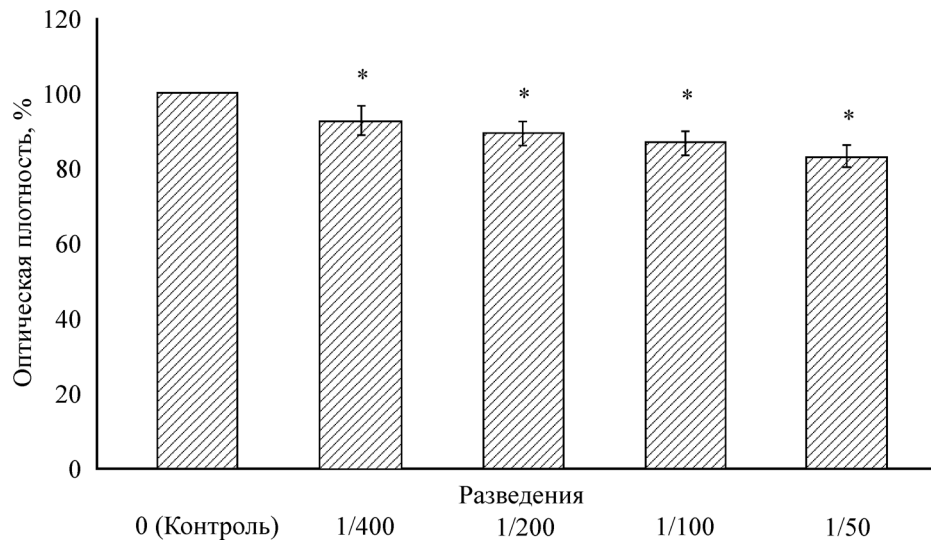


Рис. 5. Гистограмма, отражающая интенсивность метаболизма клеток EA.hy926 в присутствии лизата стрептококковых клеток. По горизонтали — разведения лизата; по вертикали — средние значения оптической плотности ( $M \pm SD$ ,  $n = 20$ ), %; за 100 % принято среднее значение оптической плотности в контроле; звездочкой отмечено, что отличия от контроля достоверны при  $P < 0.001$ .

дения монослоя свободная от клеток площадь составляла около 20 %, в присутствии ССК в разведении 1/100 этот показатель был чуть больше 50 %, а при максимальной концентрации ССК 1/25 свободная от клеток площадь достигала 90 % от исходных размеров.

Оценивали долю клеток в состоянии некроза и апоптоза после культивирования эндотелиальных клеток в присутствии ССК в максимальной исследуемой концентрации 1/25. Доля клеток в состоянии некроза в культуре составляла  $6.3 \pm 2.75$  % (рис. 4, а, квадрант АВ4), при этом доля клеток в состоянии раннего и позднего апоптоза составляла  $3.6 \pm 2.77$  и  $7.2 \pm 3.55$  % соответственно (рис. 4, а, квадрант АВ1, АВ2). После культивирования клеток в присутствии ССК в течение 72 ч доля клеток в состоянии некроза и апоптоза в культуре достоверно не изменялась (рис. 4, б). Культивирование клеток в присутствии разных концентраций ССК в течение 5 ч приводило к достоверному дозозависимому снижению уровня метаболизма эндотелиальных клеток (рис. 5).

Уровень экспрессии фосфо-FAK в эндотелиальных клетках составлял  $226.8 \pm 40.43$  MFI в контроле и снижался после культивирования в присутствии ССК почти в 2 раза ( $121.7 \pm 32.53$  MFI,  $P < 0.05$ ). Исследование уровня экспрессии фосфо-ERK1/2 выявило, что по сравнению с контролем ( $17.8 \pm 2.19$  MFI) уровень экспрессии этой киназы после культивирования в присутствии ССК также достоверно снижался ( $11.8 \pm 1.44$  MFI,  $P < 0.01$ ) (рис. 6). Исследования поверхностного фенотипа клеток линии EA.hy926 выявили высокий спонтанный уровень экспрессии адгезионных молекул CD29 и CD44, в то время как молекулы TLR2 и CD36 на этих клетках не экспрессировались (рис. 7).

