

Оригинальное исследование / Research article

Аполипопротеин А-I повышает активность лизосомальных гликозидаз в печени мышей с БЦЖ-индуцированным туберкулезным воспалением

Л.М. Поляков, Р.А. Князев, М.В. Котова, Г.С. Русских, Е.И. Соловьева, А.В. Рябченко

*НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

Резюме

В работе показана способность аполипопротеина А-I влиять на активность лизосомальных гликозидаз в печени мышей на модели БЦЖ-индуцированного туберкулезного воспаления. Цель исследования – изучить активность лизосомальных гликозидаз в печени мышей на модели БЦЖ-индуцированного туберкулезного воспаления после внутривенного введения аполипопротеина А-I. **Материал и методы.** Исследования выполнены на мышках-самцах СВА массой 20–22 г. Диссеминированное туберкулезное воспаление моделировали путем однократного внутрибрюшинного введения 0,5 мг вакцины БЦЖ. Активность лизосомальных гликозидаз оценивали спектрофлуориметрически по содержанию продуктов гидролиза соответствующих флуорогенных субстратов. **Результаты.** Туберкулезное воспаление приводило к выраженному снижению активности лизосомальных гликозидаз в печени по сравнению со здоровыми животными: β-галактозидазы – в 2,3 раза, β-глюкозидазы – в 2,8 раза, β-глюкуронидазы – в 2,5 раза. Внутривенное введение животным аполипопротеина А-I на фоне БЦЖ-инфицирования препятствовало уменьшению ферментативной активности гликозидаз, и эти величины практически не отличались от контрольных значений. **Заключение.** Ферментативная активность лизосомальных гликозидаз в группе мышей с внутривенным введением аполипопротеина А-I на фоне БЦЖ-инфицирования в 1,5–2 раза превышала соответствующие показатели в группе животных с БЦЖ-инфицированием без введения аполипопротеина А-I, т.е. без лечения.

Ключевые слова: аполипопротеин А-I, туберкулезное воспаление, БЦЖ, лизосомальные гликозидазы.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Автор для переписки: Поляков Л.М., e-mail: plm@niibch.ru

Для цитирования: Поляков Л.М., Князев Р.А., Котова М.В., Русских Г.С., Соловьева Е.И., Рябченко А.В. Аполипопротеин А-I повышает активность лизосомальных гликозидаз в печени мышей с БЦЖ-индуцированным туберкулезным воспалением. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2021;41(6):51–55. doi: 10.18699/SSMJ20210605

Apolipoprotein A-I increases the activity of lysosomal glycosidases in the liver of mice with BCG-induced tuberculosis inflammation

L.M. Polyakov, R.A. Knyasev, M.V. Kotova, G.S. Russkikh, E.I. Soloveva, A.V. Ryabchenko

*Institute of Biochemistry of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

Abstract

This work shows the ability of apolipoprotein A-I to influence the activity of lysosomal glycosidases in the liver of mice in a model of BCG-induced tuberculous inflammation. The aim of the investigation was to study the activity of lysosomal glycosidases in the liver of mice using a model of BCG-induced tuberculous inflammation after intravenous

administration of apolipoprotein A-I. **Material and methods.** The studies were performed on male CBA mice weighing 20–22 g. Disseminated tuberculous inflammation was modeled by a single intraperitoneal injection of 0.5 mg of BCG vaccine. The activity of lysosomal glycosidases was assessed spectrofluorimetrically by the content of hydrolysis products of the corresponding fluorogenic substrates. **Results.** Tuberculous inflammation led to a pronounced decrease in the activity of lysosomal glycosidases in the liver. Thus, β -galactosidase was decreased 2.3 times, β -glucosidase – 2.8 times, β -glucuronidase – 2.5 times compared with healthy animals. Intravenous injection of apolipoprotein A-I to animals against the background of BCG infection prevented a significant decrease in the enzymatic activity of glycosidases and these values practically did not differ from the control values. **Conclusions.** Enzymatic activity of lysosomal glycosidases in the group of mice with intravenous administration of apolipoprotein A-I against the background of BCG infection was 1.5–2 times higher than the corresponding indicators in the group of animals with BCG-infection without administration of apolipoprotein A-I, i.e. without treatment.

