

ВЛИЯНИЕ Fc-ФРАГМЕНТОВ НОРМАЛЬНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА G НА РАЗВИТИЕ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА, ИНДУЦИРОВАННОГО ШТАММАМИ *STREPTOCOCCUS PYOGENES*, СВЯЗЫВАЮЩИМИ РАЗНЫЕ КЛАССЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Л.А. Бурова, П.В. Пигаревский, В.А. Снегова, Артем А. Тотолян

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Постстрептококковый гломерулонефрит, одно из серьезных осложнений острой инфекции, вызванной стрептококками группы А (СГА), остается до настоящего времени в поле зрения клиницистов и исследователей. Ранее мы показали, что клинические (вирулентные) штаммы СГА с документированной нефритогенной активностью были способны связывать Fc-фрагмент мономерных или агрегированных IgG человека и ряда млекопитающих. Кроме того, в экспериментах на кроликах были получены доказательства ведущей роли стрептококковых IgG Fc-связывающих белков в инициации постстрептококкового гломерулонефрита, сходного по иммуноморфологическим проявлениям с заболеванием у человека. Известна также способность нормального IgG и его Fc-фрагментов подавлять развитие экспериментального гломерулонефрита. Целью настоящего исследования являлось изучение блокирующей способности препарата очищенных Fc-фрагментов нормального IgG кролика на развитие гломерулонефрита, индуцированного штаммами *S. pyogenes* генотипов *emm1*, *emm12* и *emm60*, связывающими, соответственно, различные формы иммуноглобулинов: мономерный IgG, иммунные комплексы и IgA. **Материалы и методы.** Для введения кроликам были использованы штаммы СГА генотипов *emm1*, *emm12* и *emm60*, инициирующие развитие гломерулонефрита и IgA-нефропатии. Fc-фрагменты были получены путем ферментативного переваривания нормального IgG кролика с последующей очисткой на колонке с Sepharose FF, конъюгированной с протеином G. Для оценки иммуноморфологических изменений в почечной ткани кролика применяли морфометрический анализ. **Результаты.** Были выявлены разные по интенсивности и локализации патологические изменения в почечной ткани подопытных животных. Для стрептококков генотипов *emm1* и *emm12* был характерен постстрептококковый гломерулонефрит, первично проявляющийся отложением IgG или IgG–анти-IgG иммунных комплексов в базальной мембране клубочков. Морфологические изменения оценивались как мембранозно-пролиферативный процесс. Между тем, для IgA-гломерулонефрита были свойственны отложения IgA в мезангиальных клетках клубочков, ведущие к мезангиально-пролиферативному процессу. Внутривенное введение препарата Fc-фрагментов нормального IgG кролика по-разному влияло на патологические изменения: 1) Fc-фрагменты IgG полностью подавляли развитие процесса, индуцированного штаммом генотипа *emm1*; 2) частично подавляли измене-

Адрес для переписки:

Тотолян Артем Акович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-68-74.
E-mail: totolian@hotmail.com

Contacts:

Artem A. Totolian
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Acad. Pavlov str., 12,
Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-68-74.
E-mail: totolian@hotmail.com

Библиографическое описание:

Бурова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Тотолян Артем А. Влияние Fc-фрагментов нормального иммуноглобулина G на развитие гломерулонефрита, индуцированного штаммами *Streptococcus pyogenes*, связывающими разные классы иммуноглобулинов // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 55–63. doi: 10.15789/2220-7619-IOI-1226

Citation:

Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Totolian Artem A. Impact of IgG Fc-fragments on experimental glomerulonephritis induced by *Streptococcus pyogenes* strain binding various immunoglobulin classes // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 55–63. doi: 10.15789/2220-7619-IOI-1226

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ №14-04-00390.

ния, вызванные штаммом генотипа *emm12* и 3) не влияли на процесс, вызванный штаммом генотипа *emm60*. **Заключение.** Приведенные данные указывают на существование различий в механизмах поражения почечных гломерул с участием различных IgFc-рецепторных белков стрептококков группы А. Представляют интерес дальнейшие исследования возможного профилактического или лечебного воздействия Fc-фрагмента IgG на процессы иммунокомплексной природы, осложняющие стрептококковые заболевания.

Ключевые слова: *Streptococcus pyogenes*, Fc-фрагмент IgG, экспериментальный стрептококковый гломерулонефрит, IgG-связывающая активность стрептококка, IgA-связывающая активность стрептококка.

IMPACT OF IgG Fc-FRAGMENTS ON EXPERIMENTAL GLOMERULONEPHRITIS INDUCED BY STREPTOCOCCUS PYOGENES STRAIN BINDING VARIOUS IMMUNOGLOBULIN CLASSES

Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Totolian Artem A.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The pathogenesis of poststreptococcal glomerulonephritis (PSGN), a major complication of acute infections caused by group A streptococci (GAS) remains unclear. Several theories, based on the role of certain streptococcal virulence factors, as well as immunological mimicry between GAS and renal tissue, have been proposed. Earlier, we reported that many virulent clinical GAS isolates showing confirmed nephritogenic activity were capable of non-immune Fc binding of monomeric or aggregated IgG. Moreover, a rabbit model of PSGN allowed to obtain findings regarding a crucial role of streptococcal IgG Fc binding proteins belonging to the M family surface proteins, in the onset of PSGN. Rabbits injected with inactivated IgGFcBP-positive streptococci, acquired changes in the renal tissue with deposited IgG and complement C3, as well as signs of immune inflammation characteristic for human PSGN. Also, it was shown that the induction of experimental glomerulonephritis could be inhibited after normal IgG or its purified Fc fragments were inoculated at early stages of the process. The data obtained in rabbits injected with group A streptococcal type M60 also showed pathogenic functions of the IgA Fc-binding proteins of GAS. The aim of the study was to examine inhibiting activity of the purified rabbit IgG Fc fragments on the manifestations of glomerulonephritis induced by *S. pyogenes* strains capable of binding diverse forms of immunoglobulins such native IgG, immune complexes, and IgA. **Materials and methods.** GAS strains of *emm1*, *emm12* and *emm60* genotypes were used to induce PSGN or IgA-nephropathy in rabbits. Fc fragments derived from rabbit IgG were obtained by enzymatic digestion and purified by affinity chromatography on a protein G-sepharose FF column. Immunomorphological changes of renal tissue were estimated by morphometric analysis. **Results.** In the present study, using the rabbit model, we revealed pathological changes of different intensity and localization in the renal tissue. For streptococci of the *emm1* and *emm12* genotypes, PSGN was characterized by deposition of IgG or IgG-anti-IgG immune complexes within the basal glomerular membrane. Morphological changes were evaluated as a membranous-proliferative glomerulonephritis. Meanwhile, IgA-glomerulonephritis is characterized by deposition of IgA in mesangial cells of glomeruli, leading to the mesangial-proliferative glomerulonephritis or IgA-nephropathy. Intravenously administered purified Fc fragments derived from normal rabbit IgG varied in effects on pathological processes: (i) IgG Fc fragments of fully inhibited development of the PSGN induced by IgG Fc binding strain of *emm1* genotype, (ii) IgG Fc fragments of partially reverted changes caused by the *emm12* genotype strain, which was binding only to immune complexes, and (iii) had no effects on pathological changes caused by the *emm60* genotype GAS strain, which was binding only IgA. **Conclusion.** The data obtained point and emergence of differences in mechanisms of renal lesions development at glomerulonephritis, depending on the *emm* genotype of GAS strain. In addition, it also confirmed GAS-derived involvement for various IgFc-receptor proteins in the pathology. Further studies on potential prophylactic or curative effects of IgG Fc fragments in PSGN should therefore be of interest. The findings might suggest a new therapeutic approach for non-suppurative poststreptococcal diseases.

Key words: *Streptococcus pyogenes*, IgG Fc fragment, experimental streptococcal glomerulonephritis, IgG binding by streptococcal cells, IgA binding by streptococcal cells.

Введение

Неспецифическое взаимодействие Fc-фрагментов иммуноглобулинов G с Fc-рецепторными структурами (FcR) тканей млекопитающих широко распространено в живых системах и выполняет в них функционально значимые роли. Для возбудителей инфекций это один из факторов агрессии, помогающий микробу избежать влияния иммунной системы макроорга-

низма, выживать и размножаться в нем [26, 27]. В то же время для организма-хозяина оно служит ключевым фактором поддержания баланса его иммунной системы [7, 15, 17]. Взаимодействие Fc рецепторов возбудителя с Fc частью иммуноглобулинов в определенных условиях, каковыми являются энзиматическое расщепление иммуноглобулинов [30], формирование аутоантигена или иммунных комплексов [1, 4, 9], в инфицированном организме может привести к разви-

тию реакция воспаления. Утилизация иммунных комплексов посредством разных тканевых FcR [16, 25, 29] сопряжена с воспалением, приводящим к повреждению ткани. *Streptococcus pyogenes* относится к инфекционным агентам, обладающим FcR-активностью, что сочетается с его ревматогенностью или нефритогенностью [21]. В развитии патологического процесса нельзя отрицать и присутствие различных FcR в тканях сердечно-сосудистой и мочевыделительной систем [13].

В предыдущих работах по механизмам пост-стрептококкового гломерулонефрита (PSGN) нам удалось создать экспериментальную модель патологии почечных клубочков. В качестве индуцирующих факторов были использованы IgG Fc-позитивные штаммы *S. pyogenes emm1*, 4, 22 генотипов либо M-белки, Emm и Mpr генотипа *emm22*, ответственные за Fc-связывание IgG [4, 9]. При этом были определены морфометрические, иммунологические и иммуногистохимические параметры мембранозно-пролиферативного поражения клубочков. Вслед за зарубежными специалистами [14], нами была установлена способность Fc-фрагментов (но не Fab-фрагментов) нормального IgG человека или кролика подавлять иммунное воспаление и последующее морфологическое повреждение в структурах почечных клубочков. Блокирующий эффект препарата Fc-фрагментов нормального IgG может быть объяснен их способностью либо блокировать активность стрептококковых FcR, либо подавлять взаимодействие тканевых FcR с образующимися в организме иммунными комплексами IgG–anti-IgG.

Позже нами были разработаны модели гломерулонефрита посредством иммунизации кроликов *S. pyogenes* генотипов *emm12* [1, 10] и *emm60* [3], связывающих иммунные комплексы и IgA соответственно. В первом случае процесс также развивался преимущественно по типу PSGN, а во втором — соответствовал IgA-нефропатии (IgAN) по выраженному отложению IgA в мезангиальных клетках клубочков.

В настоящей работе приводятся данные по сравнению блокирующей способности препарата Fc-фрагментов нормального IgG кролика на проявления гломерулонефрита, индуцированные штаммами *S. pyogenes*, неиммунно связывающими разные формы иммуноглобулинов: нативный IgG, иммунные комплексы и IgA.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использовали стрептококки группы А (СГА) *emm1*, *emm12* и *emm60* генотипов (штаммы M1(40/58),

M12(1800) и M60(3/71), полученные из стрептококковой референс-лаборатории ВОЗ (Прага, Чешская Республика).

Получение очищенных препаратов Fc-фрагментов IgG кролика. Fc-фрагменты нормального IgG кролика были получены путем его переваривания активированным папаином фирмы Merck. Для получения очищенных Fc-фрагментов была применена аффинная хроматография на колонке Sepharose FF, конъюгированной с протеином G (GE Healthcare), и гель-фильтрация на колонке с Superdex 75. Чистоту препаратов контролировали в реакции иммунной преципитации, используя набор соответствующих иммунных сывороток против Fc-, Fab-фрагментов IgG кролика, а также против кроличьих иммуноглобулинов других классов.

