

# СПОСОБНОСТЬ ЧИСТЫХ IgG Fc-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ СТРЕПТОКОККА ГРУППЫ А ТИПА M22 ИНДУЦИРОВАТЬ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ

Бурова Л.А.<sup>1</sup>, Гупалова Т.В.<sup>1</sup>, Пигаревский П.В.<sup>1</sup>,  
Гаврилова Е.А.<sup>1</sup>, Селиверстова В.Г.<sup>1</sup>, Шален К.<sup>2</sup>,  
Тотолян Артем А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Отдел лабораторной медицины Лундского Университета, Лунд, Швеция

**Резюме.** В настоящей работе очищенные стрептококковые IgG Fc-связывающие белки, выделенные из родительского штамма M22 и его изогенных мутантов, дефицитных по синтезу одного из этих белков (Mgp или Emm), изучали на нефритогенность при двукратном внутривенном введении с неполным адьювантом Фрейнда и последующем внутривенном бустировании через 2 недели. У кроликов, получивших чистые IgG Fc-связывающие белки, выявлены высокие титры анти-IgG, деструктивно-дегенеративные изменения почечных клубочков и продукция провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и IL-6) мезангиальными и эндотелиальными клетками клубочков. Инъекции кроликам по аналогичной схеме протеинов А и G вызывали образование анти-IgG в крайне низких титрах и ни у одного из кроликов не выявлено признаков мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита, близкого по морфологии с острым гломерулонефритом человека, осложняющим острую стрептококковую инфекцию. Эти результаты коррелировали с данными, полученными в опытах с введением цельных клеток *Staphylococcus aureus* (штамм Cowan 1) или стрептококков группы G (штамм G148). Оба указанных вида микробов известны как носители IgG Fc-связывающих белков – протеинов А и G соответственно. Полученные данные указывают на уникальную способность стрептококков группы А и их IgG Fc-связывающих белков индуцировать развитие гломерулонефрита, т.е. выступать в роли этиологического фактора острого гломерулонефрита человека. Приведенные в статье данные позволяют заключить, что стрептококковые IgG Fc-связывающие М-подобные белки, относящиеся к факторам патогенности микроба, играют ведущую роль в инициации экспериментального гломерулонефрита. Полученные результаты подтверждают ранее выдвинутое нами положение о роли IgG Fc-связывающих М-подобных белков стрептококка группы А в патогенезе острого экспериментального гломерулонефрита, аналогичного по морфологической картине острому постстрептококковому гломерулонефриту у человека.

**Ключевые слова:** стрептококк группы А типа M22, изогенные мутанты, очищенные IgG Fc-связывающие белки, экспериментальный гломерулонефрит.

## Адрес для переписки:

Бурова Лариса Александровна,  
НИИЭМ СЗО РАМН,  
отдел молекулярной микробиологии  
197376, Санкт-Петербург,  
ул. Академика Павлова, 12.  
Тел.: (812) 234-68-74.  
Факс: (812) 234-94-77.  
E-mail: lburova@yandex.ru

Burova L.A., Pigarevsky P.V., Gavrilova E.A.,  
Seliverstova V.G., Schalen K., Totolyan Artem A.

PURIFIED IgG Fc-BINDING PROTEINS  
FROM M22 GROUP A STREPTOCOCCUS  
ARE ABLE TO INDUCE EXPERIMENTAL  
GLOMERULONEPHRITIS

**Abstract.** Pathogenesis of acute post-streptococcal glomerulonephritis (APSGN), a major complication of group A streptococcal (GAS) throat or skin disease,

remains unclear. Over years, various theories were based on distinct streptococcal extracellular factors, as well as immunological mimicry of streptococci for renal tissue antigens was considered. Previously we reported that a lot of clinical GAS isolates with proven nephritogenic ability show a non-immune binding of monomeric or aggregated IgG. Moreover, using a rabbit model of APSGN, we obtained evidence for important causative role of streptococcal IgG Fc-binding proteins (IgG FcBPs) belonging to the M family surface proteins. I.e., rabbits injected by whole IgG FcBP-positive streptococci showed induction of renal glomerular changes, with deposition of IgG and complement C3, resembling the picture recorded in human APSGN. These typical renal changes were always preceded by development of circulating anti-IgG antibodies. Present study was performed in the same rabbit model. Both purified IgG FcBPs isolated from type M22 GAS were found to elicit glomerular degenerative damage of renal glomeruli comparable to those caused by whole bacteria, as well as induce anti-IgG antibodies, deposition of IgG and C3 complement and production of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6) by glomerular mesangial and endothelial cells. By contrast, rabbits injected with proteins A or G, IgG FcBPs of *S. aureus* and group G streptococci, respectively, exhibited only low levels of circulating anti-IgG and reversible glomerular changes. In these settings, we have not observed any features of membranous-proliferative glomerulonephritis (GN) resembling morphological traits of acute post-streptococcal GN in humans. These data correlated with results obtained after injection of intact *Staphylococcus aureus* (Cowan 1 strain) or group G streptococci (G148 strain). Both microbial types are known to harbor IgG Fc-binding proteins (A and G, respectively). These results support the idea that GAS IgG FcBPs are unique in their ability to initiate strong post-streptococcal glomerular changes and could be considered as important factors in pathogenesis of APSGN similar to acute post-streptococcal GN in humans. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 4-5, pp 383-390)

*Keywords:* M22 group A streptococcus, isogenic mutants, purified IgG Fc-binding proteins, experimental glomerulonephritis.

