

НЕФРИТОГЕННОСТЬ IgA-СВЯЗЫВАЮЩИХ *STREPTOCOCCUS PYOGENES*. МОДЕЛИРОВАНИЕ IgA-ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА

Бурова Л.А.¹, Пигаревский П.В.¹, Снегова В.А.¹, Дуплик Н.В.¹,
Шален Клаас², Тотолян Артем А.¹

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² Институт медицинской микробиологии Лундского Университета, Лунд, Швеция

Резюме. Цель настоящего исследования состояла в создании экспериментальной кроличьей модели IgA-нефропатии. Для этого применили подходы, которые ранее с успехом использовались при моделировании постстрептококкового гломерулонефрита (PSGN), а также штаммы *Streptococcus pyogenes* серотипов М4 и М60, способные в разной степени связывать IgA посредством IgAFc-рецепторного белка микроба. Развитие патологического процесса в почках констатировали у большей части животных, получивших инъекции гемолитического стрептококка генотипа *emm60*, обладающего выраженной экспрессией IgAFcR-белка. При морфометрическом анализе у шести из 10-ти кроликов удалось обнаружить выраженные морфологические и иммунохимические изменения в почках: (i) массивные отложения IgA в мезангиальных клетках клубочков, атрофию их капиллярной сети и отек тканей; (ii) выраженное отложение С3-компонента комплемента в канальцах; (iii) значительную лимфоцитарную инфильтрацию в корковом и мозговом веществах почки на фоне слабой продукции цитокина TNF α . Примечательно, что во всех случаях отсутствовала депозиция IgG, что позволило исключить роль анти-IgA антител, как и других IgG, в патологическом процессе. Альтернативным источником депозиции IgA может быть отложение в ткани IgA в комплексе с IgA FcR микроба, как это было показано ранее шведской группой ученых. Описанные изменения отсутствовали в почках контрольных животных. Совокупность полученных результатов позволяет допустить, что нам удалось создать модель гломерулонефрита, близкую по проявлениям к IgA-нефропатии человека. Они также расширяют наши представления о патогенных функциях IgFс-связывающих белков в генезе патологии, вызываемой *Streptococcus pyogenes*.

Ключевые слова: *Streptococcus pyogenes*, стрептококковая IgAFc-связывающая активность, IgA-нефропатия, экспериментальная модель

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Л.А. Бурова, П.В. Пигаревский, В.А. Снегова,
Н.В. Дуплик, Клаас Шален, Артем А. Тотолян,
«Нефритогенность IgA-связывающих *Streptococcus*
pyogenes. Моделирование IgA-гломерулонефрита»
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 3.
С. 221-230. doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-221-230

© Бурова Л.А. и соавт., 2016

For citation:

L.A. Burova, P.V. Pigarevsky, V.A. Snegova, N.V. Duplik,
Artem A. Totolian, "Nephritogenic activity of IgA-binding
Streptococcus pyogenes: an experimental model of IgA
glomerulonephritis", *Medical Immunology (Russia)/*
Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 3,
pp. 221-230. doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-221-230

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-3-221-230>

NEPHRITOGENIC ACTIVITY OF IgA-BINDING STREPTOCOCCUS PYOGENES: AN EXPERIMENTAL MODEL OF IgA GLOMERULONEPHRITIS

Burova L.A.^a, Pigarevsky P.V.^a, Snegova V.A.^a, Duplik N.V.^a,
Schalen Klaas^b, Totolian Artem A.^a

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b Department of Medical Microbiology, Lund University, Lund, Sweden

Abstract. The aim of present study was to arrange an experimental rabbit model for IgA-nephropathy. To this purpose, an approach was attempted which was previously successfully applied in rabbits, aiming for induction of post-streptococcal glomerulonephritis (PSGN). To induce the nephropathy, we used two *Streptococcus pyogenes* strains of M4 and M60 serotypes which showed differential IgA-binding capacity mediated by the IgAFc microbial receptors. The renal tissue damage was developed in most animals treated with *emm60 S. pyogenes* characterized by marked IgAFcR expression and higher IgA-binding ability. By means of morphometric analysis. Significant morphological and immunochemical glomerular changes were revealed in 6/10 rabbits, as follows: (i) massive IgA deposition in the mesangial glomerular cells, atrophy of the capillary net, and tissue oedema; (ii) marked C3-complement deposition in proximal and distal tubules; (iii) a significant infiltration of cortical and medullar areas by lymphocytes associated with weak TNF α production. Noteworthy, we did not observe local IgG deposition in any cases, thus allowing to exclude any role of anti-IgG, or other IgG's in evolution of the pathology. Alternatively, the IgA-deposits may occur due to microbial IgA FcR-IgA-containing complexes, as earlier shown by the Swedish scientists. The above tissue changes were completely absent in kidneys of control animals. Taken together, these data suggest that we have developed an experimental model similar to IgA-nephropathy in humans. The results also extend our knowledge on pathogenic effects of the IgA Fc-binding proteins of *Streptococcus pyogenes*.

Keywords: *Streptococcus pyogenes*, IgA-binding streptococci, IgA nephropathy, experimental model

Настоящая работа выполнена в рамках проекта Российского фонда фундаментальных исследований № 14-04-00390а.