## Обсуждение

Эндотелиальные клетки являются наиболее динамичным и биологически активным клеточным компонентом кровеносных сосудов. В процессе ангиогенеза при формировании новых сосудов происходят миграция и пролиферация эндотелиальных клеток, изменение их адгезион-

ной активности (Cines et al., 1998). Наши исследования показали, что ССК ингибировал функции эндотелиальных клеток, связанные с процессом ангиогенеза, но при этом не оказывал влияния на процессы апоптоза и некроза клеток в культуре.

Из литературных данных известно, что стрептококки могут вызывать апоптоз разных типов клеток (эпителиальных, нейтрофилов, моноцитов, кератиноцитов) опосредованно, индуцируя секрецию и повышая внеклеточную концентрацию апоптогенных факторов, таких как TNF $\alpha$ , Fas лиганда и ATP (Tsai et al., 1999; La Sala et al., 2003; Rohde et al., 2003; Marouni, Sela, 2004; Nobbs et al., 2009). С усилением апоптоза и некроза эндотелиальных клеток связывают гиперпроницаемость эпителиального и эндотелиального барьеров, описанную при стрептококковых инфекциях (Lucas et al., 2009). Выявленное нами отсутствие влияния ССК на процессы апоптоза и некроза эндотелиальных клеток линии EA.hy926 в культуре позволяет предположить, что только живые бактерии обладают способностью индуцировать апоптоз эукариотических клеток.

В настоящее время подавляющее большинство исследований иммунопатогенеза бактериальных инфекций направлено на выяснение роли Toll-подобных рецепторов (TLR) и сквенджер-рецепторов в распознавании патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) бактериальных клеток. Известно, что TLR-2 и CD36 являются лигандами компонентов клеточной стенки грамположительных бактерий (Takeda, Akira, 2001; Silverstein, Febbraio, 2009). Проведенные нами исследования показали отсутствие спонтанной и индуцированной экспрессии этих молекул на эндотелиальных клетках линии EA.hy926 (рис. 7). При этом на эндотелиальных клетках был зарегистрирован высокий спонтанный уровень экспрессии адгезионных молекул CD47 и CD29 (рис. 7).

Можно предположить, что обнаруженные в наших исследованиях изменения функций эндотелиальных клеток могут быть опосредованы взаимодействием компонентов стрептококка с этими молекулами. Стрептококки успешно колонизируют слизистые оболочки благодаря экспрессии широкого спектра адгезинов — белков, распо-

