

НЕФРИТОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ГЕНОТИПОВ *emm1* и *emm12*, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ИСТОЧНИКУ ВЫДЕЛЕНИЯ

Л.А. Бурова¹, П.В. Пигаревский¹, В.А. Снегова¹, Е.В. Кулешевич¹, Д.А. Жарков²,
К. Шален³, Артем А. Тотолян¹

¹ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

³Лундский Университет, Лунд, Швеция

Резюме. В статье рассматривается нефритогенная активность штаммов *Streptococcus pyogenes* генотипов *emm1* и *emm12*, различающихся по Fc-рецепции нативного IgG и иммунных комплексов (IC) и выделенных от детей, больных скарлатиной и здоровых носителей. Все штаммы типа *emm1* связывали нативный IgG, между тем как IC взаимодействовали только со штаммами от больных и не связывались штаммами от носителей. Наоборот, все штаммы типа *emm12* оказались негативными в отношении нативного IgG, а IC связывались исключительно штаммами от больных. Ни один из испытанных штаммов не связывал IgG3. Связывание обеих форм IgG сопровождалось накоплением анти-IgG антител, формированием IC, «серповидной» депозицией IgG в почечной ткани, отложением C3-комплемента, продукцией провоспалительного цитокина TNF α , а также аккумуляцией лимфоцитов в корковом и мозговом слоях ткани. Перечисленные признаки являются по существу проявлениями развивающегося иммунного воспаления, ведущего к моделированию мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита (PSGN). По имеющимся данным, в его основе лежат: связывание иммунных комплексов тканевыми Fc γ R, активация комплемента, провоспалительная активность цитокинов и лимфоцитарная инфильтрация ткани. По данным морфометрической оценки, нефритогенная активность штаммов генотипа *emm12* превышала таковую штаммов генотипа *emm1*. При испытании трех IC-связывающих штаммов *emm12* на шести кроликах, выраженный PSGN имел место у 5-ти, а abortивный процесс — лишь у одного животного. В случае же испытания пяти IgG-связывающих штаммов типа *emm1* на десяти кроликах выраженный PSGN наблюдался всего у 3-х, abortивный — у 5-ти и негативный результат — у 2-х животных. Изменения не происходили при испытании «носительских» штаммов обоих генотипов, неспособных связывать IC, что, согласно литературе, может быть связано с мутацией в гене Mga-регулятора и, соответственно, нарушениями в синтезе M-белков. Поэтому выделение IC-связывающих штаммов типа *emm12* при острой стрептококковой инфекции должно рассматриваться в качестве высокого фактора риска развития постинфекционного осложнения — PSGN. Используемая в работе модель PSGN позволяет вскрыть основные этапы и черты его патогенеза.

Ключевые слова: постинфекционный гломерулонефрит, *Streptococcus pyogenes*, Fc-рецепция, IgG, иммунные комплексы.

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: totolyan@hotmail.com

Contacts:

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

Библиографическое описание:

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. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-233-242

Citation:

Burova L.A., Pigarevsky 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 patients and
asymptomatic carriers // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 233–242.
doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-233-242

Исследования были поддержаны грантами РФФИ: 07-04-00472 и 14-04-00390.

NEPHRITOGENIC ACTIVITY OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES* *emm1* AND *emm12* GENOTYPES ISOLATED FROM PATIENTS AND ASYMPTOMATIC CARRIERS

Burova L.A.^a, Pigarevsky P.V.^a, Snegova V.A.^a, Kuleshevich E.V.^a, Zharkov D.A.^b, Schalen C.^c, Totolian Artem A.^a

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

^b Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

^c Lund University, Lund, Sweden

Abstract. In this paper the nephritogenic activity of *Streptococcus pyogenes* genotype *emm1* and *emm12* clinical isolates from scarlet fever patients and healthy children was considered. As earlier established, strains of these types differ in Fc-binding profile, interacting with native IgG and immune complexes (IC), respectively. As expected, all the type *emm1* strains bound native IgG; besides, ICs interacted only with strains from patients but not with those from carriers. In contrast, all type *emm12* strains appeared to be negative for native IgG, whereas ICs were bound by strains from patients exclusively. None of the tested strains bound IgG3. By immunization of rabbits, binding of native IgG as well as ICs was associated with increasing of anti-IgG antibodies titer, formation of ICs, «crescent» deposition of IgG and C3-complement, local production of the proinflammatory cytokine TNF α , and also with accumulation of lymphocytes in kidney tissue. These signs indicated immune inflammation, leading to experimental membrane-proliferative glomerulonephritis (PSGN). It is known that PSGN development depends on IC-binding by tissue Fc γ R, on complement activation as well as on tissue infiltration by macrophages/monocytes. According to the data of morphometric evaluation the nephritogenic activity of the type *emm12* strains exceeded those of type *emm1*. On testing of three IC-binding *emm12* strains in six rabbits, typical PSGN developed in 5 of them and an abortive process in 1 animal. In case of five IgG-binding type *emm1* strains, out of ten rabbits full-blown PSGN was observed only in 3 of them, but abortive changes in 5 and negative result in 2 animals. No pathologic changes were elicited by the «carrier» strains of either genotype; the inability of these to bind ICs, according to literature data, could be explained by mutation in the Mga-regulator gene thereby impeding M-proteins synthesis. We conclude that isolation of type *emm12* IC-binding strains at acute streptococcal infection should be considered a high risk-factor for postinfectious sequelae development. The rabbit model of PSGN used in this research thus allowed to reveal some main stages and features of its pathogenesis.

Key words: postinfectious glomerulonephritis, *Streptococcus pyogenes*, Fc-reception, IgG, immune complexes.