Введение

В современной нефрологии одно из ведущих мест занимают работы по изучению IgA-нефропатий (IgAN), при которых диагностическим критерием служит депозиция иммуноглобулина А подкласса IgA1 в мезангиальных клетках почечных гломерул [5,23, 28]. Авторы считают, что патогенез IgAN связан с синтезом и накоплением в сыворотке больших молекулярных форм IgA1, недостаточных по галактозилированию и сиализированию шарнирной области молекул IgA1 [28]. Они формируют димеры или полимерные комплексы IgA1, а также IgA1, содержащие иммунные комплексы (IC) с антигликановыми IgG-антителами против данного участка «патогенного» IgA1 [22, 27]. Их депозиция в мезангиуме, по существу, выполняет функцию триггера в развитии воспаления и IgAN [22]. IgA-содержащие комплексы, откладываясь в клубочках, обуславливают мезангиально-пролиферативный процесс, склонный к хроническому течению с периодами ремиссий [5], возникаю-

щими, например, при соблюдении диетического питания, не содержащего глютен [9, 10]. IgAN имеет много причин. Она может развиваться либо как первичное заболевание [25, 27], либо как следствие регуляторных нарушений в иммунной системе слизистых оболочек [18]. В этиологии IgAN значительное внимание отводится вирусным и бактериальным инфекциям [1]. Существенное место в патогенезе IgAN принадлежит, в частности, стрептококковым заболеваниям [15, 16]. Каждая из этих причин накладывает отпечаток на генез IgAN и, возможно, на характеристику «патогенных» IgA-содержащих комплексов.

Так, например, ряд авторов, изучая биоптаты от больных IgAN, пришел к выводу о том, что галактозо-дефицитные формы IgA1, на фоне инфекции, вызванной IgA-связывающими серотипами M4 и M60 *Streptococcus pyogenes* (СГА), активнее других форм IgA1 взаимодействуют с IgAFc-рецептором M-белка микроба, формируя при этом комплексы IgA1-IgAFcR, которые откладываются в гломерулах и ведут к мезанги-

ально-пролиферативному IgAN [19, 20]. В качестве IgA FcR, в первую очередь, могут выступать либо Emм-белки большинства *emm*-генотипов СГА, связывающие IgA [21] и одновременно IgG, либо Agr-белки СГА *emm*-генотипов 4 и 60. Последние связывают в основном IgA и крайне слабо IgG [15]. Согласно описанному, в патогенезе IgAN, по-видимому, участвуют различные IgA-содержащие комплексы. Имеются в виду указанные выше комплексы «патогенных» IgA1-димеров и полимеров с IgG-антигликановыми антителами, либо комплексы IgA с IgAFcR белками СГА. Однако, удельный вклад каждого из них в происхождении IgAN нуждается в уточнении, поскольку очевидно, что IgA1 в полимерной форме либо в комплексе с антителами сам по себе может вызывать поражение гломерул, в том числе и на фоне стрептококковой инфекции.

Ранее нами была показана способность СГА *emm*-генотипов 1, 12 и 22 индуцировать в эксперименте на кроликах поражение почечных клубочков — постстрептококковый гломерулонефрит (PSGN). Нефритогенность штаммов определялась по присутствию в их клеточной стенке IgGFc-связывающих белков М-семейства (IgGFcR), которые неиммунно связывали мономерный IgG либо IC посредством Fc-части IgG. Вызываемый патологический процесс рассматривался как инициированный ими каскад последовательных реакций в системе «паразит—хозяин» (связывание IgG, синтез анти-IgG антител; образование иммунных комплексов IgG—анти-IgG; их отложение в почечных гломерулах в сочетании с С3-комплемента; экскреция провоспалительных цитокинов; лимфоцитарная инфильтрация ткани), приводящих к иммунному воспалению в тканях и в итоге к развитию мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита [6, 7].

Так или иначе, но во всех перечисленных работах авторы обсуждают в качестве одной из ведущих роль иммунных или полимерных комплексов в развитии воспаления, а также активное участие микробных, а также и тканевых Fc-рецепторных структур в патологии почек. Возникает вопрос, участвуют ли перечисленные выше факторы в развитии IgA-нефропатии при попытке моделирования данного процесса в эксперименте с помощью IgA-связывающих М-серотипов СГА? Для ответа на данный вопрос в работе предпринята попытка моделирования поражения почек посредством штаммов серотипов М4 и М60, которые, в отличие от многих других СГА, преимущественно связывали IgA. С этой целью использовали схему, ранее примененную для модели PSGN посредством IgG-связывающих штаммов СГА, а также Fc-рецепторных белков микроба [6].

Материалы и методы

Бактериальные штаммы

В работе использованы референс-штаммы СГА: М4(56/59) и М60 (3/71); СГВ — штамм Н36, полученные из референс-лаборатория ВОЗ, Прага, Чехия.

Связывание нативного IgA

Для выявления рецепторной активности стрептококков в dot-blot тесте использовали супернатанты культур, трижды (по 30 с) дезинтегрированных при 22kHz и 0,6-0,8mA в УЗ-дезинтеграторе MSE (UK). Супернатанты стерилизовали через миллиметровые фильтры с размером пор 0,45 микрон.