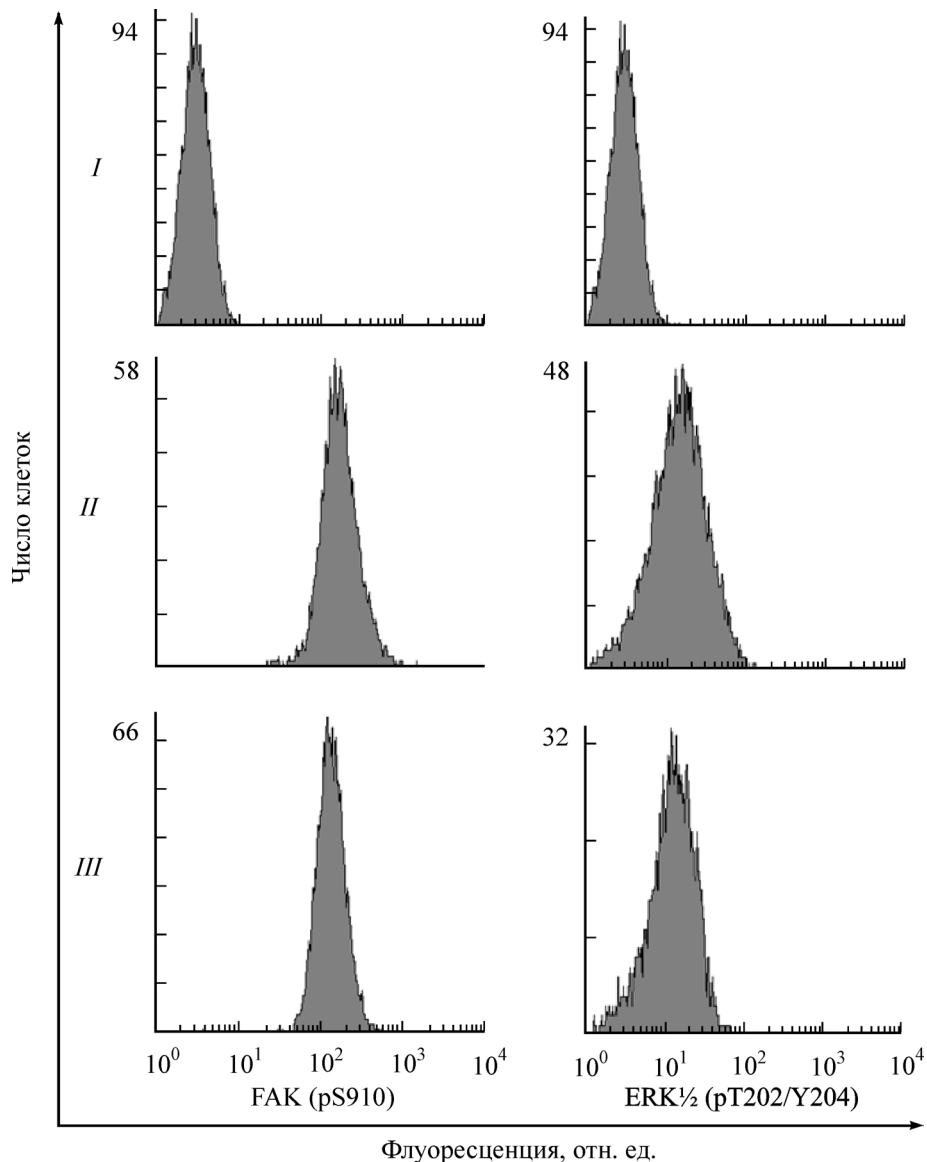


Рис. 6. Двухмерные гистограммы, отражающие уровень экспрессии FAK (pS910) ERK1/2 (pT202/Y204) в клетках EA.hy926. По горизонтали — средние значения интенсивности флуоресценции; ряд I — контроль изотипических антител, ряд II — контроль культуральной среды, ряд III — культивирование в присутствии лизата стрептококковых клеток; по вертикали — количество проанализированных клеток.

знающих адгезионные молекулы на поверхности эукариотических клеток, регулирующие взаимодействие с другими клетками и молекулами внеклеточного матрикса. Результатами связывания адгезинов стрептококка с адгезионными молекулами эндотелиальных клеток могут быть их блокада, индукция активации их функций (продукции цитокинов, металлопротеаз) или апоптоза (Thern et al., 1998; Navarre, Schneewind, 1999; Cunningham, 2000; Nobbs et al., 2009).

Адгезины могут прямо или опосредованно через белки межклеточной адгезии, такие как фибронектин, тромбоспондин и гиалуроновая кислота, вмешиваться в процессы адгезии клеток к субстрату (Nobbs et al., 2009). Было показано, что внеклеточная цистеиновая протеаза SpeB (streptococcal pyrogenic exotoxin B), связываясь с  $\alpha\beta 3$ -интегринами на эндотелиальных клетках вены пупочного канатика человека (HUVEC), вызывает их деадгезию (Stokbauer et al., 1999). Эндотелиальные клетки линии EA.hy926 также экспрессируют  $\alpha\beta 3$ -интегрины

(Амчиславский и др., 2005). Данный факт особенно интересен, учитывая, что эта адгезионная молекула играет важную роль в процессе ангиогенеза (Eliceiri, Cheresh, 2000).