Введение

Способность патогенных *Streptococcus pyogenes* (стрептококк группы А или СГА) осложнять острую форму инфекции развитием постинфекционного гломерулонефрита (PSGN) описана давно. Настоящая работа является звеном в масштабных исследованиях по взаимосвязи между нефритогенностью СГА и их способностью связывать иммуноглобулин класса G (IgG) через его Fc-фрагмент. Ранее в них было показано, что штаммы СГА некоторых М-серотипов или *emm*-генотипов, а также их Fc-связывающие белки (Fc-рецепторы), взаимодействуют с IgG крови, вызывая в эксперименте на животных каскад взаимообусловленных реакций, приводящих к иммунному воспалению в ткани почек. Они проявляются в синтезе анти-IgG антител, в формировании иммунных комплексов (IC), связывающих C3-компонент комплемента, их депозиции в почечных гломерулах, а также в продукции провоспалительных цитокинов и лимфоцитарной инфильтрации ткани. Иммунное воспаление сопровождается образованием очагов дегенерации и деструкции ткани, что в результате приводит к развитию мембранозно-пролиферативного PSGN [1, 2].

В современной научной литературе нередко приходится сталкиваться с разделением СГА на «нефритогенные» и «ревматогенные» М-серотипы в зависимости от источника и частоты их выделения при той или иной форме инфекционной патологии. Это разграничение весьма условно, так как оно не учитывает наличия у штаммов факторов патогенетической направленности.

Совокупность ранее полученных сведений позволила сформулировать задачу настоящей работы. Следовало оценить нефритогенность разных *emm*-генотипов СГА и выяснить, каким образом различия в их Fc-рецепторной активности проявляются в возможности моделировать PSGN у лабораторных животных. Для этого из коллекции штаммов, выделенных за 2006–2009 гг. от больных скарлатиной детей и от здоровых детей-носителей, отобрали эпидемиологически независимые штаммы типов *emm1* и *emm12*, обозначив их как «скарлатинозные» и «носительские». Указанные *emm*-генотипы чаще относят к «ревматогенным» (тип *emm1*) и к «нефритогенным» (тип *emm12*). Кроме того, они различаются по характеру Fc-связывания как нативного IgG, так и IgG в составе IC.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использованы референс-штаммы СГА: М1/40/58 и М12/1800 (позитивный контроль на нефритогенность), а также Т27 (отрицательный контроль на нефритогенность); все они получены из референс-лаборатории ВОЗ, Прага, Чехия. Для испытания отобрали по три эпидемиологически независимых штамма генотипов *emm1* (346, 154, 67) и *emm12* (94, 113, 118) от больных скарлатиной, а также по два штамма от здоровых носителей тех же *emm*-типов (соответственно, 17 и 124; 139 и 171).

Связывание нативного IgG, IgG3 и иммунных комплексов ПАП (пероксидаза хрена × IgG из антипероксидазной иммунной сыворотки) и иммунных комплексов ТАТ (столбнячный анатоксин × IgG из антитоксической иммунной сыворотки). Для выявления рецепторной активности СГА в dot-blot тесте использовали супернатанты культур, трижды (по 30 с) дезинтегрированных при 22 кГц и 0,6–0,8 мА в УЗ-дезинтеграторе MSE (UK). Супернатанты стерилизовали через миллиметровые фильтры с размером пор 0,45 микрон. ПАП комплексы готовили, смешивая эквивалентные (по молекулярной массе) количества IgG с антипероксидазной активностью (4 мг/мл) и пероксидазы (1 мг/мл) в соотношении Ат-Аг 2:3. Смесь инкубировали при 4°C в течение 18–20 ч. ТАТ иммунные комплексы, содержащие столбнячный анатоксин (SBL Vaccine) и антистолбнячный IgG (Tetagam, Behringwerke), маркировали 125I, смешивали в соотношении Ат-Аг 1:1. Связывание ТАТ комплексов определяли радиоиммунологически (RIA) по ранее описанной методике [4].

Dot-blot-тест ставили на нитроцеллюлозной мембране, используя двукратные разведения супернатанта УЗ-дезинтеграта микробных клеток. Блокатором служило обезжиренное молоко (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad), в качестве проявляющего субстрата использовали ТМВ (3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine, Sigma). IgG человека (Sigma) и IgG3 (предоставлен д-ром А. Grubb, Отдел биохимии Лундского Университета, Швеция) конъюгировали с пероксидазой из корня хрена (Sigma) перйодатным методом.

Экспериментальный гломерулонефрит. Моделирование постинфекционного гломерулонефрита выполняли на основании разрешения на работу с животными (Animal Welfare Assurance#A5243-01). Нефритогенность СГА штаммов тестировали на кроличьей модели PSGN, описанной нами ранее [4]. Кратко, ее схема заключается в следующем: микробные клетки, выращенные в бульоне Todd-Hewitt, убивали нагреванием при 60°C в течение 1,5 ч, обрабатывали раствором KSCN для удаления

связанных иммуноглобулинов и 6 раз отмывали в PBS [2]. Кроликам взвесив бактерий (10⁹/мл КФЕ) вводили внутривенно 3 раза в неделю в течение 6-ти недель. Каждый тестируемый штамм испытывали минимум на двух кроликах. Через неделю после последней инъекции, почки животных подвергали иммуноморфологическому и гистологическому исследованию.

Определение анти-IgG антител в сыворотках кроликов. Титры анти-IgG определяли в реакции непрямой гемагглютинации, описанной ранее [2]. **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 козы антисыворотки против кроличьего IgG. В качестве вторых антител применяли кроличьи антикозьиные антитела, меченные пероксидазой корня хрена (Southern Biotechnology Associates, США).