## Введение

*Streptococcus pyogenes* (стрептококк группы А, СГА) относится к числу наиболее распространенных и патогенных микробов человека. Обладая политропностью, он вызывает широкий круг локальных, системных и генерализованных форм инфекционной патологии. Острая инфекция в случае поздней и неадекватной антибиотикотерапии нередко приводит к серьезным осложнениям: острому гломерулонефриту, ревматической лихорадке или ревматическому поражению сердца. Острый гломерулонефрит (APSGN) развивается, как правило, после перенесенной инфекции, вызванной СГА, в редких случаях стрептококками групп С и G [7, 16]. Механизмы указанных осложнений все еще недостаточно изучены [17, 32, 34]. Установлено, что нефритогенная потенция преимущественно характерна для штаммов M серотипов M1, M2, M4, M12, M25, M49, M55, M57, в то время как ревматогенная активность присуща в основном другим типам (M1, M3, M5, M6, M18, M19, M24) [16, 25, 32, 39]. Большинство исследователей считает такое разделение условным, поскольку один и тот же M тип (например, M1) может приводить как к острому гломерулонефриту, так и к ревматическому поражению сердца. Этиологическим фактором этих нозологических форм могут служить и СГА других M типов, не вошедшие в данный перечень.

На сегодня в науке бытует представление, согласно которому роль фактора, инициирующего указанные осложнения, играют перекрестно-реагирующие антигены микроба и тканей хозяина, которые представлены гомологичными или сходными аминокислотными последовательностями белковых эпитопов на внутренних и поверхност-

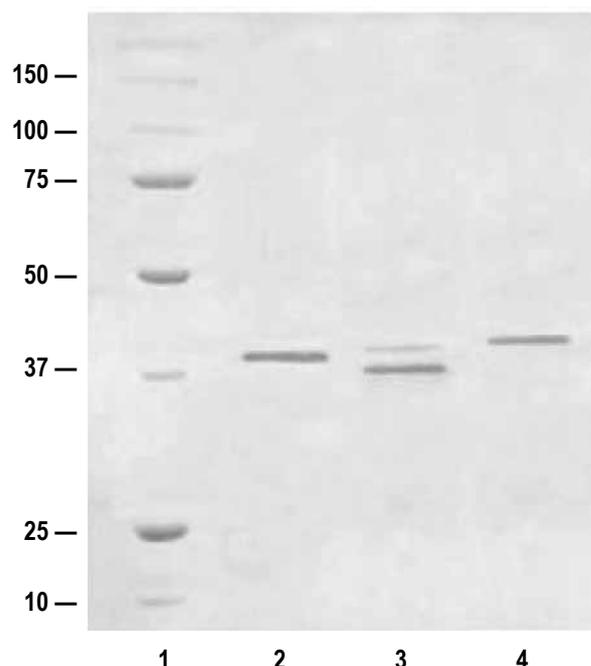
ных структурах клеток-участников процесса [16, 26]. Согласно этой версии антигенная «мимикрия» между «партнерами» процесса повреждает ткани за счет аутоиммунного механизма, приводящего к иммунопатологическому процессу в конкретном органе. Наличие перекрестно-реагирующих антигенов и их участие в патологическом процессе не должно ставиться под сомнение. Однако механизм инициации иммунопатологического процесса остается малопонятным, если в ткани отсутствуют необходимые для этого условия, а именно, если не нарушен ее гомеостаз. Многочисленные данные эксперимента и клиники относительно генеза APSGN не позволяют определить факторы инициации осложнения. По данным литературы, повреждения могут формироваться под действием продуктов СГА (пирогенного экзотоксина В или цистеиновой протеиназы и стрептокиназы) и специфических антител к ним [6, 15, 24, 30, 34, 40, 45], а также возникающему по неизвестным механизмам дисбалансу иммуноглобулинов G и действию циркулирующих иммунных комплексов [27, 31, 33, 37, 38, 43, 44]. Вряд ли перечисленные факторы в своем большинстве могут быть отнесены к факторам, инициирующим процесс в почечной ткани.

В 1973 г. была описана способность СГА немунно связывать иммуноглобулины G млекопитающих за счет рецепторных структур бактерий, так называемых IgG Fc-связывающих белков [23]. Взаимодействие происходит между Fc-связывающим белком микроба и комплементарным участком C $\gamma$ 2 – C $\gamma$ 3 доменов Fc-фрагмента IgG [35, 36]. Этим качеством обладают разные типы СГА, но главным образом OF-позитивные, «нефритогенные» и «кожные» штаммы, относящиеся к M типам класса II, и в меньшей степени