Антипролиферативное действие ССК может быть связано с влиянием его компонентов непосредственно на ДНК клетки. В частности, было показано, что ДНКазы стрептококка вызывают деполимеризацию ДНК эукариотических клеток, что приводит к торможению процессов деления (Киселев, 1971). На поверхности эукариотических клеток, в том числе эндотелиальных, присутствует слой гликокаликса — негативно заряженной структуры, образованной остатками силовых кислот гликопротеинов, сульфатными и карбоксильными группами гепаран-сульфат протеогликанов (Van den Berg et al., 2006; Noble et al., 2008). Гликокаликс опосредует начальные этапы адгезии клеток к положительно заряженной поверхности культурального пластика в условиях *in vitro*. Снижение адгезивности эндотелиальных клеток к пластику в

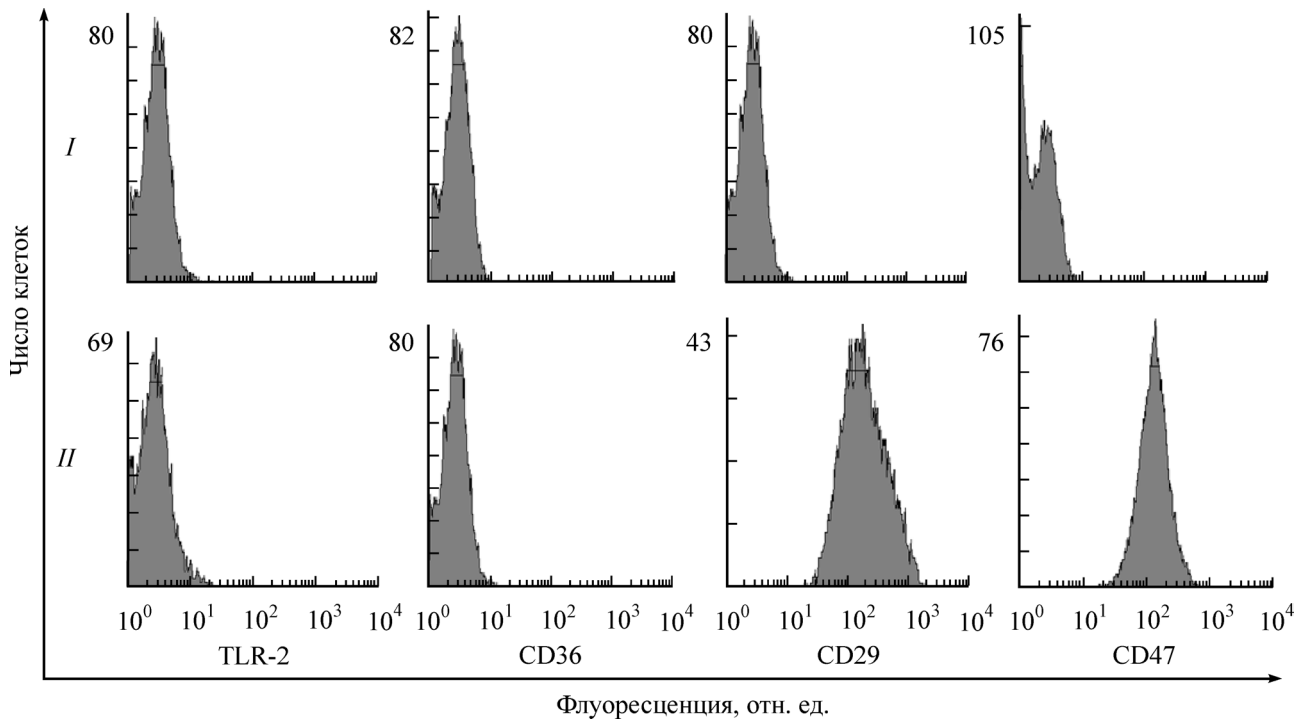


Рис. 7. Двухмерные гистограммы, отражающие экспрессию поверхностных молекул на клетках EA.hy926.

По горизонтали — средние значения интенсивности флуоресценции; ряд I — клетки окрашены изотипическими антителами, ряд II — клетки окрашены антителами против поверхностных молекул; по вертикали — количество проанализированных клеток.

присутствии ССК может быть связано с изменением поверхностного заряда клеток в условиях нашего эксперимента.