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

Продукцию цитокина TNFα выявляли козьей антисывороткой против кроличьего TNFα (AMS Biotechnology, США) с последующей обработкой срезов кроличьими антикозьиными антителами, мечеными пероксидазой.

Первоначально микроскопию тканевых образцов после их окрашивания гематоксилин-эозином производили при малых и средних увеличениях (x100–x600) для оценки тканевых изменений в различных полях зрения. Затем иммуноокрашенные образцы исследовали при большем увеличении (x900–x1100) с целью выявления депозиции IgG и С3, а также экспрессии TNFα.

Морфометрическая оценка изменений в почечной ткани производилась следующим образом: в корковом веществе в 10-ти произвольно выбранных полях зрения при увеличении x700 отдельно подсчитывали среднее количество нормальных и поврежденных гломерул. Для определения области поврежденных проксимальных канальцев в корковом веществе и дистальных канальцев в мозговом слое использовали стандартную морфометрическую сетку (квадрат, содержащий 256 малых квадратов), накладываемую на образец ткани. Пропорция малых квадратов с деструктивно-дегенеративными изменениями в одном поле зрения

оценивалась как степень тканевой альтерации. Подобный подход применяли и для оценки клеточной инфильтрации как в корковом, так и в мозговом слоях почек. Полученные результаты подвергали статистической обработке [5].

Результаты и обсуждение

Способность отобранных штаммов генотипов *emm1* и *emm12* связывать нативный IgG или IC, а также вызывать иммунное воспаление и PSGN, изучалась в двух сериях экспериментов. В первой тестировали активность штаммов *emm1*, а во второй — *emm12*.

Изучение штаммов *emm1*

Взаимодействие СГА с различными формами IgG проверяли в dot-blot тесте, результаты которого приведены в таблице 1. Все штаммы типа *emm1* связывали нативный IgG. Наиболее активным был штамм M1/40/58, являющийся положительным контролем на нефритогенность. Активность как «скарлатинозных», так и «носительских» штаммов варьировала в весьма узких пределах разведений супернатанта УЗ-дезинтеграта — большая была у штамма *emm1/346*, а меньшая — у штамма *emm1/17*. Способность связывать IC была либо такой же, либо на «шаг» менее выраженной. Исключение составляли штаммы *emm1/17* и *emm1/124*, выделенные от носителей. Они оказались полностью негативным по рецепции IC, хотя и связывали нативный IgG.

Ни один из использованных в данной работе штаммов генотипа *emm1* не связывал IgG3 при испытании в dot-blot тесте. То, что штаммы *emm1* связывают нативный IgG и не связывают подкласс IgG3, по-видимому, свидетельствуют в пользу предположения о том, что в связывании нативного IgG преимущественно участвуют IgG подклассов 1, 2 и 4. При этом рецептором для них скорее всего должен слу-

жить Mрр-белок, а не *Emm*-белок, поскольку последний обычно связывает все подклассы IgG, включая IgG3. Ранее было показано, что Mрр-белок является более слабым индуктором экспериментального PSGN в сравнении с *Emm*-белком [3].

При изучении нефритогенности каждого штамма типа *emm1* на двух кроликах, обоих животных тестировали на появление анти-IgG антител в крови, а также на депозицию IgG и С3-комплемента в почках (табл. 1).

Патологические изменения в ткани коркового и мозгового слоев почек оценивали морфометрически (табл. 2).

Анти-IgG антитела в разных титрах обнаруживались в сыворотках кроликов при введения им как «скарлатинозных», так и «носительских» IgG связывающих штаммов типа *emm1*, независимо от их способности связывать IC. При инъекции «скарлатинозных» штаммов (*emm1/346* и *emm1/154*) титры анти-IgG антител несколько превышали их уровень в случае введения штаммов того же генотипа, но выделенных от носителей. Депозиция С3 чаще обнаруживалась при титрах анти-IgG антител 1:80 и при испытании контрольного штамма M1/40/58. Мы допускаем, что разные кролики по-разному реагировали на одни и те же штаммы. Так, штаммы *emm1/346* и *emm1/154* от больных, как и *emm1/17* от носителя, вызывали выраженный ответ у одного из каждого двух подопытных кроликов. На другие штаммы (*emm1/67* от больного и *emm1/124* от носителя) реакция была слабой либо отсутствовала. Данное допущение подтвердилось при морфометрическом анализе гистологического материала (табл. 2). Индукция PSGN имела место при испытании штаммов, в случае которых наблюдалась депозиция IgG и С3-комплемента.

По-видимому, каждый из изучаемых штаммов типа *emm1* в опытах на кроликах по-разному

ТАБЛИЦА 1. Fc-РЕЦЕПТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ СГА ГЕНОТИПА *emm1* ПО СПОСОБНОСТИ СВЯЗЫВАТЬ НАТИВНЫЙ IgG И ИММУННЫЕ КОМПЛЕКСЫ, ИНДУЦИРОВАТЬ АНТИ-IgG АНТИТЕЛА И ВЫЗЫВАТЬ ДЕПОЗИЦИЮ IgG И С3

Штаммы		Связывание нативного IgG	Связывание IC (ПАП)*	Титры анти-IgG антител	Депозиция IgG и С3 в гломерулах почки
		в dot-blot тесте в разведениях надосадков УЗ-дезинтегратов микробных культур			
От больных скарлатиной	<i>emm1/346</i>	1:16	1:8	1:40–1:80	+
	<i>emm1/154</i>	1:4	1:4	1:40–1:80	+
	<i>emm1/67</i>	1:4	1:4	1:10–1:20	–
От носителей	<i>emm1/17</i>	1:2	–	1:10–1:20	+
	<i>emm1/124</i>	1:8	–	1:20–1:40	–
Контрольные штаммы	M1/40/58	1:16	1:16	1:160	+
	T27	–	–	< 1:10	–

Примечание. *ПАП — пероксидаза × антипероксидаза.