OF-негативные, «ревматогенные» и «глочные» штаммы, принадлежащие к М типам класса I. Белки, ответственные за функцию Fc-связывания, относят к семейству М и М-подобных белков – основных факторов патогенности СГА, кодируемых *emm* и *ficr* генами *mga*-регулона [20]. Эти белки повышают вирулентность микроба за счет истощения системы комплемента, подавления фагоцитоза и индукции провоспалительных цитокинов [14, 18]. Иммунизация кроликов IgG Fc-позитивными штаммами значительно усиливает синтез анти-IgG-антител, специфичных в отношении IgG кролика и человека. Эффект повышения концентрации IgG наблюдается и у пациентов с острыми стрептококковыми инфекциями. Помимо IgG, белки М семейства могут связывать и другие белки плазмы крови: фибронектин, фибриноген, плазминоген, альбумин, IgA и компоненты комплемента [16, 19, 21]. Взаимодействие стрептококков с таким широким кругом белков крови не может пройти для организма-хозяина бесследно. Одним из важных последствий служит накопление анти-IgG-антител, приводящее к формированию в высокой концентрации циркулирующих иммунных комплексов типа IgG – анти-IgG [8, 9].

Эти обстоятельства и ряд данных литературы стали основой для выдвинутой нами гипотезы о механизмах развития постстрептококкового гломерулонефрита [1, 2, 3, 4, 10, 11, 12]. Суть ее состоит в следующем: инфицировавшие млекопитающего вирулентные штаммы СГА связывают молекулы IgG крови, которые в результате взаимодействия с Fc-рецепторами изменяют структуру, приобретая аутоантигенные свойства. В ответ на это в организме происходит синтез иммуноглобулина G и накопление антител не только к антигенам СГА, но и анти-IgG-аутоантител к «собственным» IgG. Последние образуют циркулирующие иммунные комплексы IgG – анти-IgG, которые накапливаясь в крови, «ищут выход» через почечный барьер и при этом формируют очаговые отложения за счет взаимодействия с тканевыми IgG Fc $\gamma$ -рецепторами. Локальные отложения IgG связывают различные фракции комплемента (например, C3), вызывают инфильтрацию гломерул фагоцитами и вызывают продукцию провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ), что завершается формированием выраженных очагов иммунного воспаления в почечной ткани с вовлечением в процесс структур гломерул (базальная мембрана, подоциты, мезангиум, эндотелий сосудов) и проксимальных канальцев с последующим развитием гломерулонефрита.

Наши опыты с использованием СГА М типов 1, 12, 15 и 22 подтвердили справедливость выдвинутой гипотезы и показали, что за формированием иммунного воспаления в клубочковых структурах происходят дегенеративные и деструктивные, а также атрофические и пролиферативные процессы, приводящие к мембранозно-пролиферативному и фибропластическому



**Рисунок 1. SDS-электрофорез в полиакриламидном геле очищенных IgG Fc-связывающих белков, выделенных из стрептококков группы A типа M22 (окрашивание Coomassie blue)**

#### Примечание.

Линия 1 – маркеры молекулярного веса в kDa;  
Линия 2 – Emm белок, выделенный из изогенного мутанта AL168 *emm+mrp-*;  
Линия 3 – Emm и Mgp белки, выделенные из исходного штамма AL168 стрептококка типа M22;  
Линия 4 – Mgp белок, выделенный из изогенного мутанта AL168 *emm-mrp+*.

гломерулонефритам, характерным для постстрептококкового гломерулонефрита у человека [11]. Использование в экспериментах изогенных мутантных штаммов СГА типа M22, лишенных генов, кодирующих синтез одного или двух (Mgp и Emm) IgG Fc-связывающих белков, подтвердило их важную роль в индукции экспериментального гломерулонефрита [12, 13].

В настоящем исследовании была изучена способность очищенных IgG Fc-связывающих белков, выделенных из СГА типа M22 (AL168 *emm+mrp+*) и двух его изогенных мутантов (AL168 *emm+mrp-* и AL168 *emm-mrp+*), вызывать упомянутые патологические изменения в почечной ткани кроликов. В качестве контроля использовали препараты протеина А и протеина G, являющиеся очищенными IgG Fc-связывающими белками *Staphylococcus aureus* и стрептококка группы G соответственно.

## Материалы методы

### Бактериальные штаммы и IgG Fc-связывающие белки

Использованы следующие штаммы стрептококков группы A (СГА) типа M22: исходный

штамм AL168 *mpr+*, *emm+*, положительный по экспрессии IgG Fc-связывающих белков Mpr и Emm, а также мутантные штаммы AL168 *mpr-emt+* и AL168 *emt- mpr+*, дефицитные по экспрессии одного из белков Mpr или Emm соответственно. Штаммы были предоставлены д-рами G. Lindahl и A. Thern (Лундский университет, Швеция) [41].

IgG Fc-связывающие белки выделяли из ультразвуковых дезинтеграторов микробных клеток и очищали путем последующей аффинной хроматографии соответствующих супернатантов на колонке Sepharose 6FF, содержащей конъюгированный с ней поликлональный IgG человека (рис. 1). Протеин А получен из НИИЭМ им. Пастера (Санкт-Петербург). Рекомбинантный протеин G выделяли из штамма-продуцента *E. coli*, созданного в Отделе молекулярной микробиологии НИИЭМ СЗО РАМН (Санкт-Петербург) [42].