Dot-blot тест ставили на нитроцеллюлозной мембране, используя двукратные разведения супернатанта УЗ-дезинтеграта микробных клеток. Блокатором служило обезжиренное молоко (Blotting-GradeBlocker, Bio-Rad), в качестве проявляющего субстрата использовали ТМВ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Sigma). IgA был выделен из сыворотки больного IgA миеломой, любезно предоставленной д-ром А. Grubb, отдел биохимии Лундского Университета, Швеция. Для выделения IgA использовали Capture elect IgA аффинную матрицу фирмы Lifetechnologies (USA), содержащую VHH домен антител, распознающий все подклассы мономерного, димерного и секреторного IgA, конъюгированный с альдегид-активированной агарозой. Очистку IgA проводили с использованием FPLC хроматографической системы. Лиофильно высушенный IgA конъюгировали с пероксидазой из корня хрена (Sigma) периодатным методом.

Экспериментальный гломерулонефрит

Моделирование IgAN на кроликах выполняли на основании разрешения на работу с животными (AnimalWelfareAssurance#A5243-01). За основу была взята ранее разработанная нами модель постстрептококкового гломерулонефрита [6, 7]. Кратко ее схема заключается в следующем: микробные клетки, выращенные в бульоне Todd-Hewitt, убивали нагреванием при 60 °C в течение 1 ч, обрабатывали 1M раствором KSCN для удаления связанных иммуноглобулинов и 6 раз отмывали в PBS[7]. Кроликам взвесь бактерий (10⁹/мл КФЕ) вводили внутривенно 3 раза в неделю в течение 8-ми недель. Каждый тестируемый штамм испытывали минимум на двух кроликах. Через неделю после последней инъекции почки животных подвергали иммуноморфологическому и гистологическому исследованию.

Определение анти-IgA антител в сыворотках кроликов

Титры анти-IgA определяли в реакции гемагглютинации бараньих эритроцитов, нагруженных IgA.

Иммуноморфологическое изучение почечной ткани

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

Для выявления депозиции IgA в ткани использовали кроличий IgG, выделенный из антисыворотки против IgA человека. В качестве вторых антител применяли козы антитела против кроличьего IgG, меченные пероксидазой корня хрена (Sigma, США).

Для выявления в депозитах IgG использовали козы антитела к IgG кролика, меченные пероксидазой (Sigma, США).

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

Производство цитокина TNF α выявляли козой антисывороткой против кроличьего TNF α (AMSBiotechnology, США) с последующей обработкой срезов кроличьими антикозными антителами, мечеными пероксидазой.

Первоначально микроскопию тканевых образцов после их окрашивания гематоксилин-эозином производили при малых и средних увеличениях (x100-600) для оценки тканевых изменений в различных полях зрения. Затем иммуноокрашенные образцы исследовали при большем увеличении (x900-1100) с целью выявления депозиции IgG и С3, а также экспрессии TNF α .

Морфометрическая оценка изменений в почечной ткани производилась следующим об-

разом: 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 сетки содержит 256 малых квадратов), накладываемую на образец ткани. Пропорция малых квадратов с деструктивными 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 [8].

Результаты

IgA-связывающие штаммы СГА отбирали по результатам dot-blot теста, изучая способность цельных и разведенных препаратов супернатантов УЗ-дезинтеграторов микробных культур связывать как IgA, так и IgG. Были отобраны штаммы серотипов М4 и М60. Штамм М4 обнаружил активность лишь в цельном препарате УЗ-дезинтеграта, при этом активно связывал IgG и слабее IgA, между тем как штамм М60 не реагировал с IgG и связывал IgA в разведении препарата 1:32. Позитивным контролем в отношении связывания IgA служили штамм *Streptococcus agalactiae* (СГВ) и выделенный из него Вас-белок (не является IgAFcR); отрицательным контролем – протеин-А *Staphylococcus aureus*, известный как IgG-, но не IgAFcR. Соответственно, в первых контрольных пробах место имело интенсив-

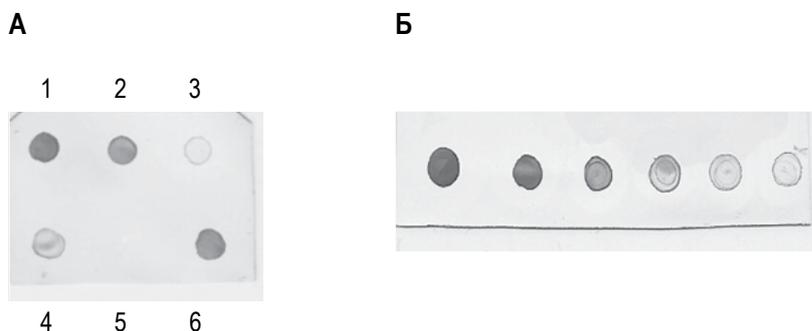


Рисунок 1. Связывание IgA-штаммами стрептококков серогрупп А и В

Примечание. А – супернатанты (неразведенные препараты в объеме 3 мкл) ультразвукового дезинтеграта стрептококков. 1 – Н36 (GBS) – положительный контроль; 2 – М60; 3 – М4; 4 – М22; 5 – белок А – отрицательный контроль; 6 – очищенный вас-белок из Н36 – положительный контроль.

Б – разведения препарата ультразвукового дезинтеграта стрептококка группы А типа М60: от цельного препарата до разведения 1:32 в объеме 3 мкл.

ное взаимодействие с IgA, а протеин-А не связывал IgA (рис.1).