Интенсивность пролиферации и миграции клеток зависит от их взаимодействия с субстратом. Хотя механизмы, лежащие в основе этого явления, изучены недостаточно, показано, что частота деления клеток пропорциональна степени их расплывания (Албертс и др., 1994). Мигрирующие клетки образуют на своей поверхности динамичные структуры — филоподии и ламеллоподии, обеспечивающие временную адгезию клеток к подложке (Албертс и др., 1994). В пользу существования такой взаимосвязи свидетельствует обнаруженное нами однонаправленное ингибирующее влияние ССК на адгезию, миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток.

Ведущую роль в регуляции процессов адгезии, миграции и пролиферации клеток играют фосфокиназы ERK и FAK, обеспечивающие внутриклеточные сигнальные пути. ERK1 (p44 MAPK) и ERK2 (p42 MAPK) — члены семейства MAP-киназ, которые активируются под влиянием ростовых факторов, гормонов и фоболовых эфиров. Киназы ERK фосфорилируют цитоплазматические сигнальные молекулы, белки, ассоциированные с микротрубочками, и транскрипционные факторы, регулирующие пролиферацию, дифференцировку клеток и организацию цитоскелета (Boulton, Cobb, 1991; Payne et al., 1991; Clark, Hynes, 1996; Sivaraman et al., 1997). FAK — цитоплазматическая тирозинкиназа, которая связана с интегринными фокальными адгезионными контактами. FAK может интегрировать сигналы, связанные с подвижностью, пролиферацией и инвазивностью клеток. Нами обнаружено выраженное снижение исходно высокого уровня экспрессии фосфо-ERK и фосфо-FAK в эндотелиальных клетках при культивировании в присутствии ССК (Hunger-Glaser et al., 2003; Schlaepfer et al., 2004). Можно предположить,

что угнетающее влияние ССК на изученные функции эндотелиальных клеток частично опосредовано ингибцией экспрессии этих фосфокиназ.

Определенный вклад в снижение функциональной активности эндотелиальных клеток может вносить выявленное нами снижение уровня метаболизма. Полученные нами данные о влиянии компонентов ССК на метаболизм эндотелиальных клеток согласуются с результатами исследований, которые показали, что стрептолизин подавляет окислительные процессы в митохондриях мышечных клеток (Bernheimer et al., 1956).

Усиленное кровоснабжение в участках воспаления необходимо для развития эффективного иммунного ответа и последующей регенерации поврежденных тканей. Нарушение ангиогенных функций эндотелия компонентами *S. pyogenes* может способствовать снижению перфузии, развитию гипоксии и последующему некрозу тканей, что характерно для стрептококковых поражений.

Известно, что некоторые компоненты бактерий (липотейхоевые кислоты, бактериальная ДНК, экзотоксины и эндотоксины) обладают прямой и опосредованной противоопухолевой активностью и используются в терапии злокачественных опухолей. Однократная внутритрипухолевая инъекция живых *S. pyogenes* M49 приводила к полной регрессии карциномы поджелудочной железы у мыши (Linnebacher et al., 2008). Наши исследования позволяют предположить, что антиангиогенные эффекты компонентов стрептококка могут вносить вклад в противоопухолевое действие этих бактерий.

Поскольку ССК является препаратом, в состав которого входят компоненты клеточной стенки бактерий, ферменты, нуклеиновые кислоты и др., ингибирование функций эндотелиальных клеток может быть результатом суммарного действия целого ряда продуктов жизнедеятельности микроба. Это предположение оправдывает ис-

пользование в экспериментах такого комплексного субстрата, однако, не исключает необходимости дальнейших исследований, направленных на выяснение роли отдельных компонентов стрептококка в реализации описанных эффектов.