### Иммунизация кроликов

Чистые IgG Fc-связывающие белки в концентрации 0,35 мг эмульгировали в равном объеме неполного адьюванта Freund и вводили кроликам внутривенно два раза с интервалом в три недели. Две недели спустя то же количество белков, но без адьюванта вводили внутривенно. Кроликов обескровливали через 14 дней после последней инъекции; изъятые почки были подвергнуты иммуно-морфологическому и электронно-микроскопическому исследованию.

### Определение анти-IgG

Уровень анти-IgG в сыворотках животных определяли в реакции пассивной геммагглютинации (РПГА) с эритроцитами человека (группа 0, Rh+), сенсibilизированными анти-резусной (анти-Rh) сывороткой [8]. Постановка РПГА сводилась к следующему: свежие эритроциты человека обрабатывали анти-Rh сывороткой в разведение 1:15 в PBS в течение 90 минут при 37 °С. Наибольшее разведение исследуемых сывороток, вызывающее агглютинацию 1% сенсibilизированных эритроцитов, принимали за титр анти-IgG при отрицательной реакции с несенсibilизированными эритроцитами человека. По-

лиспецифическую анти-Rh сыворотку получали от д-ра Grubb R. (Лундский университет, Швеция), а также из Центра по изосеродиагностике (Нижний Новгород, Россия).

### Иммуно-морфологическое и электронно-микроскопическое исследование тканей

#### Иммуногистохимический метод

Для иммуно-морфологического анализа использовали фиксированные в 4% параформальдегиде (в течение 12 часов) и депарафинированные тканевые срезы, на которые наносили соответствующие антитела (к IgG, C3 компоненту комплемента и к цитокинам) в разведении 1:50 в 0,01М фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали 1 час при комнатной температуре. После отмывания в PBS тканевые срезы вновь инкубировали 1 час с так называемыми «вторыми» антителами, мечеными пероксидазой хрена. В качестве субстрата применяли 0,05% диаминобензидин-тетрагидрохлорид и 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (в течение 20 минут); затем срезы промывали в дистиллированной воде и заключали в глицерин-желатину.

Депозиция кроличьего IgG в тканях выявлялась при обработке тканевых срезов козьими моноспецифическими антителами к IgG кролика и последующей обработке срезов антителами к козьему IgG, мечеными пероксидазой.

Депозицию C3 компонента комплемента определяли при обработке тканевых срезов кроличьей сывороткой к C3 человека (перекрестно реагирующей с C3 кролика) и последующей обработке моноспецифической антисывороткой к кроличьему IgG, меченой пероксидазой.

Для определения цитокинов в тканях срезы обрабатывали поликлональными мышинными антителами к IL-1β кролика, поликлональными козьими антителами к IL-6 человека и поликлональными козьими антителами к TNFα кролика соответственно. «Вторыми» антителами служили антимишинный IgG либо антикозий IgG, меченые пероксидазой хрена.

Для окрашивания тканевых срезов использовали гематоксилин-эозин. Срезы анализировали

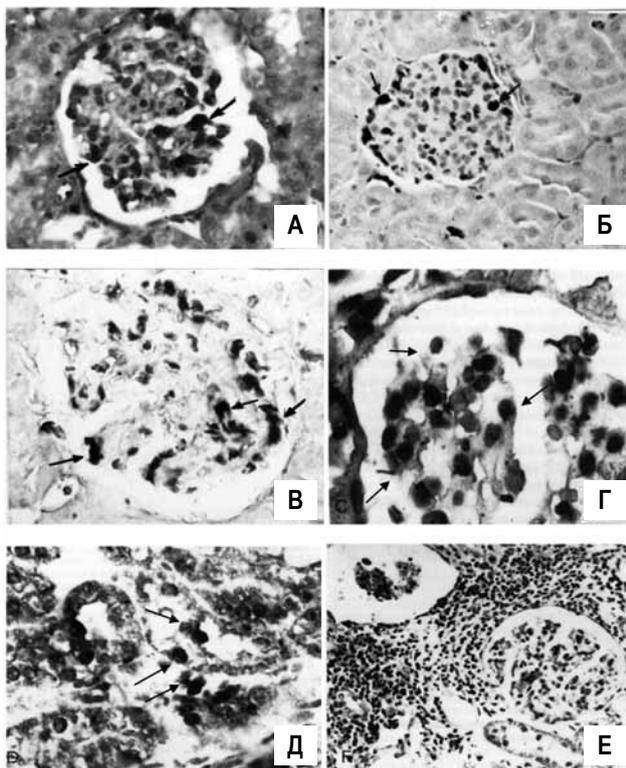
**ТАБЛИЦА 1. РАЗВИТИЕ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА У КРОЛИКОВ, ИНЪЕЦИРОВАННЫХ ОЧИЩЕННЫМИ IgG Fc-СВЯЗЫВАЮЩИМИ БЕЛКАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ СГА ТИПА M22, ИСХОДНОГО ШТАММА И ЕГО ИЗОГЕННЫХ МУТАНТОВ, ДЕФИЦИТНЫХ ПО ОДНОМУ ИЗ ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ЭКСПРЕССИЮ IgG Fc-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ**

Белковые препараты, вводимые кроликам	Пропорция кроликов с поражением почек	Титры анти-IgG	Депозиты*		Продукция*		
			IgG	C3	IL-1β	IL-6	TNFα
Протеин А**	0/3	10-20	-	-	-	-	-
Протеин G***	0/3	10-40	-	-	-	-	-
Протеины Mpr и Emm	3/3	160-320	+	+	+	+	+
Протеин Mpr	2/4	40-80	+	+	+	+	+
Протеин Emm	2/3	40-80	+	+	+	+	+

**Примечание.** \* – депозиция IgG, C3 и продукция цитокинов IL-1β, IL-6 и TNFα наблюдались только у кроликов с выраженными гистопатологическими изменениями в почечной ткани.