IgA для получения анти-IgA антител был выделен из сыворотки больного IgA-миеломой, любезно предоставленной д-ром A. Grubb (Отдел биохимии Лундского Университета, Швеция). Для очистки IgA использовали Capture Select IgA аффинную матрицу фирмы Life Technologies (США), содержащую V_HH домен антител, распознающий все подклассы мономерного, димерного и секреторного IgA, конъюгированный с альдегид-активированной агарозой. Очистку IgA проводили с использованием FPLC хроматографической системы. Очищенный IgA был использован для иммунизации кроликов. Кроличий IgG с анти-IgA специфичностью был выделен из пула кроличьих сывороток посредством аффинной хроматографии на колонке Sepharose FF, конъюгированной с протеином G.

Экспериментальный гломерулонефрит. Моделирование постинфекционного гломерулонефрита выполняли на основании разрешения на работу с животными (Animal Welfare Assurance#A5243-01). Нефритогенность СГА генотипов *emm1* и *emm12* тестировали на кроличьей модели PSGN, описанной нами ранее [9]. Кратко ее схема заключается в следующем: микробные клетки, выращенные в бульоне Todd-Hewitt (Difco, США), убивали нагреванием при 60°C в течение 1,5 ч, обрабатывали 1М раствором KSCN для удаления связанных иммуноглобулинов и 6 раз отмывали PBS [9]. Взвесь бактерий в концентрации 10⁹/мл КФЕ вводили кроликам внутривенно 3 раза в неделю в течение 4 недель. К этому периоду, согласно нашим предшествующим данным [9], у кроликов были обнаружены первые гистоморфологические изменения в почечной ткани. Экспериментальные животные были произвольно разделены на две группы: первой группе продолжали вводить стрептококковые клетки, а второй группе — на фоне инъекций стрептококков вводили препараты Fc-фрагментов IgG кролика в концентрации 2 мг/мл. Через неделю

после последней инъекции почки обескровленных животных подвергали иммуноморфологическому и гистологическому исследованию.

Каждый тестируемый штамм испытывали минимум на 6 кроликах.

Экспериментальная модель IgA-гломеруло-нефрита с использованием СГА генотипа *emm60* описана нами ранее [3]. Схема введения кроликам Fc-фрагментов IgG была аналогична описанной выше.

Имуноморфологическое изучение почечной ткани. Почечная ткань каждого кролика подвергалась иммуногистохимическому исследованию в сочетании с технологией морфометрии для количественной оценки полученных данных.

Для выявления депозиции IgG в ткани использовали козьи сыворотки против кроличьего IgG. В качестве вторых антител применяли кроличьи анти-козьи антитела, меченные пероксидазой корня хрена (Southern Biotechnology Associates, США).

Для выявления депозиции IgA, тканевые срезы были обработаны кроличьим IgG с анти-IgA специфичностью. В качестве вторых антител использовали козьи антитела против кроличьего IgG, меченные пероксидазой корня хрена.

Для тестирования продукции IFN γ использовали моноклональные мышинные антитела против IFN γ , клон 25723, производства Sigma-Aldrich. Рабочее разведение 50 мкг/мл.

Депозицию С3 компонента комплемента определяли с помощью кроличьей сыворотки против С3 компонента комплемента человека (Daco, Дания), перекрестно реагирующего с С3 комплемента кролика. В качестве вторых антител использовали козьи антитела против кроличьего IgG, меченные пероксидазой корня хрена (Sigma, США).

Продукцию TNF α выявляли козьей сывороткой против кроличьего TNF α (AMS Biotechnology, США) с последующей обработкой срезов кроличьими анти-козьими антителами, меченными пероксидазой.

Первоначально производили стандартную микроскопию тканевых образцов после их окрашивания гематоксилин-эозином при малых и средних увеличениях ($\times 100$ – 600) для оценки тканевых изменений в различных полях зрения. Затем иммуноокрашенные образцы исследовали при большем увеличении ($\times 900$ – 1100) с целью выявления депозиции IgG и С3, а также экспрессии TNF α и IFN γ .

Морфометрическая оценка изменений в почечной ткани производилась следующим образом: в корковом веществе в 10 произвольно выбранных полях зрения при увеличении $\times 700$ отдельно подсчитывали среднее количество нормальных и поврежденных гломерул.

Для определения области поврежденных проксимальных или дистальных канальцев в корковом или мозговом слое использовали стандартную морфометрическую сетку, большой квадрат которой состоял из 256 малых квадратов. Ее накладывали на поверхность исследуемого образца ткани и подсчитывали количество малых квадратов с деструктивно-дегенеративными изменениями в ткани. Полученную величину принимали за показатель степени тканевой альтерации. Подобный подход применяли и для оценки клеточной инфильтрации как в корковом, так и в мозговом слоях почек. Полученные результаты подвергали статистической обработке [11].

Результаты

Для получения сравнительных данных по изучению нефритогенной активности штаммов *S. pyogenes*, различающихся по Fc-связыванию IgG, IgG-содержащих иммунных комплексов и IgA, были отобраны СГА генотипов *emm1*, *emm12* и *emm60* соответственно. Каждый штамм испытывали на трех кроликах. Полученные усредненные морфометрические результаты, оценивающие патоморфологическую активность каждого из использованных штаммов стрептококков, представлены в таблице 1.

Полученные данные указывают на то, что все отобранные штаммы обладали нефритогенностью с той лишь разницей, что штаммы *emm1* и *emm12*, в отличие от штамма *emm60*, приводили к развитию PSGN, между тем как штамм *emm60* приводил к проявлениям IgA-нефропатии. Поражение гломерул, вызванное штаммами *emm1* и *emm12*, имело место в 40–49% случаев, между тем как площадь поражения проксимальных и дистальных канальцев составляла $60,2 \pm 31$ – 116 ± 36 и $60,8 \pm 14,6$ – $110 \pm 41,5$ малых квадратов морфометрической сетки соответственно. Зона лимфоцитарной инфильтрации в корковом слое соответствовала $46,3 \pm 13$ – $68,5 \pm 24$, а в мозговом слое — $74,3 \pm 9,8$ – $94,3 \pm 30$ малым квадратам сетки. Соответствующие показатели для штамма *emm60* составляли: поражение гломерул — 43%, площади повреждения канальцев — $61,3 \pm 19$ и $62,8 \pm 14,6$, а площади лимфоцитарной инфильтрации — $51,3 \pm 13$ и $69,3 \pm 7,8$. Эти результаты послужили фоном для изучения влияния препаратов, очищенных Fc фрагментов нормального IgG кролика на вызываемые разными штаммами СГА процессы в почках (табл. 2, 3 и 4).