ТАБЛИЦА 2. МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НЕФРИТОГЕННОСТИ «СКАРЛАТИНОЗНЫХ» И «НОСИТЕЛЬСКИХ» ШТАММОВ СГА ГЕНОТИПА *emm1*

Источник выделения штамма	Результат и число кроликов	Титры анти-IgG антител	Корковый слой				Мозговой слой	
			Количество гломерул		Иммунное воспаление		Иммунное воспаление	
			в норме	с деструкцией	в зоне ПК*	зона ЛИ*	в зоне ДК*	зона ЛИ*
Больные скарлатиной	PSGN — 2	1:80	7,5	2,5	42,5	45,5	62,0	80,0
	Абортивный процесс — 3	1:20–1:40	7,3	2,6	4,6	7,6	0,0	0,0
	Негативный результат — 1	1:10–1:20	9,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Носители	PSGN — 1	1:40	5,0	5,0	43,0	48,0	111,0	65,0
	Абортивный процесс — 2	1:20	7,5	2,5	4,0	0,0	19,0	0,0
	Негативный результат — 1	1:10	9,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
(+) контроль	PSGN	1:160	3,0	7,0	95,0	103,0	110,0	138,0
(-) контроль	Негативный результат	< 1:10	9,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Примечание. *ПК — проксимальные каналцы; ДК — дистальные каналцы; ЛИ — лимфоцитарная инфильтрация.

проявляет нефритогенную активность — от негативного до выраженного результата. Поэтому вполне реален и абортивный процесс, который определяется реактивностью организма. В частности, низкий титр анти-IgG антител в случае штаммов *emm1/67* и *emm1/124*, по-видимому, должен указывать на недостаточный уровень образования IC, что согласуется с отсутствием депозиции C3-комплемента и с формированием абортивного или отрицательного результата по причине слабой выраженности иммунного воспаления.

Еще раз следует обратить внимание на штаммы *emm1/17* и *emm1/124* от носителей, которые, вне связи со взаимодействием с иммунными комплексами, были способны в разной степени проявлять нефритогенность, по-видимому, в силу сохранения рецепторной активности в отношении нативного IgG.

Данные таблицы 2 вполне согласуются с изложенным и указывают на то, что при испытании трех «скарлатинозных» штаммов на 6 кроликах в двух случаях возникал выраженный процесс, в трех — абортивный процесс и в одном — негативный результат. Что касается двух «носительских» штаммов, то при их испытании на 4 кроликах наблюдались, соответственно, один выраженный, два абортивных и один негативный результат. Эти данные указывают на отсутствие принципиальных различий в нефритогенности «скарлатинозных» и «носительских» штаммов генотипа *emm1*. Данная активность, скорее всего, согласуется со способностью штаммов данного генотипа связывать нативный IgG, а не IC.

Изучение штаммов *emm12*

Способность штаммов генотипа *emm12* по-разному взаимодействовать с разными формами IgG показана в таблице 3. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что «скарлатинозные» штаммы генотипа *emm12*, известные в качестве нефритогенных, связывают ПАП и ТАТ иммунные комплексы. При этом «носительские» штаммы СГА того же генотипа не взаимодействуют с IC. Важно отметить, что ни один из штаммов не связывал нативный IgG, как и IgG3.

Для изучения способности штаммов индуцировать образование анти-IgG антител, депозицию IgG и C3-комплемента комплемента, а также продукцию провоспалительного цитокина TNF α , каждый из штаммов типа *emm12* испытывали на двух кроликах (табл. 3). В этих же опытах была изучена нефритогенность штаммов генотипа *emm12*. Полученные данные однозначно свидетельствуют в пользу того, что нефритогенная активность «скарлатинозных» штаммов этого генотипа связана с их способностью вызывать реакцию иммунного воспаления в почечных гломерулах (табл. 4). Эта связь указывает на то, что Fc-рецепторная функция штаммов СГА, не только в отношении IgG (как это было показано в опытах со штаммами генотипа *emm1*), но и в отношении IC, является потенциальным фактором инициации развития PSGN. У большинства животных при испытании штаммов *emm12*, выделенных от больных, наблюдался выраженный PSGN; абортивный процесс имел место только у одного кролика в опыте со штаммом *emm12/118*.

Заключение

Является очевидным, что штаммы обоих *emm*-генотипов обладают нефритогенной потенцией, проявляющейся в различной степени. Она определяется конкретными условиями системы «паразит–хозяин», а диапазон проявлений имеет разный, больший или меньший, акцент в модельных экспериментах: выраженный, абортивный или отрицательный. Все три возможности имели место в описанных опытах. Значительное сходство иммунологических и морфологических признаков иммунного воспаления и мембранозно-пролиферативного PSGN у человека и модели на кроликах позволяет рассчитывать на общность механизмов их развития в клинике и в условиях эксперимента.

Результаты обеих серий экспериментов по моделированию PSGN на кроликах суммированы в таблице 5.

Они свидетельствуют о том, что штаммы генотипа *emm1*, выделяемые от больных скарлатиной, связывают как нативный IgG, так и иммунные комплексы, индуцируют в ткани иммунное воспаление и ведут к развитию экспериментального гломерулонефрита. Патологический процесс могут вызывать также штаммы генотипа *emm1* от здоровых носителей и генотипа *emm12* от больных, притом, что первые взаимодействуют только с нативным IgG, а вторые — исключительно с IC.