Штаммы СГА М4 и М60, а также контрольный штамм СГВ Вас⁺ (Н36) использовали для моделирования IgAN на кроликах, используя описанную ранее схему инъекций микробных клеток [17]. При тестировании нефритогенности штаммов определяли их способность вызывать продукцию анти-IgA антител класса IgG, так как иммунные комплексы IgA-анти-IgA, естественно образующиеся в организме, могли бы вызвать депозицию IgАи С3-комплемента, а также продукцию провоспалительного цитокина TNF α . Как и ожидалось, контрольный штамм СГВ Вас⁺, хотя и связывал IgA, не индуцировал синтез анти-IgA антител и образование соответствующих иммунных комплексов (IC). При этом отсутствовали тканевая депозиция IgA и С3-комплемента, а также продукция TNF α . Аналогичным образом вел себя штамм М4 при тестировании на четырех кроликах, по-видимому, в связи с крайне слабой экспрессией IgAFcR белка и поэтому недостаточным связыванием IgA (табл. 1).

Противоположная картина имела место в опытах со штаммом М60 на 10 кроликах. В этой группе при иммуногистохимической обработке срезов почечной ткани депозиты IgA наблюдались у 8 животных, С3-комплемента – у 3-х и продукция TNF α – лишь у одного животного. У них обнаружена слабая продукция анти-IgA

антител в титрах не выше 1:20. Следует отметить, что депозиция IgG отсутствовала во всех случаях.

Численные параметры нефритогенной активности штаммов определяли по данным морфометрии срезов с последующей статистической обработкой данных [8] (табл. 2). В соответствии с полным отсутствием проявлений воспаления, морфологические изменения в нефронах контрольных животных в опытах со штаммом М4 не были обнаружены. Они были выявлены только у кроликов, получивших инъекции стрептококковых клеток штамма М60. В тканевых срезах данных кроликов наблюдались выраженные изменения в клубочках и в канальцах, а также отчетливая воспалительная лимфоцитарная инфильтрация ткани в корковом и мозговом слоях. Следует отметить, что эти изменения были выявлены не у всех животных. Так, из 10 кроликов поражение нефронов было зарегистрировано у 6-ти (табл. 2), в том числе у одного оно носило abortивный характер. У этих же кроликов поражение наблюдалось в 26 из 61 клубочка (42,6%). Область поражения проксимальных канальцев в среднем занимала площадь 61,2 малого квадрата морфометрической сетки, а дистальных канальцев – 60,83 малых квадратов. Площадь лимфоцитарной инфильтрации в корковом слое соответствовала 46,33, а в мозговом слое – 74,33 малым квадратам.

На рисунках 2 и 3 приведены морфологические и иммуногистохимические изменения, об-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ В ПОЧЕЧНЫХ ГЛОМЕРУЛАХ КРОЛИКОВ ПРИ ИСПЫТАНИИ НЕФРИТОГЕННОСТИ ШТАММОВ СГА СЕРОТИПОВ М4 И М60

Штамм и число кроликов	IgA-связывание	IgG-связывание	Титр анти-IgA	Депозиция			Продукция TNF α	Результат
				IgA	IgG	С3		
СГВ/Н46 Вас ⁺ (контроль) – 2 кролика	+++	–	< 1:10	–	NT	–	–	Негативный
				–	NT	–	–	Негативный
СГА <i>emm4</i> штамм 56/59 – 4 кролика	+	±	1:10	–	–	–	–	Негативный
				–	–	–	–	Негативный
				–	–	–	–	Негативный
				+	–	–	–	Негативный
СГА <i>emm60</i> штамм 3/71 – 10 кроликов	++	–	1:20	+	NT	–	–	IgAN
				+	NT	+	–	IgAN
				+	NT	–	–	IgAN
				–	NT	–	–	Негативный
				+	NT	–	+	Негативный
				++	–	+	NT	IgAN
				+	–	+	NT	Абортивный процесс
				+	–	–	NT	IgAN
				–	–	–	NT	Негативный
				+	–	–	NT	Негативный

ТАБЛИЦА 2. МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОРАЖЕНИЯ ПОЧЕЧНЫХ ГЛОМЕРУЛ, ВЫЗВАННОГО IgA-СВЯЗЫВАЮЩИМИ ШТАММАМИ СГА

Штамм и число кроликов	Корковый слой				Мозговой слой		Результат
	Число гломерул		Иммунное воспаление		Иммунное воспаление		
	в норме	поврежденных	в зоне ПК*	зона ЛИ***	в зоне ДК**	зона ЛИ***	
СГА типа М4 штамм 56/59 – 4 кролика	10	1	0	0	0	0	Негативный
	11	0	0	0	0	0	Негативный
	14	0	0	0	0	0	Негативный
	14	1	0	0	0	0	Негативный
СГА типа М60 штамм 3/71 – 10 кроликов	5	3	30	24	83	102	IgAN
	5	5	32	65	71	86	IgAN
	8	5	15	15	69	75	IgAN
	11	0	0	11	0	0	Негативный
	10	1	0	0	0	0	Негативный
	6	4	78	115	120	135	IgAN
	9	1	0	20	0	30	Абортивный
	2	8	212	39	22	18	IgAN
	10	0	0	0	0	0	Негативный
9	1	0	0	0	0	Негативный	
Усредненные данные	5,83±0,8	4,33±0,9	61,2±19,2	46,33±13,0	60,83±14,6	74,33±9,8	

Примечание. * – проксимальный каналец; ** – дистальный каналец. *** – лимфоцитарная инфильтрация.