Результаты опытов свидетельствуют о том, что Fc-фрагменты IgG способны полностью подавлять только патологический процесс, вызванный СГА генотипа *emm1*, связывающим нативный IgG (табл. 2, рис., II обложка).

Таблица 1. Сравнительные морфометрические показатели нефритогенной активности штаммов *S. pyogenes*, различающихся по Fc-связыванию IgG, IgA и иммунных комплексовTable 1. Comparative morphometric data of nephritogenic activity of *S. pyogenes* strains differentiated by Fc-binding of IgG, immune complexes and IgA

Штамм генотипа Strain of genotype	Корковый слой Cortex				Мозговой слой Medulla		Результат Result
	Число гломерул Number of glomeruli		Иммунное воспаление Immune inflammation		Иммунное воспаление Immune inflammation		
	в норме normal	поврежденных destructive	в зоне ПК* in the area of PT*	зона ЛИ** the area of LI**	в зоне ДК*** in the area of DT***	зона ЛИ** the area of LI**	
<i>emm1</i>	5,2±0,6	4,0±0,6	60,2±31	46,3±13	60,8±14,6	74,3±9,8	PSGN
<i>emm12</i>	5,0±0,8	4,9±0,4	116±36	68,5±31	110±41,5	94,3±30	PSGN
<i>emm60</i>	5,8±0,8	4,3±0,9	61,2±19	51,3±13	62,8±14,6	69,3±7,8	IgAN

Примечания. ПК* — проксимальный каналец; ЛИ** — лимфоцитарная инфильтрация; ДК*** — дистальный каналец.

PSGN — постстрептококковый гломерулонефрит; IgAN — IgA-нефропатия.

Notes. PT* — the proximal tubule; LI** — the lymphocytic infiltration; DT*** — the distal tubule. PSGN — poststreptococcal glomerulonephritis; IgAN — IgA-nephropathy)

Патологические процессы в почечной ткани, индуцированные штаммом *emm12* (связывает иммунные комплексы, но не нативный IgG), оказались подавленными Fc-фрагментами кроличьего IgG лишь частично, а индуцированные штаммом *emm60* (связывает только IgA), практически не были чувствительны к вводимым препаратам Fc-фрагментов кроличьего IgG.

Согласно данным таблицы 2, препарат Fc-фрагментов нормального IgG подавляет поражение клубочков и каналцев и препятствует развитию воспалительных проявлений в ткани: отложению IgG, C3 компонента комплемента, про-

дукции провоспалительных цитокинов TNF α и IFN γ , а также лимфоцитарной инфильтрации.

По данным таблицы 3, Fc-фрагменты нормального IgG лишь частично подавляют процесс, вызванный СГА генотипа *emm12*. Показатель повреждения клубочков сохранялся на уровне 37%, в то время как область поражения каналцев уменьшилась в 3,5–4 раза, с 110–116 малых квадратов сетки до 29–31. Значительно более чем в 4 раза подавлялся такой признак воспаления, как лимфоцитарная инфильтрация, а также отложение C3 компонента комплемента и продукция TNF α и IFN γ .

Таблица 2. Данные по подавлению PSGN, вызванного штаммом *S. pyogenes* генотипа *emm1*, Fc-фрагментами нормального IgGTable 2. Morphometric data on PSGN caused by IgGFc-binding strain *S. pyogenes* of *emm1* genotype and its inhibition by Fc-fragments of normal IgG

Штамм генотипа Strain of genotype	Корковый слой Cortex				Мозговой слой Medulla		Депозиция и продукция Deposition and expression		
	Число гломерул Number of glomeruli		Иммунное воспаление Immune inflammation		Иммунное воспаление Immune inflammation		IgG	C3	TNF α IFN γ
	в норме normal	дефектных destructive	в зоне ПК* in the area of PT*	зона ЛИ** the area of LI**	в зоне ДК*** in the area of DT***	зона ЛИ** the area of LI**			
<i>emm1</i> + IgG Fc	Практически полностью отсутствуют признаки воспаления и поражения клубочков и каналцев There are almost no signs of inflammation and lesions of the glomeruli and tubules								
<i>emm1</i> (контроль) control	5,2±0,6	4,0±0,6	60,2±31	46,3±13	60,8±14,6	74,3±9,8	+	+	+

Примечания. ПК* — проксимальный каналец; ЛИ** — лимфоцитарная инфильтрация; ДК*** — дистальный каналец. (+) — выраженная депозиция иммуноглобулина G, комплемента и продукция интерлейкинов

Notes. PT* — the proximal tubule; LI** — the lymphocytic infiltration; DT*** — the distal tubule. (+) — strong disposition of IgG, complement and interleukin expression)

По данным таблицы 4 некоторое, крайне незначительное, ослабление воспаления наблюдалось и в опытах по испытанию активности СГА генотипа *emm60* в присутствии Fc-фрагментов IgG; оно касалось только степени выраженности лимфоцитарной инфильтрации в зонах канальцев и продукции IFN γ .