\*\* – протеин А, выделенный из *Staphylococcus aureus*.

\*\*\* – протеин G, выделенный из рекомбинантного штамма-продуцента *E. coli*.



**Рисунок 2.** Депозиция IgG и C3 компонента комплемента в почечной ткани, продукция провоспалительных цитокинов мезангиальными клетками и патологические изменения в клубочках у кроликов после введения очищенных IgG Fc-связывающих белков, выделенных из стрептококка группы A типа M22 штамма AL168

**Примечание.** Депозиция IgG на базальной мембране почечного клубочка (А), х 850;

Депозиция C3 в интерстициальных зонах клубочка (Д), х850;

Экспрессия мезангиальными клетками TNF $\alpha$  (Б), х650; IL-6 (В), х850 и IL-1 $\beta$  (Г), х (850).

Склероз и атрофия почечных капилляров (Е), х450, окрашивание гематоксилин-эозином.

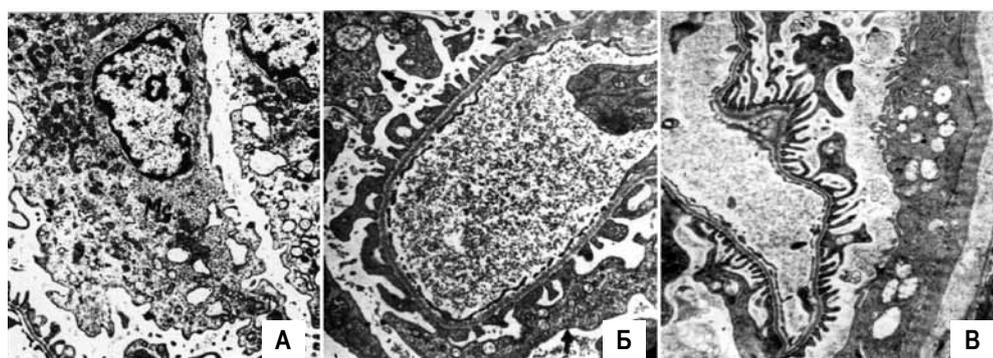
в микроскопе Axiomat (Opton) при увеличениях от 100 до 1100.

Подготовку тканевых срезов к *трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ)* проводили согласно рекомендациям М.В. Угрюмова [5]. Тканевые срезы анализировали с помощью электронного микроскопа JEM 100В при 75  $\mu$ V.

Морфологическое исследование каждого тканевого образца включало несколько этапов. С целью оценки степени выраженности тканевых изменений образец окрашивали гематоксилин-эозином и просматривали при малом и среднем увеличении (x100-600) в световом микроскопе. Положительными рассматривали образцы, в которых изменения наблюдались во многих полях зрения. Образцы тканей, обработанные соответствующими иммунными сыворотками, исследовали при большем увеличении (x900-1100) для выявления депозитов IgG и C3 компонента, а также провоспалительных цитокинов. Тканевые изменения на субклеточном уровне определяли посредством электронной микроскопии.

## Результаты

Ни у одного из шести кроликов после введения протеинов А или G не было выявлено дегенеративно-деструктивных изменений в почечной ткани, характерных для стрептококкового гломерулонефрита (табл. 1). Напротив, у всех кроликов, обработанных IgG Fc-связывающими белками, выделенными из исходного штамма AL168, отмечались выраженные изменения в базальной мембране и в межкапиллярных структурах гломерул, характеризовавшиеся локальным утолщением базальной мембраны и выраженной пролиферацией мезангиальных клеток. Они оказались сопоставимыми с ранее наблюдаемыми изменениями, которые отмечались при моделировании гломерулонефрита цельными клетками СГА и расценивались как мембранозно-пролиферативный гломеруло-



**Рисунок 3.** Морфологические изменения в почечной ткани кроликов, после введения очищенных IgG Fc-связывающих белков, выделенных из *emt+mgr-* (А) или *emt+mgr+* (Б) изогенных мутантов стрептококка группы А типа M22 штамма AL168. ТЭМ

**Примечание.** Деструктивно-дегенеративные изменения подоцитов и пролиферация мезангиальных клеток (А), х24000.

Утолщение базальной мембраны клубочка и гипертрофия подоцитов (Б), х32000.

Почечная ткань от нормального кролика (В), х28000.