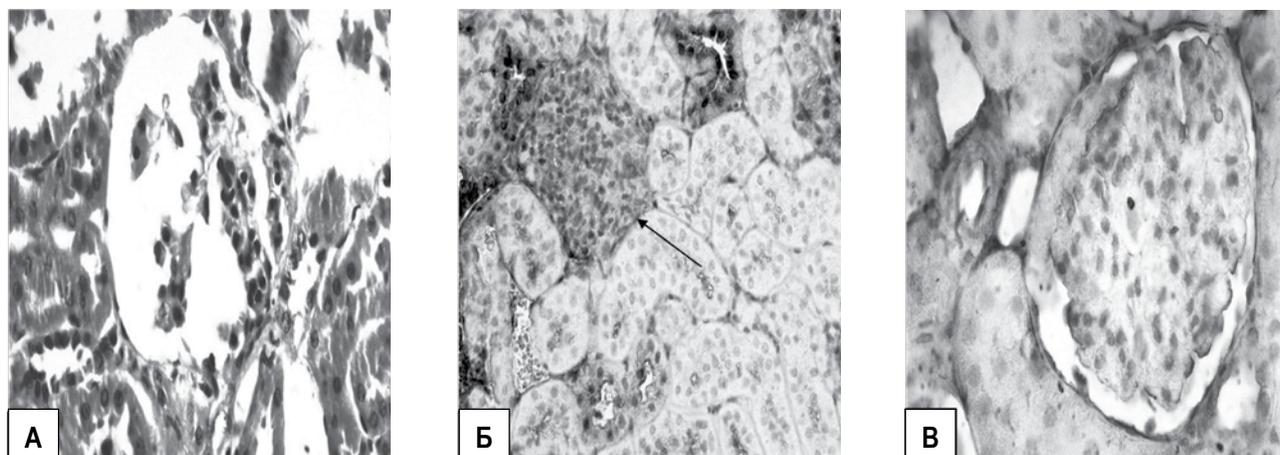


Рисунок 2. Морфология почечной ткани кролика после 8-ми недель инъекций *Streptococcus pyogenes* типа М60

Примечание. А – выраженная атрофия капиллярных петель почечного клубочка, отек; Б – сдавленный почечный клубочек с некрозом и атрофией капиллярных петель и с исчезновением полости клубочковой капсулы (стрелка), клубочек окружен проксимальными канальцами с выраженным отеком и с отсутствием в них просвета; В – отсутствие изменений в ткани почечного клубочка интактного животного.

А, Б, В – окраска гематоксилин эозином, х750.

наруживаемые в срезах коркового и мозгового слоев почек экспериментальных животных при испытании штамма серотипа М60. Отмечались: отек тканей, сдавленность клубочков, некроз и атрофия капилляров, запустение полости клу-

бочковой капсулы, а также отек и уменьшение просвета канальцев. Наряду с этим наблюдались выраженные отложения IgA в мезангиуме клубочков и С3-компонента комплемента в канальцах.