Обсуждение

Если исходить из известных представлений об иммунокомплексной природе постстрептококковых поражений клубочкового аппарата почек, то логично допустить участие в формировании этих комплексов феномена Fc-связывания иммуноглобулинов Fc-рецепторными белками возбудителя и, в частности, их взаимодействия с мономерным IgG, с комплексами типа IgG–anti-IgG и с IgA. Во всех этих случаях в ответ на аутоантигенные превращения указанных иммуноглобулинов предполагается накопление в крови животного специфических антител к этим иммуноглобулинам. Образующиеся при этом комплексы откладываются в почечных клубочках посредством тканевых FcR, специфически отличающих один тип иммунных комплексов от другого [1, 6, 10, 15, 29]. Отложение комплексов в различных структурах ткани вызывает воспалительную реакцию с выбросом различных провоспалительных цитокинов, мобилизацию лимфоцитов/лейкоцитов и деструкцию подлежащей ткани. Характер этих изменений определяет патогенез конкретного проявления гломерулонефрита [6, 9, 23]. Именно эти различия и определили результаты настоящего исследования.

Согласно литературным данным и более ранним нашим [4, 8, 9] исследованиям, постстрептококковый гломерулонефрит известен как мембранозно-пролиферативный процесс, первично проявляющийся отложением IgG или IgG–anti-IgG иммунных комплексов в базальной мембране клубочков [4, 9, 21], между тем как для IgA-нефропатии свойственны отложения IgA или его полимеров в мезангиальных клетках клубочков, ведущие к мезангиально-пролиферативному гломерулонефриту [3, 18, 19, 20, 24]. За этими проявлениями фактически должно стоять реальное распределение соответствующих Fc-рецепторов в структурах гломерул. По-видимому, IgG Fc-рецепторы находятся преимущественно в капсуле [1, 9], а IgA Fc-рецепторы — в мезангиуме клубочков [22]. Очевидно, что тканевые FcR участвуют в утилизации «старееющих» молекул иммуноглобулина, но труднее справляются с их комплексными образованиями и связавшимся с ними С3 компонентом комплемента. Формирующаяся при этом реакция воспаления в ткани способствует ее повреждению. Очевидно, что с ростом образования комплексов возрастает и риск развития патологии. Возможно, именно поэтому IgG Fc-позитивные штаммы генотипа *emm12*, изначально обладающие способностью связывать иммунные комплексы, но не мономерный IgG, обладают и большей нефритогенностью в сравнении со штаммами других генотипов, связывающих мономерный IgG [2, 9, 10].

Приведенные рассуждения позволяют интерпретировать полученные в настоящей работе данные. Образующиеся при испытании

Таблица 3. Морфометрические показатели по подавлению процесса, вызванного штаммом *S. pyogenes* генотипа *emm12*, Fc-связывающим иммунные комплексы

Table 3. Morphometric data on the inhibition of pathological changes caused by the immune complexes binding *S. pyogenes* strain *emm12* genotype

Штамм генотипа Strain of genotype	Корковый слой Cortex				Мозговой слой Medulla		Депозиция и продукция Deposition and expression		
	Число гломерул Number of glomeruli		Иммунное воспаление Immune inflammation		Иммунное воспаление Immune inflammation				
	в норме normal	дефектных destructive	в зоне ПК* in the area of PT*	зона ЛИ** the area of LI**	в зоне ДК*** in the area of DT***	зона ЛИ** the area of LI**	IgG	С3	TNF α IFN γ
<i>emm12</i> + IgG Fc	6,33	3,75	29,3	15,7	31,0	6,3	±	–	–
<i>emm12</i> (контроль) control	5,0±0,8	4,9±0,4	116±36	68,5±31	110±41,5	94,3±30	+	±	+

Примечания. ПК* — проксимальный каналец; ЛИ** — лимфоцитарная инфильтрация; ДК*** — дистальный каналец. Степень выраженности депозиции IgG, С3 комплемента и продукции интерлейкинов: (+) — выраженная, (+/-) — слабо выраженная, (–) — отсутствует.

Notes. PT* — the proximal tubule; LI** — the lymphocytic infiltration; DT*** — the distal tubule. The level of deposition of IgG, C3 complement and interleukin expression: (+) — pronounced, (+/-) — weakly expressed, (–) — absent.

Таблица 4. Морфометрические показатели по подавлению процесса, вызванного штаммом *S. pyogenes* генотипа *emm60*, Fc-связывающим IgA

Table 4. Morphometric data on the inhibition of pathological changes caused by the IgA binding *S. pyogenes* strain of *emm60* genotype

Штамм генотипа Strain of genotype	Корковый слой Cortex				Мозговой слой Medulla		Депозиция и продукция Deposition and expression		
	Число гломерул Number of glomeruli		Иммунное воспаление Immune inflammation		Иммунное воспаление Immune inflammation		IgA	C3	IFN γ
	в норме normal	дефектных destructive	в зоне ПК* in the area of PT*	зона ЛИ** the area of LI**	в зоне ДК*** in the area of DT***	зона ЛИ** the area of LI**			
<i>emm60</i> + IgG Fc	6,4 \pm 0,8	3,7 \pm 0,8	43,0 \pm 34,3	9,3 \pm 4,1	47,5 \pm 31,1	16,0 \pm 28	+	+	-
<i>emm60</i> (контроль) control	5,8 \pm 0,8	4,3 \pm 0,9	61,2 \pm 19	51,3 \pm 13	62,8 \pm 14,6	69,3 \pm 7,8	+	\pm	+

Примечания. *ПК — проксимальный каналец; **ЛИ — лимфоцитарная инфильтрация; ***ДК — дистальный каналец. Степень выраженности депозиции IgG, C3 комплемента и продукции интерлейкинов: (+) — выраженная, (+/-) — слабо выраженная, (-) — отсутствует.

Notes. PT* — the proximal tubule; LI** — the lymphocytic infiltration; DT*** — the distal tubule. The level of deposition of IgG, C3 complement and interleukin expression: (+) — pronounced, (+/-) — weakly expressed, (-) — absent).