Интерес представляет неспособность всех «носительских» штаммов обоих генотипов СГА связывать иммунные комплексы, между тем как «скарлатинозные» штаммы были активными в этом отношении. Известно, что Fc-рецепторные белки относятся к семейству M-белков, основных факторов патогенности СГА, и кодируются генами *tga*-регулона [15, 17]. Ранее было установлено, что Fc-рецепторные протеины для нативного и агрегированного

ТАБЛИЦА 3. ТИТР АНТИ-IgG АНТИТЕЛ В КРОВИ КРОЛИКОВ, ДЕПОЗИЦИЯ IgG И С3-КОМПЛЕМЕНТА, ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНА TNF α В ПОЧКАХ ПРИ ИСПЫТАНИИ ШТАММОВ *emm12*, СВЯЗЫВАЮЩИХ И НЕ СВЯЗЫВАЮЩИХ IC

Источник выделения штамма	Штамм	Связывание IgG в RIA	Связывание ПАП IC в dot-blot тесте	Связывание ТАТ IC (%)	Титр анти-IgG антител	Депозиция IgG и С3	Продукция TNF α
Больные скарлатиной	<i>emm12/94</i>	–	+	39,5	1:160	+	+
	<i>emm12/113</i>	–	+	35,0	1:160	+	+
	<i>emm12/118</i>	–	+	29,8	1:80	+	+
Носители	<i>emm12/139</i>	–	–	4,5	1:10	–	–
	<i>emm12/171</i>	–	–	3,0	1:20	–	–
(+) контроль	M12/1800	–	+	43,5	1:160	+	+

ТАБЛИЦА 4. МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОВРЕЖДЕНИЯ ГЛОМЕРУЛ ПРИ ИНДУКЦИИ PSGN ШТАММАМИ СГА ГЕНОТИПА *emm12*, СВЯЗЫВАЮЩИХ И НЕ СВЯЗЫВАЮЩИХ ИММУННЫЕ КОМПЛЕКСЫ*

Штамм и источник их выделения	Корковый слой				Медуллярный слой		Результат
	Число гломерул	Иммунное воспаление			Иммунное воспаление		
		в норме	с деструкцией	в зоне ПК**	зона ЛИ**	в зоне ДК**	
<i>emm12/94</i> (от больного)	4,5±1,3	2,0±0,8	62,5±52	55±46	47,5±40	67,5±57	PSGN
<i>emm12/113</i> (от больного)	5,5±0,4	5,5±0,4	170±40	62±27	172±43	95±44	PSGN
<i>emm12/118</i> (от больного)	10,0±0,8	2,5±1,3	42±35	0	0	0	Абортивный процесс
<i>emm12/139</i> (от носителя)	13±3,5	0	0	0	16±13	10±4,2	Негативный результат
<i>emm12/171</i> (от носителя)	13±2,0	0	0	0	0	0	Негативный результат
M12/1800 (+) контроль	11,5±6,2	3,5±3,0	110±95	33±17	109±95	32±22	PSGN

Примечание. *каждый штамм испытывали на двух кроликах; в таблице даны усредненные показатели;

**ПК — проксимальные канальцы; ДК — дистальные канальцы; ЛИ — лимфоцитарная инфильтрация.

ТАБЛИЦА 5. СУММАРНЫЕ ДАННЫЕ ПО Fc-РЕЦЕПЦИИ ШТАММОВ СГА ГЕНОТИПОВ *emm1* и *emm12*, ВЫДЕЛЯЕМЫХ ОТ БОЛЬНЫХ СКАРЛАТИНОЙ И ЗДОРОВЫХ НОСИТЕЛЕЙ

Генотип штаммов	Источник выделения штаммов	Связывание IgG	Связывание ПАП IC	Результат
<i>emm1</i>	Больные	+	+	PSGN
	Носители	+	-	PSGN
<i>emm12</i>	Больные	-	+	PSGN
	Носители	-	-	-

IgG на поверхности бактерий представлены независимыми сайтами связывания [13]. Поэтому потеря «носительскими» штаммами СГА способности связывать иммунные комплексы может происходить независимо от их взаимодействия с нативным IgG. Это и подтвердилось данными настоящего исследования. Если Fc-рецепторные белки для нативного IgG были описаны ранее [14, 15], то на сегодня наука не располагает сведениями о белках, связывающих IC.

Недавно было показано [6], что штаммы СГА, выделяемые от асимптомных носителей инфекции, нередко несут делецию в промоторной области гена *Mga*-регулятора. Естественно, что такие штаммы-мутанты должны быть дефектными по M-белкам, и в силу этого лишены способности связывать IC. Вполне возможно, что сайт связывания для IC имеет более сложную организацию, чем Fc-рецептор для нативного IgG, и поэтому оказывается более чувствительным к стрессорным воздействиям среды обитания микроба. По-видимому, это обстоятельство может объяснить отмеченную неспособность «носительских» штаммов СГА генотипов *emm1* и *emm12* сохранять активность в отношении иммунных комплексов.

В настоящей работе еще раз подтверждается патогенетическая связь между нефритогенностью СГА и их способностью связывать различные формы IgG. Взаимосвязь между этими свойствами СГА стала очевидной при экспериментальном моделировании патологического процесса, поскольку внутривенное введение кроликам тщательно отмытой и убитой микробной взвеси сопровождается индукцией анти-IgG аутоантител и последующим образованием *in vivo* иммунных комплексов: IgG–анти-IgG. Логично допустить, что функцию триггера при этом должны выполнять связавшиеся с Fc-рецепторами молекулы IgG, которые меняют свою конфигурацию так, что «шарнирная» область оказывается недоступной расщеплению на Fc и Fab-фрагменты посредством цистеиновой протеиназы (эритрогенный токсина *SpeB*) [10] или иных бактериальных энзимов [18]. Потеря молекулами IgG чувствительности к перевариванию энзимами

указывает на приобретение ими новой структуры, приводящей к индукции анти-IgG антител. Это допущение согласуется с недавними представлениями об участии патогенных IgG антител в генезе аутоиммунного гломеруло-нефрита [3].