Key words: apolipoprotein A-I, tuberculous inflammation, BCG, lysosomal glycosidases.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Correspondence author: Polyakov L.M., e-mail: plm@niibch.ru

Citation: Polyakov L.M., Knyasev R.A., Kotova M.V., Russkikh G.S., Soloveva E.I., Ryabchenko A.V. Apolipoprotein A-I increases the activity of lysosomal glycosidases in the liver of mice with BCG-induced tuberculosis inflammation. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021;41(6):51–55. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210605

Введение

На сегодняшний день считается доказанной важнейшая роль лизосомальных гидролаз в процессах воспаления любого генеза, в том числе асептического [1]. В ранее проведенных исследованиях нами была показана способность аполипопротеина А-I (апо А-I) взаимодействовать с изониазидом, что явилось основанием для изучения возможности использования этого белка в качестве транспортной формы противотуберкулезного препарата. Применение комплекса «апо А-I – изониазид» в терапии мышей с БЦЖ-индуцированным туберкулезным воспалением приводило к повышению в печени активности кислой фосфатазы и катепсина D, сниженной под влиянием микобактерий [2]. Поскольку незавершенность процесса фагоцитоза при туберкулезе может быть обусловлена недостаточной активностью гидролаз [3, 4], целью настоящего исследования явилось изучение влияния апо А-I на активность лизосомальных гликозидаз – β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23), β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.21) и β -глюкуронидазы (КФ 3.2.1.31) у мышей с БЦЖ-индуцированным туберкулезным воспалением.

Материал и методы

Исследования проводили на мышках-самцах СВА массой 20–22 г. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с принципами гуманности, изложенными в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных». Диссеминированное туберкулезное

воспаление моделировали путем однократного внутрибрюшинного введения 0,5 мг вакцины БЦЖ («Микроген», г. Ставрополь) в 1 мл физиологического раствора [5]. Развитие устойчиво воспроизводимой модели туберкулезного воспаления тестировали через 14 дней с помощью морфологического исследования паренхиматозных органов. При изучении в световом микроскопе образцов тканей наблюдали формирующиеся гранулемы в печени и легких (до 20–30 клеток), состоящие преимущественно из макрофагов и лимфоцитов (данные не приведены). В селезенке отмечалась лимфоидная и макрофагальная гиперплазия. Окрашивание по Цилю – Нильсену показало наличие микобактерий в очагах инфекции, наиболее выраженное в легких и забрюшинной жировой клетчатке. Через 1 месяц после введения вакцины БЦЖ размер гранул увеличивался до 50–60 клеток, среди них появлялись эпителиоидно-клеточные, а также смешанно-клеточные гранулемы, образованные эпителиоидными клетками, макрофагами и лимфоцитами. Животные были разделены на три группы по 6 особей: 1) контрольная группа (здоровые мыши); 2) БЦЖ-инфицированные мыши; 3) БЦЖ-инфицированные мыши с внутривенным введением апо А-I (апо А-I выделяли из липопротеинов высокой плотности плазмы крови человека описанным ранее способом [6]).

Инъекции апо А-I начинали через две недели после инфицирования и проводили в течение последующих двух недель. Апо А-I вводили в одну из хвостовых вен 2 раза в неделю (200 мкг в 100 мкл физиологического раствора). Контроль-

ным (здоровым) животным вводили равный объем физиологического раствора.

Для выделения фракции лизосом печеночный гомогенат центрифугировали трижды: при 750 g в течение 10 мин для осаждения ядер и неразрушенных клеток печени, при 3300 g в течение 10 мин для осаждения фракции тяжелых митохондрий и при 16300 g в течение 20 мин для осаждения лизосом. Осадок ресуспендировали в 0,05 М трис-НСI буфере (pH 7,4), содержащем 0,25 М сахарозы.

Ферментативную активность β -d-гликозидазы (КФ 3.2.1.21), β -d-галактозидазы (КФ 3.2.1.23) и β -d-глюкуронидазы (КФ 3.2.1.31) в лизосомальной фракции гомогената печени определяли с использованием соответствующих флуорогенных субстратов 4-метилумбеллиферил- β -d-глюкопиранозида (Sigma, США, M3633), 4-метилумбеллиферил- β -d-галактозида (Diagnostic Chemicals Ltd., США) и 4-метилумбеллиферил- β -d-глюкуронида (Diagnostic Chemicals Ltd). Измерения проводили на спектрофлуориметре RF-5301PC (Shimadzu, Япония) при длине волны возбуждения 365 нм и эмиссии 465 нм. Концентрацию белка определяли по Бредфорду, на спектрофотометре Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific, США). Спектроскопические измерения выполняли в ЦКП на базе НИИ биохимии ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты

Активность лизосомальных гликозидаз (β -галактозидазы, β -гликозидазы и β -глюкуро-

нидазы) в печени мышей с туберкулезным воспалением представлена в таблице.

Обращают на себя внимание существенные отличия активности ферментов в контрольной группе животных. Так, самая высокая ферментативная активность отмечалась для β -глюкуронидазы, а самая низкая – для β -гликозидазы (более чем девятикратное различие). Инфицирование мышей вакциной БЦЖ через 4 недели вызывало значимое уменьшение активности гидролаз по сравнению с контрольной группой: активность β -галактозидазы снижалась в 2,3 раза ($p = 0,0016$), β -гликозидазы – в 2,8 раза ($p = 0,0012$), β -глюкуронидазы – в 2,5 раза ($p = 0,0011$).