штаммов генотипов *emm1* и *emm12* иммунные комплексы ведут к их отложению в капсуле клубочков за счет их связывания с тканевыми FcR в структурах нефрона. Вводимые на начальных этапах процесса IgG Fc-фрагменты, а также иммунные комплексы будут конкурировать друг с другом за связь с тканевыми FcR, что может привести к подавлению воспаления, и к последующему повреждению ткани. По-видимому, именно это и произошло в опытах, результаты которых приведены в таблицах 2 и 3. При этом, гломерулонефрит, индуцированный СГА штаммом генотипа *emm12*, как более выраженный, значительно слабее поддавался блокирующему эффекту Fc-фрагментов IgG.

Так как бактериальные и тканевые IgA Fc-рецепторы значительно отличаются от IgG Fc-рецепторов естественно, что Fc-фрагменты IgG не способны были достаточно полно конкурировать с IgA за связь с IgA Fc-рецепторами. В силу этого Fc-фрагменты IgG не подавляли нефритогенность штамма генотипа *emm60*.

В последние годы поиск иных путей терапевтического воздействия на процессы иммунокомплексной природы привел к пониманию роли N-

и O-гликозилирования IgG и IgA в их патогенезе [12, 28]. Это обстоятельство, наряду с обнаружением бактериальных энзимов, позволяет разрабатывать универсальный путь борьбы не только с гломерулонефритами, но и с другими иммунопатологическими состояниями [5, 12].

Заключение

Испытание на нефритогенность штаммов *Streptococcus pyogenes* генотипов *emm1*, *emm12* и *emm60*, различающихся по Fc взаимодействию с IgG, иммунными комплексами и IgA, обнаружило разные по характеру процессы в почечной ткани экспериментального животного. Соответственно, патологические процессы, развивающиеся в почечной ткани, по-разному реагировали на внутривенное введение препарата Fc-фрагментов IgG нормального иммуноглобулина: он полностью подавлял развитие процесса, индуцированного штаммом *emm1* (связывает нативный IgG), частично подавлял процесс, вызванный штаммом *emm12* (связывает только иммунные комплексы) и не влиял на процесс, вызванный штаммом *emm60* (связывает IgA).

Список литературы/References

- Бурова Л.А., Гаврилова Е.А., Пигаревский П.В., Селиверстова В.Г., Нагорнев В.А., Шален К., Тотолян Артем А. Способность стрептококков группы А типа M12 связывать иммунные комплексы и их роль в патогенезе постстрептококкового гломерулонефрита // Медицинская иммунология. 2006. Т. 8, № 5–6. С. 623–630. [Burova L.A., Gavrilova E.A., Pigarevskiy P.V., Seliverstova V.G., Nagornev V.A., Schalen K., Totolian Artem A. Capacity of group A (type M12) streptococci to bind immune complexes and their role in pathogenesis of poststreptococcal glomerulonephritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, vol. 8, no 5–6, pp. 623–630. doi: 10.15789/1563-0625-2006-5-6-623-630. (In Russ.)]
- Бурова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Кулешевич Е.В., Жарков Д.А., Шален К., Тотолян Артем А. Нефритогенная активность *Streptococcus pyogenes* генотипов *emm1* и *emm12*, различающихся по источнику выделения // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3. С. 233–242. [Burova L.A., Pigarevskiy P.V., Snegova V.A., Kuleshevich E.V., Zharkov D.A., Schalen C., Totolian Artem A. Nephritogenic activity of *Streptococcus pyogenes* *emm1* and *emm12* genotypes isolated from pa-