### Список литературы

- Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Реф М., Робертс К., Уотсон Дж. 1994. Молекулярная биология клетки. Мир. М.: 2 : 540 с.
- Амчиславский Е. И., Соколов Д. И., Сельков С. А., Фрейдлин И. С. 2005. Пролиферативная активность человеческих эндотелиальных клеток линии EA.hy926 и ее модуляция. Цитология. 47 (5) : 393—403.
- Киселев П. Н. 1971. Токсикология инфекционных процессов. Л.: Медицина. 359 с.
- Atkin K. E., Brentnall A. S., Harris G., Bingham R. J., Erat M. C., Millard C. J., Schwarz-Linek U., Staunton D., Vakonakis I., Campbell I. D., Potts J. R. 2010. The Streptococcal binding site in the gelatin-binding domain of fibronectin Is consistent with a non-linear arrangement of modules. *J. Biol. Chem.* 285 : 36 977—36 983.
- Bernheimer A. W., Carlson A. S., Kellner A. 1956. Selective inhibition by preparations of streptococcal filtrates of the oxidative metabolism of mitochondria procured from rabbit myocardium. *J. Exp. Med.* 104 : 577—587.
- Boulton T. G., Cobb M. H. 1991. Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regulation.* 2 : 357—371.
- Bryant A. E., Hayes-Schroer S. M., and Stevens D. L. 2003. M Type 1 and 3 Group A Streptococci stimulate tissue factor-mediated procoagulant activity in human monocytes and endothelial cells. *Infection and immunity.* 71 : 1903—1910.
- Burns E., Marsiel A., Musser J. 1996. Activation of a 66-Kilodalton human endothelial cell matrix metalloprotease by Streptococcus pyogenes extracellular cysteine protease. *Infection and Immunity.* 64 : 4744—4750.
- Cines D. B., Pollak E. S., Buck C. A., Loscalzo J., Zimmerman G. A., McEver R. P., Pober J. S., Wick T. M., Konkle B. A., Schwartz B. S., Barnathan E. S., McCrae K. R., Hug B. A., Schmidt A.-M., Stern D. M. 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 91 : 3527—3561.
- Cines D. B., Pollak E. S., Buck C. A., Loscalzo J., Zimmerman G. A., McEver R. P., Pober J. S., Wick T. M., Konkle B. A., Schwartz B. S., Barnathan E. S., McCrae K. R., Hug B. A., Schmidt A.-M., Stern D. M. 1999. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 91 : 10.
- Clark E. A., Hynes R. O. 1996. Ras activation is necessary for integrin-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and cytosolic phospholipase A2 but not for cytoskeletal organization. *J. Biol. Chem.* 271 : 14 814—14 818.
- Cunningham M. W. 2000. Pathogenesis of group A Streptococcal infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 13 : 470—511.
- Danese S., Dejana E., Fiocchi C. 2007. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J. Immunol.* 178 : 6017—6022.
- Edgell C. J., McDonald C. C., Graham J. B. 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 80 : 3734—3737.
- Eliceiri B. P., Cheresh D. A. 2000. Role of alpha v integrins during angiogenesis. *Cancer.* 6 : 245—9.
- Hunger-Glaser I., Salazar E. P., Sinnett-Smith J., Rozengurt E. 2003. Lysophosphatidic acid, and epidermal growth factor rapidly stimulate focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-910. Requirement for ERK activation. *J. Biol. Chem.* 278 : 22 631—22 643.
- Kerr J. R. 1999. Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defence against microbial infection. *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.* 52 : 220—230.
- Khan F., Yamakami K., Mahmood J. Li B., Kikuchi T., Kumagai N., Morioka T., Yoshizawa N., Oite T. 2006. Alterations of cell adhesion molecules in human glomerular endothelial cells in response to nephritis-associated plasminogen receptor. *Nephron. Exp. Nephrol.* 105 : 53—64.
- La Sala A., Ferrari D., Di Virgilio F., Idzko M. 2003. Alerting and turning the immune response by extracellular nucleotides. *J. Leukocyte Biol.* 73 : 339—343.
- Linnebacher M., Maletzki C., Emmrich J., Kreikemeyer B. 2008. Lysates of *S. pyogenes* serotype M49 induce pancreatic tumor growth delay by specific and unspecific antitumor immune responses. *J. Immunother.* 31 : 704—13.
- Lucas R., Verin A. D., Black S. M., Catravas J. D. 2009. Regulators of endothelial and epithelial barrier integrity and function in acute lung injury. *Biochem. Pharmacol.* 77 : 1763—1772.