нерит [11, 12]. Сходная картина была выявлена у двух из трех кроликов, инъецированных IgG Fc-связывающим белком из AL168 *emm+mrp*-мутанта и у двух из четырех животных, которым вводили очищенный IgG Fc-связывающий белок из AL168 *emm-mrp+* штамма (рис. 2 и 3).

У 7 из 10 кроликов, инъецированных очищенными IgG Fc-связывающими белками, выделенными из родительского штамма AL168 или его изогенных мутантов, наблюдалась выраженная депозиция IgG и C3 на базальной мембране. У этих же кроликов в структуре гломерул отмечалась продукция TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 цитокинов мезангиальными и эндотелиальными клетками (рис. 2). Ни у одного из шести кроликов, которым вводили протеины А или G, не обнаруживали депозицию IgG, C3 или экспрессию цитокинов (табл. 1).

К концу обработки животных IgG Fc-связывающими белками в сыворотках 7 из 10 кроликов были выявлены циркулирующие анти-IgG с титрами 1:40-1:320. В сыворотках кроликов, инъецированных протеином А или протеином G титры циркулирующих анти-IgG колебались в пределах 1:20-1:40. При этом отмечалась высокая корреляция между уровнем циркулирующих анти-IgG и степенью дегенеративных изменений в почечной ткани кроликов (табл. 1).

## Обсуждение

Результаты работы являются доказательством патогенетической роли IgG Fc-связывающих белков СГА в инициации гломерулонефрита у кроликов, что предполагалось нами ранее при моделировании процесса цельными бактериальными клетками [11, 12]. Так, все IgG Fc-позитивные штаммы, в отличие от негативных, использованных в предшествующих экспериментах, индуцировали патологический процесс в почечной ткани кроликов. Также ранее было показано, что родительский штамм СГА типа M22 (AL168) и его изогенные мутанты, дефектные по одному из генов, ответственных за экспрессию Mgp либо Emm белка, были способны индуцировать сходные деструктивные почечные изменения у кроликов [12]. Между тем как двойной изогенный мутант, полностью лишенный продукции IgG Fc-связывающих белков, не обладал нефритогенной потенцией при попытке моделировать гломерулонефрит у экспериментальных животных [12], что послужило первым генетическим доказательством роли IgG Fc-связывающих белков СГА в инициации гломерулонефрита на кроличьей модели.

В настоящей работе очищенные стрептококковые IgG Fc-связывающие белки, выделенные из родительского штамма M22 (Al 168) и его изогенных мутантов, дефицитных по синтезу одного из белков (Mgp или Emm), изучали на их нефритогенную потенцию при двухкратном внутрикожном введении и внутривенном бустировании через две недели. У кроликов, получивших чистые IgG Fc-связывающие белки, были вы-

явлены высокие титры анти-IgG и выраженные деструктивно-дегенеративные изменения в почечных клубочках. У этих же кроликов отмечена продукция провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и IL-6) мезангиальными и эндотелиальными клетками. В то же время введение кроликам по аналогичной схеме протеинов А или G вызывало образование анти-IgG в низких титрах и ни у одного из кроликов не было отмечено признаков мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита, что однозначно коррелировало с ранее полученными данными в опытах с цельными клетками *S. aureus* (штамм Cowan 1) или стрептококка группы G (штамм G148). Оба указанных вида микробов известны как продуценты соответствующих IgG Fc-связывающих белков. Известно, что они отличаются друг от друга и от IgG Fc-связывающих белков СГА способностью связывать IgG различных видов млекопитающих, хотя взаимодействуют с одной и той же областью Fc-фрагмента молекулы IgG [23, 36]. Эти данные указывают на тонкие различия в структуре IgG Fc-связывающих белков микроорганизмов и на уникальную способность именно стрептококков группы А индуцировать продукцию анти-IgG и развитие гломерулонефрита, в то время как, к примеру, стрептококки группы G редко выступают в роли этиологического фактора гломерулонефрита у человека.

Патогенез острого постстрептококкового гломерулонефрита (APSGN) является предметом большого числа многолетних исследований. Признанной является иммунокомплексная природа заболевания, однако циркулирующие иммунные комплексы, как правило, не обнаруживаются у пациентов [27, 44] в отличие от депозитов IgG и C3 компонента комплемента [38].

Наличие перекрестно-реагирующих антигенов между компонентами стрептококковой клетки и тканевыми структурами почки и их участие в иммунопатологическом процессе, развивающимся при постстрептококковом гломерулонефрите, вряд ли можно ставить под сомнение. Хотя такая структурная идентичность выявлена только у M белка стрептококка типа M12 и у виментина, выделенного из мезангиальных клеток почечного клубочка [22]. Также отсутствуют прямые экспериментальные доказательства патогенетической роли такой мимикрии в генезе постстрептококкового гломерулонефрита.

Остается невыясненной и роль пирогенного экзотоксина В (SpeB) в индукции постстрептококкового гломерулонефрита, поскольку данный энзим-токсин продуцируется большинством известных на сегодня M типов стрептококков группы А [6 15, 24, 34], но не группы С или G, с которыми, хотя и крайне редко, связывают развитие гломерулонефрита. Некоторые авторы связывают развитие у мышей гломерулонефрита с другим экстрацеллюлярным фактором патогенности стрептококков группы А — стрептокиназой [28, 29]. Однако следует отметить, что стрептокиназа активна только в отношении плазминогена че-

ловека и кролика, но не активирует плазминоген мыши и его переход в плазмин, который способен активировать систему комплемента и тем самым способствовать развитию патологических процессов [29].