- tients and asymptomatic carriers. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no 3, pp. 233–242. doi: 10.15789/2220-7819-2015-3-233-242. (In Russ.)]
3. Булова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Дуплик Н.В., Шален К., Тотолян Артем А. Нефритогенность IgA-связывающих *Streptococcus pyogenes*. Моделирование IgA гломерулонефрита // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 3. С. 221–230. [Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Duplik N.V., Schalen K., Totolian Artem A. Nephritogenic activity of IgA-binding *Streptococcus pyogenes*. An experimental model of IgA glomerulonephritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no 3, pp. 221–230. (In Russ.)]
 4. Тотолян Артем А., Булова Л.А. Fc-рецепторные белки *Streptococcus pyogenes* и патогенез постинфекционных осложнений // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 3. С. 78–90 [Totolian Artem A., Burova L.A. Fc-receptor proteins of *Streptococcus pyogenes* and pathogenesis of post-infection complications. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no 3, pp. 78–90. (In Russ.)]
 5. Allhorn M., Collin M. Sugar-free antibodies — the bacterial solution to autoimmunity. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2009, vol. 1173, pp. 664–669. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04739.x
 6. Akilesh Sh., Huber T.B., Wu H., Wang G., Hartleben B., Kopp J.B., Miner J.J.H., Roopenian D.C., Unanue E.R., Shaw A.S. Podocytes use fcR to clear IgG from the glomerular basement membrane. *PNAS*, 2008, vol. 105, no. 3, pp. 967–972. doi: 10.1073/pnas.0711515105
 7. Anthony R.M., Wermeling F., Ravetch J.V. Novel roles for IgG Fc glycan. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2012, vol. 1253, pp. 170–180. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06305.x170
 8. Barabas A.Z., Cole C.D., Lafreniere R., Weir D.M. Immunopathological events initiated and maintained by pathogenic IgG autoantibodies in an experimental autoimmune kidney disease. *Autoimmunity*, 2012, vol. 45, no. 7, pp. 495–509. doi: 10.3.109/089.934.2012.70281216
 9. Burova L.A., Nagornev V.A., Pigarevsky P.V., Gladilina M.M., Seliverstova V.G., Schalen C. Triggering of renal damage in the rabbit by IgG Fc-receptor-positive group A streptococci. *APMIS*, 1998, vol. 106, pp. 277–287.
 10. Burova L., Pigarevsky P., Duplik N., Snegova V., Suvorov A., Schalen C., Totolian A. Immune complex binding *Streptococcus pyogenes* type M12/emm12 in experimental glomerulonephritis. *J. Med. Microbiol.*, 2013, vol. 62, pt 9, pp. 1272–1280. doi: 10.1099/jmm.0.059196-0
 11. Collan Y. Morphometry in pathology: another look at diagnostic histopathology. *Pathol. Res. Pract.*, 1984, no. 1, pp. 189–192.
 12. Collin M., Shannon O., Björck L. IgG glycan hydrolysis by a bacterial enzyme as a therapy against autoimmune conditions. *Nat. Acad. Sci. USA*, 2008, vol. 105, no. 11, pp. 4265–4270. doi: 10.1073/pnas.0711271105
 13. Danilova T.A. Fc receptors of endothelial cells of cardiac valves: comparison of IgG Fc binding activity of these receptors and of Fc receptors of group A streptococci. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 2003, no. 2, pp. 46–51.
 14. Gomez-Guerrero C., Duque N., Casado M.T., Pastor C., Blanco J., Mampaso F., Vivanco F., Egidio J. Administration of IgG Fc-fragments prevents glomerular injury in experimental immune complex nephritis. *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, pp. 2092–2101. doi: 10.4049/jimmunol.164/4.2092
 15. Hayes J.M., Frostell H.A., Cosgrave E., Strume W., Potter O., Davey G., Karisson R., Anneren C., Rudd P. Fc gamma receptor glycosylation modulates the binding of IgG glycoforms: a requirement for stable antibody interactions. *J. Proteome Res.*, 2014, vol. 13, no. 12, pp. 5471–5485. doi: 10.1021/pr500414q
 16. Hayes J.M., Cosgrave E.F., Struwe W.B., Wormald M., Davey G.P., Jeffers R., Rudd P.M. Glycosylation and Fc receptors. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.*, 2014, vol. 382, pp. 165–199. doi: 10.1007/978-3-319-07911-08
 17. Haymann J.P., Delarue F., Baud L., Sraer J.D. Aggregated IgG bind to glomerular epithelial cells to stimulate urokinase release through an endocytosis independent process. *Nephron Exp. Nephrol.*, 2004, vol. 98, no. 1, pp. 13–21. doi: 10.1159/000079928
 18. Homma H., Tozawa K., Yasui T., Itoh Y., Hayashi Y., Kohri K. Abnormal glycosylation of serum IgG in patients with IgA nephropathy. *Clin. Exp. Nephrol.*, 2006, vol. 10, no. 3, pp. 180–185. doi: 10.1007/s10157-006-0422-y
 19. Monteiro R.C., Leroy V., Launay P., Moura I.C., Arcos-Fajardo M., Benhamou M., Haddad E. Pathogenesis of Berger's disease: recent advances on the involvement of immunoglobulin A and their receptors. *Med. Sci. (Paris)*, 2003, vol. 19, no. 12, pp. 1233–1241. doi: 10.1051/medsci/200319121233
 20. Monteiro R.C., Moura I.C., Launay P., Tsuge T., Haddad E., Benhamou M., Cooper M.D., Arcos-Fajardo M. Pathogenic significance of IgA receptor interactions in IgA nephropathy. *Trends Mol. Med.*, 2002, vol. 8, no. 10, pp. 464–468.
 21. Nordenfelt P., Waldemarson S., Linder A., Mörgelin M., Karlsson C., Malmström J., Björck L. Antibody orientation at bacterial surfaces is related to invasive infection. *Exp. Med.*, 2012, vol. 209, no. 13, pp. 2367–2381. doi: 10.1084/jem.20120325
 22. Okazaki K., Suzuki Y., Otsuji M., Suzuki H., Kihara M., Kajiyama T., Hashimoto A., Nishimura H., Brown R., Hall S., Novak J., Izui S., Hirose S., Tomino Y. Development of a model of early-onset IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2012, vol. 23, no. 8, pp. 1364–1374. doi: 10.1681/ASN.2011121160
 23. Qu Z., Cui Z., Liu G., Zhao M.H. The distribution of IgG subclass deposition on renal tissues from patients with anti-glomerular basement membrane disease. *BMC Immunol.*, 2013, vol. 14, pp. 19–26. doi: 10.1186/1471-2172-14-19
 24. Schmitt R., Ståhl A.L., Olin A.I., Kristoffersson A.C., Rebetz J., Novak J., Lindahl G., Karpman D. The combined role of galactose-deficient IgA1 and streptococcal IgA-binding M Protein in inducing IL-6 and C3 secretion from human mesangial cells: implications for IgA nephropathy. *J. Immunol.*, 2014, vol. 93, no. 1, pp. 317–326. doi: 10.4049/jimmunol.1302249
 25. Sibéris S., Dutertre C.A., Boix C., Bonnin E., Ménez R., Stura E., Jorieux S., Fridman W.H., Teillaud J.L. Molecular aspects of human Fc gamma R interactions with IgG: functional and therapeutic consequences. *Immunol Lett.*, 2006, vol. 106, no. 2, pp. 111–118. doi: 10.1016/j.imlet.2006.05.009
 26. Söderberg J.J., Pawel-Rammingen U. The streptococcal protease IdeS modulates bacterial IgG Fc binding and generates 1/2Fc fragments with the ability to prime polymorphonuclear leucocytes. *Mol. Immunol.*, 2008, vol. 45, no. 12, pp. 3347–3353. doi: 10.1016/j.molimm.2008.04.013
 27. Su Y.F., Chuang W.J., Wang S.M., Chen W.Y., Chiang-Ni C., Lin Y.S., Wu J.J., Liu C.C. The deficient cleavage of M protein-bound IgG by IdeS: insight into the escape of *Streptococcus pyogenes* from antibody-mediated immunity. *Mol. Immunol.*, 2011, vol. 49, no. 1–2, pp. 134–142. doi: 10.1016/j.molimm.2011.08.002