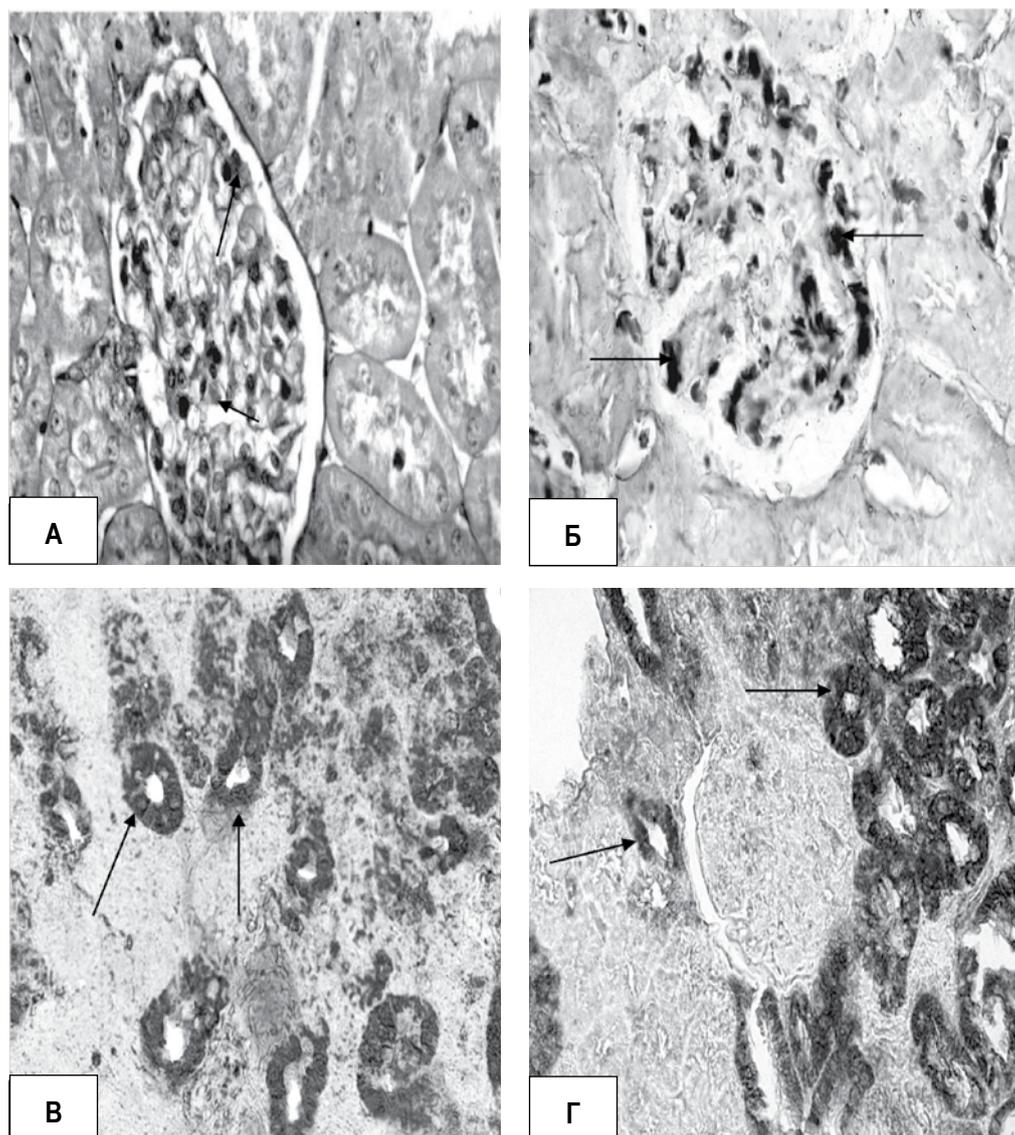


Рисунок 3. Иммуноморфологические изменения в корковом и мозговом веществе почки кролика, индуцированные *Streptococcus pyogenes* типа M60

Примечание. А, Б – депозиты IgA в мезангиальных клетках почечного клубочка (стрелки); В – отложения С3-компонентов комплемента в клетках проксимальных канальцев (стрелки) мозгового слоя почки; Г – отложения С3-компонентов комплемента в клетках проксимальных канальцев (стрелки), окружающих почечный клубочек в корковом веществе.
А, Б, В, Г – иммуногистохимическая окраска, $\times 750$.

Обсуждение

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют об отсутствии нефритогенности у штамма серотипа М4. По-видимому, слабая IgA-связывающая активность определяла его неспособность индуцировать активный синтез анти-IgA антител класса IgG. При этом формирование комплексов IgA–анти-IgA либо не происходило вовсе, либо их концентрация была крайне низкой, показателем чего служит полное отсутствие воспалительной реакции или ее компонентов в ткани их почек. Кроме того, результат

этой серии опытов указывал на то, что введение чужеродного материала кроликам по изложенной схеме само по себе не способно было вызвать повреждение клубочков и канальцев почки, то есть служило своеобразным контролем на зависимость нефритогенности СГА от наличия специфической IgFc-рецепторной функции.

Результаты опытов со штаммом серотипа М60 указывают на его относительно большую нефритогенную активность. По-видимому, процесс формировался на фоне умеренно выраженного воспаления, о чем можно судить по низкому ти-

тру анти-IgA-антител, отсутствию регулярности депозиции IgA, C3-комплемента и в продукции цитокина TNF α . Тем не менее воспалительная реакция имела место и проявлялась в выраженной лимфоцитарной инфильтрации тканей в зонах поражения структур нефронов, ответственных за мочевыделительную функцию почек. Депозиция IgA обнаруживалась у 8 животных, но при этом у двух она не сопровождалась морфологическими изменениями в гломерулах. Депозиция C3-комплемента имела место у 3 из 6 животных с поражением почек. Именно в этих случаях наблюдалась выраженная воспалительная инфильтрация тканей. Можно допустить, что показатели поражения варьировали в зависимости от индивидуальной чувствительности кроликов. Возможно, это обстоятельство повлияло на устойчивость 4-х животных к повреждающему действию СГА и на способность приводить к abortивной реакции. Интересно, что такой же разброс наблюдали и японские авторы при моделировании IgAN на мышах [11]. Надо отметить, что в предыдущих работах по моделированию PSGN на кроликах IgG-связывающими штаммами СГА мы регистрировали более выраженный характер воспалительных и морфологических проявлений со стороны почек, свойственный острому воспалению, чем в случаях испытания IgA-связывающего СГА.

Примечательно, что в настоящей работе ни у одного животного не удалось выявить депозицию IgG, притом что имела место выраженная депозиция IgA в мезангиуме гломерул. По-видимому, она была результатом отложения комплексов IgA с IgAFc-рецепторным белком СГА типа M60, а не комплексов IgA-анти-IgA-антител, титр которых в крови кроликов должен был быть крайне низким в связи с низким титром анти-IgA-антител. Данное допущение, как и полученные результаты, вполне могут служить подтверждением вывода шведских авторов, обнаруживших в биоптатах от IgAN-пациентов IgAFc-белки СГА [19]. Известно, что депозиция IgA-содержащих комплексов в мезангиальных клетках гломерул человека при отсутствии IgG-депозитов является достоверным критерием диагностики IgAN, вызванной стрептококками группы А [20]. Это позволяет полагать, что в опытах на кроликах нам удалось создать модель IgAN в качестве процесса, индуцированного СГА. Очевидно, что данная форма IgAN должна отличаться от первичной, классической, формы составом комплексов и условиями их депозиции в клетках мезангиума. Согласно современным представлениям, при первичной форме IgA-содержащие депозиты включают также анти-IgAIgG-антитела [27], между тем как для «стрептококкового» IgAN характерно образование

комплексов на основе IgA FcR-белков СГА [19], хотя в обоих случаях IgA представлен дефицитным по галактозе IgA1. Этими различиями могут определяться механизмы отложения комплексов на рецепторных структурах гломерул. При первичной форме депозиция должна происходить, по-видимому, за счет Fc-рецепторов ткани [13]; во втором случае посредником служит FcR-белок микроба [20].