Внутривенное введение животным апо А-I на фоне БЦЖ-инфицирования препятствовало снижению ферментативной активности гликозидаз, величины практически не отличались от контрольных значений. Кроме того, следует подчеркнуть, что ферментативная активность всех трех лизосомальных гликозидаз в группе мышей с внутривенным введением апо А-I на фоне БЦЖ-инфицирования в полтора–два раза превышала величину соответствующих показателей животных с БЦЖ-инфицированием без введения апо А-I, т.е. без лечения.

Обсуждение

Проблема фагосомно-лизосомного слияния при туберкулезе, осложняющая лечение, а также предполагаемое влияние апо А-I на функциональное состояние лизосомальных мембран определили выбор данного белка в качестве фактора, модулирующего активность лизосомальных гликозидаз у мышей с БЦЖ-индуцированным туберкулезным воспалением. Следует отметить, что влияние микобактерий на активность представленных гидролаз может быть различным в зависимости от вида фермента и степени пато-

Активность лизосомальных гликозидаз у мышей в контроле, у мышей с туберкулезным воспалением и при внутривенном введении апо А-I на фоне воспаления

Activity of lysosomal glycosidases in control mice, in mice with tuberculous inflammation and after intravenous administration of apo A-I against the background of inflammation

Активность фермента (нмоль субстрата/мг белка в час)	Группа		
	Контроль	БЦЖ	БЦЖ + апо А-I
β -галактозидаза	44,61 \pm 4,57	19,80 \pm 2,56*	31,52 \pm 2,87 [#]
β -гликозидаза	15,57 \pm 2,35	5,57 \pm 0,65*	12,45 \pm 2,21 [#]
β -глюкуронидаза	145,18 \pm 13,32	58,58 \pm 4,43*	124,68 \pm 15,0 [#]

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – животных группы контроля, [#] – БЦЖ-инфицированных животных.

генности возбудителя. В частности, показано, что микобактерии туберкулеза могут подавлять гидролазную активность лизосом перитонеальных макрофагов у мышей [7], и, следовательно, снижение активности гидролаз может являться следствием ингибирования лизосомальных гидролаз под действием микобактерий. Однако если учитывать способность микобактерий нарушать функциональное состояние лизосомального аппарата, можно сделать заключение о том, что снижение ферментативной активности гидролаз при моделировании туберкулезного воспаления является фактором, препятствующим уничтожению и элиминации возбудителя. Отсутствие уменьшения активности лизосомальных гидролаз в результате внутривенного введения апо А-I на данной модели туберкулезного воспаления может как раз являться положительным фактором, направленным на уничтожение микобактерий.

Полученные нами данные свидетельствуют, что апо А-I способен оказывать противовоспалительный эффект, по-видимому, снижая гиперактивность макрофагов. Так, показано, что апо А-I подавляет опосредованную CD40 провоспалительную передачу сигналов в макрофагах, предотвращая транслокацию TRAF-6 в липидные рафты посредством ABCA1-зависимой регуляции оттока свободного холестерина [8]. Это согласуется с данными о способности апо А-I снижать продукцию ФНО- α и ИЛ-1 β моноцитами посредством блокировки контакт-индуцированного взаимодействия с Т-лимфоцитами [9]. Кроме того, обнаруженные нами факты могут являться отражением антимикробных свойств апо А-I, описанных в литературе для некоторых видов стафилококков [10] и обусловленных, по мнению авторов, взаимодействием амфипатных областей молекулы белка с липополисахаридами клеточной стенки бактерий. Противовоспалительная функция апо А-I, представленная в данной работе, может являться основой для новых терапевтических подходов при лечении воспалительных заболеваний, таких как туберкулез, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, системная красная волчанка и атеросклероз.

Выводы

1. БЦЖ-индуцированное туберкулезное воспаление вызывает значимое снижение в печени активности лизосомальных гликозидаз (β -галактозидазы – в 2,3 раза, β -глюкозидазы – в 2,8 раза, β -глюкуронидазы – в 2,5 раза по сравнению с нелеченным контролем).

2. Внутривенное введение мышам апо А-I на фоне туберкулезного воспаления не допускает

значимого снижения ферментативной активности гликозидаз относительно контрольных величин.

3. Ферментативная активность всех трех лизосомальных гликозидаз в группе мышей с внутривенным введением апо А-I на фоне БЦЖ-инфицирования в 1,5–2 раза превышала соответствующие показатели в группе животных с БЦЖ-инфицированием без введения апо А-I (без лечения).