28. Van Timmeren M.M., van der Veen B.S., Stegeman C.A., Petersen A.H., Hellmark T., Collin M., Heeringa P. IgG glycan hydrolysis attenuates ANCA-mediated glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2010, vol. 21, no. 7, pp. 1103–1114. doi: 10.1681/ASN.2009090984
29. Xue J., Zhu L.P., Wei Q. IgG-Fc N-glycosylation at Asn297 and IgA O-glycosylation in the hinge region in health and disease. *Glycoconj. J.*, 2013, vol. 30, no. 8, pp. 735–745. doi: 10.1007/s10719-013-9481-y
30. Yang R., Otten M.A., Hellmark T., Collin M., Björck L., Zhao M.H., Daha M.R., Segelmark M. Successful treatment of experimental glomerulonephritis with IdeS and EndoS, IgG-degrading streptococcal enzymes. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2010, vol. 25, no. 8, pp. 2479–2786. doi: 10.1093/ndt/gfq115

Авторы:

Бурова Л.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Пигаревский П.В., д.б.н., руководитель отдела общей морфологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Снегова В.А., научный сотрудник отдела общей морфологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Тотolian Артем А., д.м.н., академик РАН, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Burova L.A., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Pigarevsky P.V., PhD, MD (Biology), Head of the Department of General Morphology Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Snegova V.A., Researcher, Department of General Morphology Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Totolian Artem A., PhD, MD (Medicine), RAS Full Member, Head Researcher, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 18.06.2019
Отправлена на доработку 02.03.2020
Принята к печати 14.03.2020

Received 18.06.2019
Revision received 02.03.2020
Accepted 14.03.2020

Иллюстрации к статье «Влияние Fc-фрагментов нормального иммуноглобулина G на развитие гломерулонефрита, индуцированного штаммами *Streptococcus pyogenes*, связывающими разные классы иммуноглобулинов» (авторы: Бурова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Тотолян Артем А.) (с. 55–63)

Illustrations for the article “Impact of IgG Fc fragments on experimental glomerulonephritis induced by *Streptococcus pyogenes* strain binding various immunoglobulin classes” (authors: Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Totolian Artem A.) (pp. 55–63)

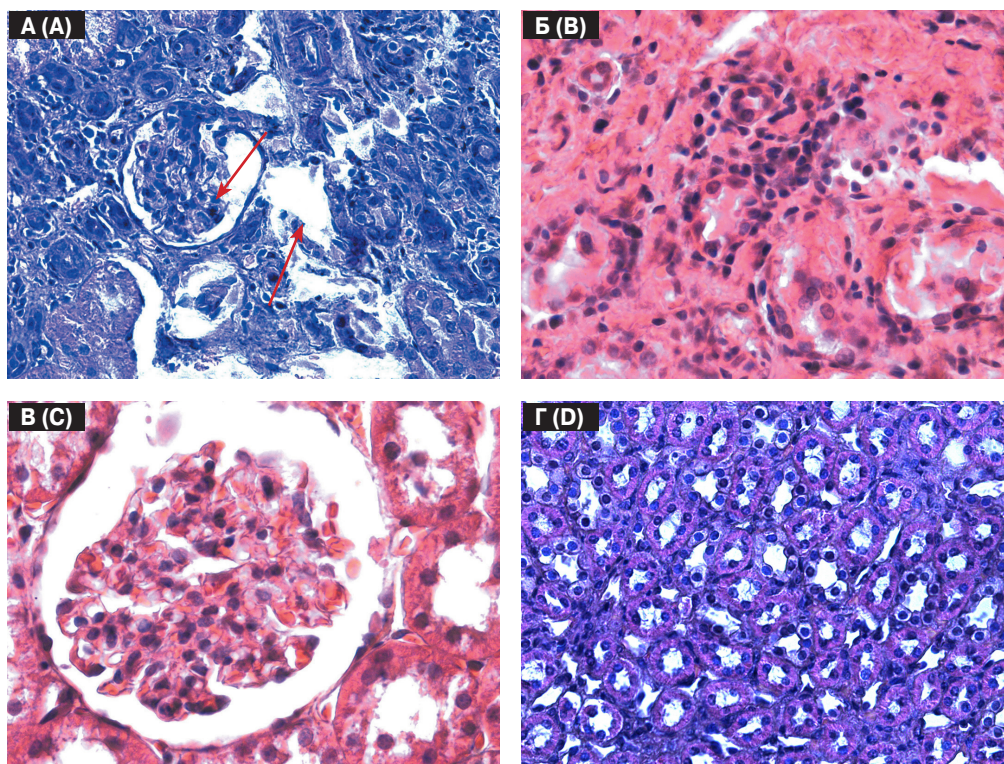


Рисунок. Морфологические изменения в корковом и мозговом слоях почки кролика, индуцированные *Streptococcus pyogenes* генотипа *emm1*

Figure. Morphological changes in cortex and medullar substances of the rabbit renal tissue induced by *Streptococcus pyogenes* of *emm1* genotype

A — полости капсул почечных клубочков резко расширены, в капиллярных петлях клубочков наблюдаются процессы некроза и атрофии, в стенке проксимальных канальцев коркового вещества выявляется десквамация эпителиальных клеток (стрелки); Б — выраженный отек и утолщение мембран стенки дистальных канальцев мозгового слоя с одновременным разрастанием рыхлой волокнистой интерстициальной ткани стромы; В, Г — отсутствие патоморфологических изменений в коре и мозговом веществе почки кролика, инъецированного Fc-фрагментом нормального IgG; А–Г — окраска гематоксилин-эозином, $\times 750$.

A — the capsular cavities of the glomeruli strongly expanded, in the capillary loops of the glomeruli the necrosis and atrophy are observed, in the wall of the proximal tubules of the cortex desquamation of epithelial cells is revealed (shown by arrows); B — swelling and thickening of the membranes of the wall of distal tubules in the medulla with the simultaneous proliferation of the fibrous interstitial tissue; C, D — absence of pathological changes in the cortex and the medulla of the kidney obtained from rabbits treated with Fc fragments of IgG; A–D — staining with hematoxylin-eosin. Magnification $\times 750$.