За рамками настоящей работы открытым пока остается вопрос о том, имеется ли в депозитах почечных гломерул дегалактозилированный IgA. Его присутствие позволило бы с большим основанием считать полученную модель полностью соответствующей истинной IgAN человека. Напомним, что IgA1 характерен для человека и приматов, но не других животных, то есть при моделировании на них речь может идти не об аномальном IgA1, а лишь о возможности его синтеза в организме кролика, что вполне допустимо в условиях дисбиоза и нарушения иммунитета слизистых оболочек. Ранее описаны модели на крысах и мышах, на которых удавалось воспроизводить признаки IgAN, например, синтез галактозо-дефицитных IgA, их депозицию в мезангиуме и характерное поражение гломерул. Следует указать на модели на крысах [26], в том числе с помощью вируса парагриппа [12]. Были созданы эффективные модели на мышах, в которых процесс определялся синтезом дефектных по галактозилированию IgA [17, 24]. Мышиная модель позволила сделать два важных вывода — первый рассматривает разную чувствительность животных к развитию IgAN, как результат генетической гетерогенности используемых в опыте мышей, а второй — касается участия мышинового Igh-2^a аллотипа IgA в абберантном гликозилировании и генезе IgAN. Именно на мышинной модели в последние годы были показаны механизмы формирования IgA-содержащих комплексов и их отложения в мезангиуме. Речь идет о соучастии в этих реакциях ряда компонентов: аномального IgA, растворимого CD89 (Fc α R), рецептора трансферрина и фермента трансглутаминазы [3, 4].

Представляет интерес ряд работ, в значительной мере связанных с патологией в области лимфоидной ткани глотки и гортани человека. Авторы обнаружили наличие дефектных IgA1 не только в сыворотке, но и, что важно, в тонзиллярных лимфоцитах [2]. При этом они рассматривают этот феномен как эффект переключения синтеза с IgD на дефектный IgA1 и допускают, что он является мукозальной формой IgA1. Показано, что мононуклеарные клетки тонзилл, выделенные от больных IgAN, активно продуцируют IgA1 после их стимулирования взвесью клеток СГА [14].

Сопоставляя полученные в работе результаты с обширными данными литературы и предыдущих наших исследований, мы полагаем, что имеется достаточно оснований считать, что вызываемая СГА патология почек может изучаться на моделях, сопоставимых с PSGN и IgAN человека. Первый процесс инициируется IgG Fc-рецепторными белками, а второй – IgA FcR-белками микроба. Каждый из них имеет свои отличительные особенности, которые, по-видимому, должны лучше проявляться в дебюте, поскольку в последующем развитии они оба приводят к почечной недостаточности. PSGN

известен как мембранозно-пролиферативный процесс, вызванный первичным отложением комплексов в капсуле гломерул, между тем как IgAN описывают как мезангиально-пролиферативный процесс, обусловленный отложениями в клетках мезангиума.

Принципиально важным в исследованиях является то, что полученные данные указывают на успешное моделирование отдельных признаков IgAN, и расширяют наши представления о патогенных свойствах и функциях Ig FcR рецепторных M-белков *Streptococcus pyogenes*, играющих важную роль в распространенной почечной патологии.