- Marouni M. J., Sela S. 2004. Fate of Streptococcus pyogenes and epithelial cells following internalization. *J. Med. Microbiol.* 53 : 1—7.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65 : 55—63.
- Navarre W. W., Schneewind O. 1999. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 : 174—229.
- Newman J. M. B., DiMaria C. A., Rattigan S., Steen J. T., Miller K. A., Eldershaw T. P. D., Clark M. G. 2000. Relationship of MTT reduction to stimulants of muscle metabolism. *Chemico-Biological Interactions.* 128 : 127—140.
- Nobbs H., Lamont R. J., Jenkinson H. F. 2009. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73 : 407—450.
- Noble M. I. M., Drake-Holland A. J., Vink H. 2008 Hypothesis: arterial glycocalyx dysfunction is the first step in the atherothrombotic process. *Quart. J. Med.* 101 : 513—51.
- Payne D. M., Rossomando A. J., Martino P., Erickson A. K., Her J. H., Shabanowitz J., Hunt D. F., Weber M. J., Sturgill T. W. 1991. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *European Molecular Biology Organization.* 10 : 885—892.
- Rohde M., Muller E., Chhatwal G. S., Talay S. R. 2003. Host cell caveolae act as an entry-port for group A streptococci. *Cell. Microbiol.* 5 : 323—42.
- Schlaepfer D. D., Mitra S. K., Ilic D. 2004. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim. biophys. acta.* 1692 : 77—102.
- Silverstein R. L., Febbraio M. 2009. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis and behavior. *Sci. Signal.* 2 : 3.
- Sivaraman V. S., Wang H., Nuovo G. J., Malbon C. C. 1997. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J. Clin. Invest.* 99 : 1478—1483.
- Stockbauer K. E., Magoun L., Liu M., Burns E. H., Gubba S., Renish S., Pan X., Bodary S. C., Baker E., Coburn J., Leong J. M., Musser J. M. 1999. A natural variant of the cysteine protease virulence factor of group A Streptococcus with an arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif preferentially binds human integrins  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha I I b \beta 3$ . *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 242—247.
- Takeda K., Akira S. 2001. Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors. *Jpn. J. Infect. Dis.* 54 : 209—219.
- Thern A., Wastfelt M., Lindahl G. 1998. Expression of two different antiphagocytic M proteins by Streptococcus pyogenes of OF+ lineage. *J. Immunol.* 160 : 1—10.
- Tsai P.-J., Lin Y.-S., Kuo C.-F., Lei H.-Y., Wu J.-J. 1999. Group A Streptococcus induces apoptosis in human epithelial cells. *Infection and Immunity.* 67 : 4334—4339.
- Van den Berg B. M., Nieuwdorp M., Stroes E.S.G., Vink H. 2006. Glycocalyx and endothelial dysfunction: from mice to men. *Pharmacol. Reports.* 56 : 75—80.



---

REGULATION OF ENDOTHELIAL CELLS FUNCTIONS BY ULTRASONIC  
SUPERNATANT OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

*E. A. Starikova, A. M. Lebedeva, L. A. Burova, I. S. Freidlin*

Institute of Experimented Medicine of the North West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg;  
e-mail: Starickova@yandex.ru

Angiogenesis and vascular remodeling are vital components of inflammation. As an inflammation evolves, vessels expand to supply nutrients and inflammatory mediators, sustaining the accumulation of activated immune cells in the affected tissues. This study demonstrates that ultrasonic supernatant of *Streptococcus pyogenes* has anti-angiogenic properties: inhibit EA.hy 926 human endothelial cells metabolism, adhesion, migration, proliferation. At the same time Streptococcal components inhibit signaling pathways that involve FAK and ERK1/2. These effects are not associated with necrosis or apoptosis in cell culture. Taking together, our results suggest that impairing angiogenic function of endothelial cells might contribute to the reduced tissue perfusion, hypoxia, and subsequent regional tissue necrosis caused by *Streptococci* group A.

**Key words:** angiogenesis, inflammation, endothelial cells, adhesion, migration, proliferation, *Streptococcus pyogenes*.

---