Образовавшиеся иммунные комплексы активируют комплемент, и его C3-компонент связывается с Fc-частью IgG в составе IC. Участие Fc-рецептора и C3-комплемента является одним из ведущих условий развития иммунного воспаления и PSGN [11]. IgG и C3 образуют в гломерулах почки депозиты (первые имеют вид «серповидных» отложений в мембранах), регистрируемые при гистоиммунохимическом изучении тканевых срезов (рис. 1 и 2).

Депозиция должна происходить за счет тканевых FcγR-рецепторов, широко представленных в гломерулах и в проксимальных канальцах [9]. Депозиция сопровождается выбросом провоспалительных цитокинов (в данном случае TNFα) и мобилизацией макрофагов/моноцитов в очаги воспаления. Именно эти клетки, как показано, экспрессируют FcγR в процессе развития иммунного воспаления, а взаимодействие иммунных комплексов с FcγR регулирует аккумуляцию лимфоцитов в очаги воспаления [9].

В итоге изложенная последовательность событий приводит к развитию мембранозно-пролиферативного PSGN, ранее описанного нами [1, 4]. Естественно, что штаммы СГА, не обладающие Fc-активностью, оказались неспособными вызывать каскад описанных воспалительных реакций и патологию почек.

На сегодня мы не можем исключить участия в патологическом процессе и других иммунных комплексов, формирующихся в результате взаимодействия поверхностных белков СГА с некоторыми белками крови кролика. Это взаимодействие вряд ли может оказаться безразличным для организма хозяина.

Для моделирования поражения почечных гломерул обычно используют различные подходы. К ним относятся: взивление животным подкожных камер, инфицированных живой бактериальной культурой, иммунизация лабораторных животных базальной мембраной гломерул гетерологического вида, введение гетерологических антисывороток против базальной

мембраны либо введение животным гетерологичного иммуноглобулина в сочетании с антителами к данному IgG. При этом у животных формируются IC типа IgG–анти-IgG либо возникает непосредственная атака антител против белков базальной мембраны гломерул и канальцев [8, 12, 16]. Очевидно, что в условиях такого «облегченного» моделирования поражения модель, безусловно, «будет работать», но не позволит понять роль возможных факторов *Streptococcus pyogenes* и реакций организма-хозяина в генезе изложенных событий, приводящих к развитию PSGN. Использованная нами модель в большей степени близка к естественной ситуации, возникающей при острой СГА-инфекции у человека. Кроме всего прочего, модель исключает участие внеклеточных факторов в процессе, поскольку для моделирования нами использовалась убитая прогреванием и отмытая от примесей взвесь микробных клеток.

Дополнительным аргументом в пользу изложенных представлений о генезе экспериментального PSGN стала работа [7], в которой посредством препаратов Fc-части IgG авторам удалось подавлять развитие патологии. Позже эти результаты были подтверждены и нами.

Результаты работы свидетельствуют о том, что штаммы типа *emm1*, которые чаще относят к «ревматогенным», являются относительно слабыми индукторами гломерулонефрита. Это, в принципе, согласуется с данными приведенных экспериментов, в которых пять штаммов генотипа *emm1*, связывающих нативный IgG, вызывали выраженный патологический процесс только у трех из 10 подопытных животных. Обратная картина имела место с тремя штаммами типа *emm12*, связывающими только иммунные комплексы; при их испытании выраженный PSGN наблюдался у пяти из шести использованных кроликов. Приведенные данные подчеркивают выраженную нефрито-