Список литературы / References

1. Нефрология (Руководство для врачей) под редакцией И.Е.Тареевой. М.: Медицина, 1995. В 2-х томах. [Nephrology (A guide for physicians in 2 volumes. (Editor I.E.Tareeva)]. Moscow: Meditsina, 1995.
2. Barratt J., Smith A.C., Feehally J. The pathogenic role of IgA1 O-linked glycosylation in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Nephrology (Carlton)*, 2007, Vol. 12, no. 3, pp. 275-284.
3. Berthelot L., Papista C., Maciel T.T., Biarnes-Pelicot M., Tissandie E., Wang P.H., Tamouza H., Jamin A., Bex-Coudrat J., Gestin A., Boumediene A., Arcos-Fajardo M., England P., Pillebout E., Walker F., Daugas E., Vrtošnik F., Flamant M., Benhamou M., Cogné M., Moura I.C., Monteiro R.C. Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *J. Exp. Med.*, 2012, Vol. 209, no. 4, pp. 793-806.
4. Berthelot L., Monteiro R.C. Formation of IgA deposits in Berger's disease: what we learned from animal models. *Biol. Aujourd'hui*, 2013, Vol. 207, no. 4, pp. 241-247.
5. Boyd J.K., Cheung C.K., Molyneux K., Feehally J., Barratt J. An update on the pathogenesis and treatment of IgA nephropathy. *Kidney International*, 2012, Vol. 81, pp. 833-843.
6. Burova L., Thern A., Pigarevsky P., Seliverstova V., Gavrilo E., Nagornev V., Schalen C., Totolian A. Role of group A streptococcal IgG-binding protein in triggering experimental glomerulonephritis in the rabbit. *APMIS*, 2003, Vol. 111, pp. 955-962.
7. Burova L., Pigarevsky P., Seliverstova 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.
8. Collan Y. Morphometry in pathology: another look at diagnostic histopathology. *Pathol. Res. Pract.*, 1984, Vol. 1, pp. 189-192.
9. Coppo R. The pathogenetic potential of environmental antigens in IgA nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.*, 1988, Vol. 12, no. 5, pp. 420-424.
10. Coppo R. The intestine-renal connection in IgA nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2015, Vol. 30, no. 3, pp. 360-366.
11. Hashimoto A., Suzuki Y., Suzuki H., Ohsawa I., Brown R., Hall S., Tanaka Y., Novak J., Ohi H., Tomino H. Determination of severity of murine IgA nephropathy by glomerular complement activation by aberrantly glycosylated IgA and immune complexes. *Am. J. Pathol.*, 2012, Vol. 181, no. 4, pp. 1338-1347.
12. Jessen R.H., Emancipator S.N., Jacobs G.H., Nedrud J.G. Experimental IgA-IgG nephropathy induced by a viral respiratory pathogen. Dependence on antigen form and immune status. *Lab. Invest.*, 1992, Vol. 67, no. 3, pp. 379-386.
13. 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 anti-glomerular basement membrane antibody administration in WKY rats. *International Immunology*, 2004, Vol. 16, no. 5, pp. 625-634.
14. Liu H., Peng Y., Liu F., Xiao W., Zhang Y., Li W. Expression of IgA class switching gene in tonsillar mononuclear cells in patients with IgA nephropathy. *Inflamm Res.*, 2011, Vol. 60, no. 9, pp. 869-878.
15. Meng H., Ohtake H., Ishida A., Ohta N., Kakehata S., Yamakawa M. IgA production and tonsillar focal infection in IgA nephropathy. *J. Clin. Exp. Hematop.*, 2012, Vol. 52, no. 3, pp. 161-170.
16. Nakata J., Suzuki Y., Suzuki H., Sato D., Kano T., Yanagawa H., Matsuzaki K., Horikoshi S., Novak J., Tomino Y. Changes in nephritogenic serum galactose-deficient IgA1 in IgA nephropathy following tonsillectomy and steroid therapy. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 2, e89707.
17. 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.

18. Piccolo M., De Angelis M., Lauriero G., Montemurno E., Di Cagno R., Gobbetti M. Salivary Microbiota associated with immunoglobulin A. *Nephropathy. Microb. Ecol.*, 2015, Vol. 70, no. 2, pp. 557-565.
19. Schmitt R., Carlsson F., Mörgelin M., Tati R., Lindahl G., Karpman D. Tissue deposits of IgA-binding streptococcal M proteins in IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura. *Am. J. Pathol.*, 2010, Vol. 176, no. 2, pp. 608-618.
20. Schmitt R., Ståhl A., Olin A., Kristoffersson A.-C., Rebetz A., 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. 193, no. 1, pp. 317-326.
21. 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. *Molecular Microbiology*, 1992, Vol. 6, no. 9, pp. 1185-1194.
22. Suzuki H., Run Fan, Zhixin Zhang, Brown R., Hall S., Bruce A.J., Chatham W.W., Suzuki Y., Wyatt R.J., Moldoveanu Z., Lee J.Y., Robinson J., Tomana M., Tomino Y., Mestecky J., Novak J. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *J. Clin. Invest.*, 2009, Vol. 119, no. 6, pp. 1668-1677.
23. Suzuki H., Kiryluk K., Novak J., Moldoveanu Z., Herr A.B., Renfrow M.B., Wyatt R.J., Scolari F., Mestecky J., Gharavi A.G., Bruce A.J. The pathophysiology of IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2011, Vol. 22, pp. 1795-1803.
24. Suzuki H., Suzuki Y., Novak J., Tomino Y. Development of animal models of human IgA nephropathy. *Drug Discov. Today Dis. Models*, 2014, Vol. 11, pp. 5-11.
25. Tanaka M., Seki G., Someya T., Nagata M., Fujita T. Aberrantly glycosylated IgA1 as a factor in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Clin. Dev. Immunol.*, 2011, Vol. 2011, ID 470803.
26. Tian J., Wang Y., Zhou X., Li Y., Wang C., Li J., Li R. Rapamycin slows IgA nephropathy progression in the rat. *Am. J. Nephrol.*, 2014, Vol. 39, no. 3, pp. 218-229.
27. Tomana M., Matousovic K., Julian B.A., Radl J., Konecny K., Mestecky J. Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney Int.*, 1997, Vol. 52, no. 2, pp. 509-516.
28. Wyatt R.J., Bruce A.J. IgA Nephropathy. *N. Engl. J. Med.*, 2013, Vol. 368, pp. 202-214.

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

Дуплик Н.В. — к.б.н., научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Шален Клаас — д.м.н., сотрудник отдела медицинской микробиологии Лундского Университета, Лунд, Швеция

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 Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Pigarevsky P.V., PhD (Biology), Head, Department of General Morphology Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Snegova V.A., Research Associate, Department of General Morphology Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Duplik N.V., PhD (Biology), Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Schalen Klaas, PhD, MD (Medicine), Department of Medical Microbiology, Lund University, Lund, Sweden

Totolian Artem A., PhD, MD (Medicine), Academician, Russian Academy of Sciences, Main Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 20.12.2015
Отправлена на доработку 15.01.2016
Принята к печати 20.01.2016

Received 20.12.2015
Revision received 15.01.2016
Accepted 20.01.2016