Ранее мы предположили, что IgG Fc-связывающие M-подобные белки СГА способны индуцировать экспериментальный гломерулонефрит [1, 2, 3, 4, 11, 12]. Было показано, что IgG Fc-связывающие белки являются индукторами, способными вызывать продукцию анти-IgG [9]. Анти-IgG и циркулирующие иммунные комплексы IgG-анти-IgG либо агрегированные IgG должны обладать способностью откладываться на базальной мембране клубочка, приводя в конечном итоге к иммунному воспалению и, как следствие, — к деструктивно-дегенеративным изменениям в клубочках.

Нами было также показано, что введение кроликам препаратов Fc-фрагментов гомологичного и аутологичного иммуноглобулина G на начальных этапах изменений в клубочках предупреждает развитие у них стрептококкового гломерулонефрита. Эти данные указывают на возможность использования Fc-фрагментов IgG для профилактики постстрептококкового гломерулонефрита [13].

Представленные в данной статье материалы позволяют сделать заключение, что IgG Fc-связывающие белки, относящиеся к факторам патогенности СГА, играют ведущую роль в инициации экспериментального гломерулонефрита, аналогичного APSGN человека. Полученные результаты с использованием чистых IgG Fc-связывающих M-подобных белков стрептококков группы А полностью подтвердили ранее выдвинутую нами гипотезу об иницирующей роли этих белков в патогенезе постстрептококкового гломерулонефрита (APSGN), нередко осложняющего течение острой стрептококковой инфекции, особенно у детей и подростков.

## Благодарности

Исследования были поддержаны грантом РФФИ 07-04-00472.

## Список литературы

1. 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 // Мед. иммунол. — 2006. — Т. 8. — № 5-6. — С. 623-630.
2. Тотолян Артем А., Бурова Л.А. Критический анализ предполагаемых механизмов патогенеза постстрептококкового гломерулонефрита // Клин. микроб. химиотерапия. — 2001. — Т. 3. — № 4. — С. 316-323.
3. Тотолян Артем А., Бурова Л.А., Нагорнев В.А., Пигаревский П.В., Шален К. Сердечно-сосудистые поражения при инфекционных заболеваниях // Вестник РАМН. — 2003. — 12. — С. 56-61.

4. Тотолян А.А., Бурова Л.А., Нагорнев В.А., Пигаревский П.В. Анализ механизмов иммунопатологического постстрептококкового гломерулонефрита (AGN) // Тер. Архив. — 2008. — № 6. — С. 90-95.
5. Угрюмов М.В. Современные методы иммуноцитохимии и гистохимии // Итоги науки и техники. Серия «Морфология человека и животных». — М.: Наука. — 1991. — Т. 15. — 117 с.
6. Batsford S.R., Mezzano S., Mihatsch M., Schiltz E., Rodriguez-Iturbe B. Is the nephritogenic antigen in post-streptococcal glomerulonephritis pyrogenic exotoxin b (spe b) or gapdh? // Kidney Int. — 2005. — 68. — P. 1120-1129.
7. Beres S.B., Sesso R., Pinto S.W., Hoe N.P., Porcella S.F., Deleo F.R., Musser J.M. Genome sequence of a Lancefield group C Streptococcus zooepidemicus strain causing epidemic nephritis: New information about an old disease // PLoS One. — 2008. — 3: e3026.
8. Burova L.A., Christensen P., Grubb R., Schalen C., Svensson M.L., Beltukov P.P., Totolian A.A. Anti-immunoglobulins in experimental streptococcal immunization; relation to bacterial growth conditions and fc-receptors // Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. C. — 1985. — 93. — P. 19-23.
9. Burova L.A., Schalen C., Koroleva I.V., Svensson M.L. Role of group A streptococcal IgG Fc-receptor in induction of anti-IgG by immunization in the rabbit // FEMS Microbiol. Immunol. — 1989. — 1. — P. 443-448.
10. Burova L.A., Koroleva I.V., Ogurtzov R.P., Murashov S.V., Svensson M.L., Schalen C. Role of streptococcal IgG Fc receptor in tissue deposition of IgG in rabbits immunized with Streptococcus pyogenes // APMIS. — 1992. — 100. — P. 567-574.
11. Burova L.A., Nagornev V.A., Pigarevsky P.V., Gladilina M.M., Seliverstova V.G., Schalen C., Totolian A.A. Triggering of renal tissue damage in the rabbit by IgG Fc-receptor-positive group A streptococci // APMIS. — 1998. — 106. — P. 277-287.
12. Burova L., Thern A., Pigarevsky P., Gladilina M., Seliverstova V., Gavrilova E., Nagornev V., Schalen C., Totolian A. Role of group A streptococcal IgG-binding proteins in triggering experimental glomerulonephritis in the rabbit // APMIS. — 2003. — 111. — P. 955-962.
13. 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. — 120. — 3. — P. 221-230.
14. Carlsson F., Berggard K., Stalhammar-Carlalm M., Lindahl G. Evasion of phagocytosis through cooperation between two ligand-binding regions in Streptococcus pyogenes M protein // J. Exp. Med. — 2003. — 198. — P. 1057-1068.
15. Cu G.A., Mezzano S., Bannan J.D., Zabrickie J.B. Immunohistochemical and serological evidence for the role of streptococcal proteinase in acute post-streptococcal glomerulonephritis // Kidney Int. — 1998. — 54. — P. 819-826.
16. Cunningham M.W. Pathogenesis of group A streptococcal infections // Clin. Microbiol. Rev. — 2000. — 13. — P. 470-511.