Список литературы / References

1. Rozenfeld P., Feriozzi S. Contribution of inflammatory pathways to Fabry disease pathogenesis. *Mol. Genet. Metab.* 2017;122(3):19–27. doi: 10.1016/j.ymgme.2017.09.004
2. Суменкова Д.В., Поляков Л.М., Панин Л.Е. Влияние комплекса изониазида с аполипопротеином А-I на активность ферментов лизосом у мышей с моделью туберкулезного воспаления. *Эксперим. и клин. фармакол.* 2012;75(11):28–30.
- Sumenkova D.V., Polyakov L.M., Panin L.E. Influence of isoniazid complex with A-I apolipoprotein on activity of lysosomal enzymes in mice with tuberculous inflammation model. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology.* 2012;75(11):28–30. [In Russian].
3. Chua J., Vergne I., Master S., Deretic V. A tale of two lipids: Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest. *Curr. Opin. Microbiol.* 2004;7(1):71–77. doi: 10.1016/j.mib.2003.12.011
4. Hmama Z., Sendide K., Talal A., Garcia R., Dobos K., Reiner N.E. Quantitative analysis of phagolysosome fusion in intact cells: inhibition by mycobacterial lipoarabinomannan and rescue by an 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3-phosphoinositide 3-kinase pathway. *J. Cell. Sci.* 2004;117(Pt. 10):2131–2140. doi: 10.1242/jcs.01072
5. Шкурупий В.А. Туберкулезный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия. М.: Изд-во РАМН, 2007. 536 с.
- Shkurupy V.A. Tuberculous granulomatosis. Cytophysiology and address therapy. Moscow, 2007. 536 c. [In Russian].
6. Sumenkova D.V., Polyakov L.M., Panin L.E. Apolipoprotein A-I as a carrier of lipopolysaccharide into rat hepatocytes. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013;155(6):738–740. doi: 10.1007/s10517-013-2240-z
7. Созинов В.А., Метелицына И.П., Плотникова Е.К. Влияние микобактерий туберкулеза на активность лизосомальных факторов перитонеальных макрофагов мышей. *Пробл. туберкулеза.* 1993;5:44–47.
- Sozinov V.A., Metelitsyna I.P., Plotnikova E.K. Influence of mycobacterium tuberculosis on the activity of lysosomal factors of peritoneal macrophages in mice. *Problemy tuberkuleza = Problems of Tuberculosis.* 1993;5:44–47. [In Russian].

8. Yin K., Chen W.J., Zhou Z.G., Zhao G.J., Lv Y.C., Ouyang X.P., Yu X.H., Fu Y., Jiang Z.S., Tang C.K. Apolipoprotein A-I inhibits CD40 proinflammatory signaling via ATP-binding cassette transporter A1-mediated modulation of lipid raft in macrophages. *J. Atheroscler. Thromb.* 2012;19(9):823–836. doi: 10.5551/jat.12823
9. Hyka N., Dayer J.M., Modoux C., Kohno T., Edwards C.K., Roux-Lombard P., Burger D. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood.* 2001;97(8):2381–2389. doi: 10.1182/blood.v97.8.2381
10. Tada N., Sakamoto T., Kagami A., Mochizuki K., Kurosaka K. Antimicrobial activity of lipoprotein particles containing apolipoprotein A1. *Mol. Cell. Biochem.* 1993;119(1-2):171–178. doi: 10.1007/BF00926868

Сведения об авторах:

Лев Михайлович Поляков, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0001-5905-8969, e-mail: plm@niibch.ru
Роман Александрович Князев, к.б.н., ORCID: 0000-0003-2678-8783, e-mail: Knjazev_roman@mail.ru
Мария Владимировна Котова, ORCID: 0000-0001-6276-9630, e-mail: zerokiri@mail.ru
Галина Сергеевна Русских, ORCID: 0000-0003-1565-5248, e-mail: Russkikh_g@mail.ru
Елена Игоревна Соловьева, e-mail: klena01@gmail.com
Александр Владимирович Рябченко, к.б.н., ORCID: 0000-0002-1658-4982, e-mail: borrelia@mail.ru

Information about the authors:

Lev M. Polyakov, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0001-5905-8969, e-mail: plm@niibch.ru
Roman A. Knyazev, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0003-2678-8783, e-mail: Knjazev_roman@mail.ru
Mariay V. Kotova, ORCID: 0000-0001-6276-9630, e-mail: zerokiri@mail.ru
Galina S. Russkikh, ORCID: 0000-0003-1565-5248, e-mail: Russkikh_g@mail.ru
Elena I. Soloveva, e-mail: klena01@gmail.com
Aleksandr V. Ryabchenko, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-1658-4982, e-mail: borrelia@mail.ru

Поступила в редакцию 06.09.2021
После доработки 15.09.2021
Принята к публикации 02.11.2021

Received 06.09.2021
Revision received 15.09.2021
Accepted 02.11.2021