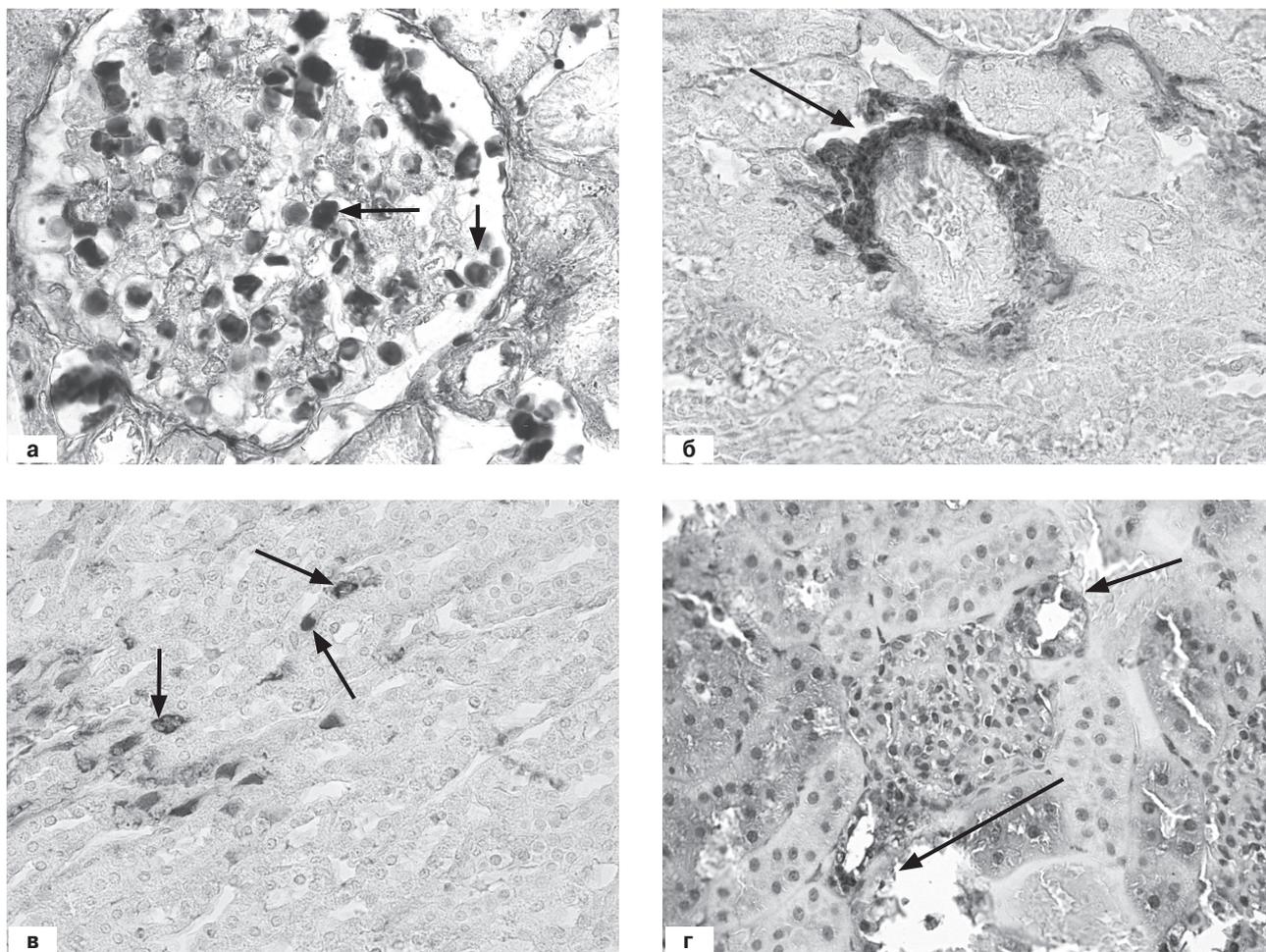


Рисунок 1. Иммуноморфологические изменения в корковом и мозговом слоях почки кролика, индуцированные штаммами *emm1*, связывающими нативный IgG и иммунные комплексы

Примечание. а — экспрессия TNF α мезангиальными клетками гломерул (стрелки); б — серповидное отложение IgG в мембране проксимального канальца (стрелка); в — C3-компонент комплемента в клетках дистальных канальцев (стрелки); г — отек и утолщение мембраны проксимальных канальцев, десквамация эпителия по периферии сдавленных клубочков (стрелки); а–в: иммуногистохимическая окраска, $\times 750$; г — окраска гематоксилин-эозином, $\times 500$.

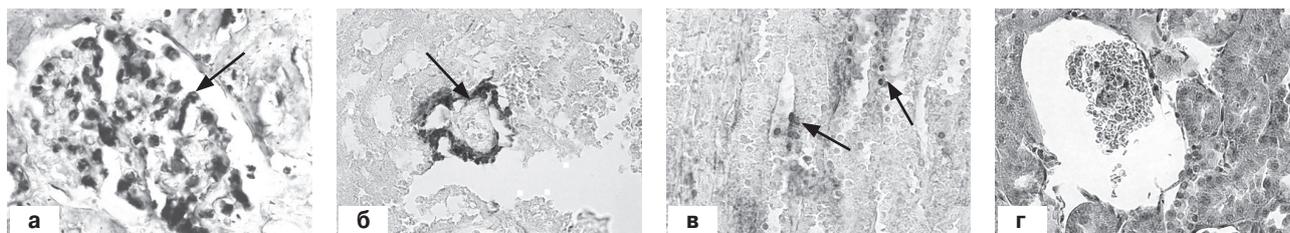


Рисунок 2. Иммуноморфологические изменения в корковом и мозговом слоях почки кролика, индуцированные штаммами *emm12*, связывающими только иммунные комплексы

Примечание. а — экспрессия TNF α мезангиальными клетками (стрелки) клубочка; б — серповидное отложение IgG в стенке проксимального канальца (стрелка); в — депозиция С3-компонента комплемента в клетках дистальных канальцев (стрелки); г — атрофия ткани почечного клубочка, обилие эритроцитов в его полости; а–в: иммуногистохимическая окраска, $\times 750$; г — окраска гематоксилин-эозином, $\times 550$.

генную активность штаммов *emm12*, что согласуется с их более высокими показателями Fc-рецепции, титров анти-IgG антител и иммунного воспаления.

Очевидно, что включение штаммов генотипа *emm12* в группу «нефритогенных» СГА выпол-

не оправдано. Из изложенного следует, что обнаружение у больных острой СГА-инфекцией штаммов генотипа *emm12* (по сравнению со штаммами типа *emm1*) следует рассматривать как высокий фактор риска развития постстрептококкового гломерулонефрита.

Список литературы/References

1. Тотолян А.А., Бурова Л.А., Нагорнев В.А., Пигаревский П.В. Анализ механизмов иммунопатологического постстрептококкового гломерулонефрита // *Терапевтический архив*. 2008. Т. 80, № 6. С. 90–95. [Totolian A.A., Burova L.A., Nagornev V.A., Pigarevskiy P.V. Analysis mechanisms of immunopathological post-streptococcal glomerulonephritis. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2008, vol. 80, no. 6, pp. 90–95. (In Russ.)]
2. Тотолян А.А., Бурова Л.А. Критический анализ предполагаемых механизмов патогенеза постстрептококкового гломерулонефрита // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2001. Т. 3, № 4. С. 316–323. [Totolian A.A., Burova L.A. Critical analysis of suggested mechanisms of pathogenesis of the post-streptococcal glomerulonephritis. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, vol. 3, no. 4, pp. 316–323. (In Russ.)]
3. 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: 10.3109/08916934.2012.702812
4. Burova L., Pigarevsky P., Sliverstova V., Gupalova T., Schalen C., Totolian A. Experimental poststreptococcal glomerulonephritis elicited by IgG Fc-binding M family proteins and blocked by IgG Fc fragment. *APMIS*, 2012, vol. 120, no. 3, pp. 221–230. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02826.x
5. Collan Y. Morphometry in pathology: another look at diagnostic histopathology. *Pathol. Res. Pract.*, 1984, vol. 179, pp. 189–192. doi:10.1016/S0344-0338(84)80126-0
6. Flores A.R., Olsen R.J., Wunsche A., Kumaraswami M., Shelburne S.A., Carroll R.K., Musser J.M. Natural variation in the promoter of the gene encoding the Mga regulator alters host-pathogen interaction in group A *Streptococcus* carrier strains. *Infect. Immun.*, 2013, vol. 81, no. 11, pp. 4128–4138. doi: 10.1128/IAI.00405-13
7. Gomez-Guerrero C., Duque N., Casado M.T., Pastor C., Blanco J., Mampaso F., Vivanco F., Egado J. Administration of IgG Fc-fragments prevents glomerular injury in experimental immune complex nephritis. *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, no. 4, pp. 2092–2101. doi: 10.4049/jimmunol.164.4.2092
8. Kefalides N.A., Pegg M.T., Ohno N., Poon-King T., Zabriskie J., Fillit H. Antibodies to basement membrane collagen and to laminin are present in sera from patients with poststreptococcal glomerulonephritis. *J. Exp. Med.*, 1986, vol. 163, no. 3, pp. 588–602.
9. Kovalenko P., Fujinaka H., Yoshida Y., Kawamura H., Qu Z., El-Shemi A., Li H., Matsuki A., Bilim V., Yaoita E., Abo T., Uchiyama M., Yamamoto T. Fc receptor-mediated accumulation of macrophages in crescentic glomerulonephritis induced by antiglomerular basement membrane antibody administration in WKY rats. *International Immunology*, 2004, vol. 16, no. 5, pp. 625–634. doi: 10.1093/intimm/dxh058
10. Nelson D.C., Garbe J., Collin M. Cysteine proteinase SpeB from *Streptococcus pyogenes* — a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins. *Biol. Chem.*, 2011, vol. 392, pp. 1077–1088. doi: 10.1515/BC.2011.208
11. Otten M.A., Groeneveld T.W.L., Flierman R., Rastaldi M.P., Trouw L.A., Faber-Krol M.C., Visser A., Essers M.C., Claassens J., Verbeek J.S., van Kooten C., Roos A., Daha M.R. Both complement and IgG Fc receptors are required for development of attenuated antiglomerular basement membrane nephritis in mice. *J. Immunol.*, 2009, vol. 183, pp. 3980–3988. doi: 10.4049/jimmunol.0901301
12. 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

13. Schalen C., Kurl D., Christensen P. Independent binding of native and aggregated IgG in group A streptococci. *APMIS*, 1986, vol. 94B, iss. 1–6, pp. 333–338. doi: 10.1111/j.1699-0463.1986.tb03062.x
14. Stenberg L., O'Toole P., Lindahl G. Many group A streptococcal strains express two different immunoglobulin-binding proteins, encoded by closely linked genes: characterization of the proteins expressed by four strains of different M-type. *Mol. Microbiol.*, 1992, vol. 6, no. 9, pp. 1185–1194. doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01557.x
15. Stenberg L., O'Toole P.W., Mestecky J., Lindahl G. Molecular characterization of protein Sir, a streptococcal cell surface protein that binds both immunoglobulin A and immunoglobulin G. *Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, no. 18, pp. 13458–13464.
16. Taylor S.R.J., Turner C.M., Elliott J.I., McDaid J., Hewitt R., Smith J., Pickering M.C., Whitehouse D.L., Cook H.T., Burnstock G., Pusey C.D., Unwin R.J., Tam F.W.K. P2X₇ deficiency attenuates renal injury in experimental glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2009, vol. 20, no. 6, pp. 1275–1281. doi: 10.1681/ASN.2008060559
17. Thern A., Wastfelt M., Lindahl G. Expression of two different antiphagocytotic M proteins by *Streptococcus pyogenes* of the OF⁺ lineage. *J. Immunol.*, 1998, vol. 160, no. 2, pp. 860–869.
18. Yang R., Otten M.A., Hellmark T., Mattias C., 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. 2479–2486. doi: 10.1093/ndt/gfq115

Авторы:

Булова 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;
Кулешевич Е.В., младший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Жарков Д.А., преподаватель кафедры эпидемиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Шален К., д.м.н., отдел медицинской микробиологии Лундского Университета, Лунд, Швеция;
Тотоян 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 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;
Kuleshevich E.V., Junior Researcher, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Zharkov D.A., Lecturer, Department of Epidemiology, Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation;
Schalen C., PhD, MD (Medicine), Department of Medical Microbiology, Lund University, Lund, Sweden;
Totolian Artem A., PhD, MD (Medicine), Academician of the Russian Academy of Sciences, Head Researcher, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 28.05.2015
 Отправлена на доработку 06.07.2015
 Принята к печати 05.08.2015

Received 28.05.2015
 Revision received 06.07.2015
 Accepted 05.08.2015