17. Eison T.M., Ault B.H., Jones D.P., Chesney R.W., Wyatt R.J. Post-streptococcal acute glomerulonephritis in children: Clinical features and pathogenesis // *Pediatr. Nephrol.* – 2011. – 26. – P. 165-180.
18. Fischetti V.A. Streptococcal M protein: Molecular design and biological behavior // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1989. – 2. – P. 285-314.
19. Frick I.M., Akesson P., Cooney J., Sjobring U., Schmidt K.H., Gomi H., Hattori S., Tagawa C., Kishimoto F., Bjorck L. Protein H--a surface protein of *Streptococcus pyogenes* with separate binding sites for IgG and albumin // *Mol. Microbiol.* – 1994. – 12. – P. 143-151.
20. Haanes E.J., Heath D.G., Cleary P.P. Architecture of the vir regulons of group A streptococci parallels opacity factor phenotype and M protein class // *J. bacterial.* – 1992. – 174. – P. 4967-4976.
21. Herwald H., Cramer H., Morgelin M., Russell W., Sollenberg U., Norrby-Teglund A., Flodgaard H., Lindbom L., Bjorck L. M protein, a classical bacterial virulence determinant, forms complexes with fibrinogen that induce vascular leakage // *Cell* 2004; 116: 367-379.
22. Kraus W., Beachey E.H. Renal autoimmune epitope of group A streptococci specified by M protein tetrapeptide: Ile-Arg-Leu-Arg // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 1988. – 85. – P. 4516-4520.
23. Kronvall G. A surface component in group A, C, and G streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin g // *J. Immunol.* 1973; 111: 1401-1406.
24. Luo Y.H., Kuo C.F., Huang K.J., Wu J.J., Lei H.Y., Lin M.T., Chuang W.J., Liu C.C., Lin C.F., Lin Y.S. Streptococcal pyrogenic exotoxin B antibodies in a mouse model of glomerulonephritis // *Kidney Int.* 2007; 72: 716-724.
25. Martin D.R. Rheumatogenic and nephritogenic group A streptococci. Myth or reality? An opening lecture // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997; 418: 21-27.
26. Masuda M., Nakanishi K., Yoshizawa N., Iijima K., Yoshikawa N. Group A streptococcal antigen in the glomeruli of children with henoch-schonlein nephritis // *Am. J. Kidney Dis.* 2003; 41: 366-370.
27. Mezzano S., Olavarria F., Ardiles L., Lopez M.I. Incidence of circulating immune complexes in patients with acute poststreptococcal glomerulonephritis and in patients with streptococcal impetigo // *Clin. Nephrol.* 1986; 26: 61-65.
28. Nordstrand A., Norgren M., Ferretti J.J., Holm S.E. Streptokinase as a mediator of acute post-streptococcal glomerulonephritis in an experimental mouse model // *Infect. Immun.* 1998; 66: 315-321.
29. Nordstrand A., Norgren M., Holm S.E. Pathogenic mechanism of acute post-streptococcal glomerulonephritis // *Scand. J. Infect. Dis.* 1999; 31: 523-537.
30. Ringdahl U., Svensson M., Wistedt A.C., Renne T., Kellner R., Muller-Esterl W., Sjobring U. Molecular co-operation between protein pam and streptokinase for plasmin acquisition by *Streptococcus pyogenes* // *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 6424-6430.
31. Rodriguez-Iturbe B., Carr R.I., Garcia R., Rabideau D., Rubio L., McIntosh R.M. Circulating immune complexes and serum immunoglobulins in acute poststreptococcal glomerulonephritis // *Clin. Nephrol.* 1980; 13: 1-4.
32. Rodriguez-Iturbe B. Nephritis-associated streptococcal antigens: Where are we now? // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004; 15: 1961-1962.
33. Rodriguez-Iturbe B., Batsford S. Pathogenesis of poststreptococcal glomerulonephritis a century after clemens von pirquet // *Kidney Int.* 2007; 71: 1094-1104.
34. Rodriguez-Iturbe B., Musser J.M. The current state of poststreptococcal glomerulonephritis // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 19: 1855-1864.
35. Schalen C., Kurl D., Christensen P. Independent binding of native and aggregated IgG in group A streptococci // *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. B.* 1986; 94: 333-338.
36. Schroder A.K., Nardella F.A., Mannik M., Johansson P.J., Christensen P. Identification of the site on igg fc for interaction with streptococci of groups A, C and G // *Immunology* 1987; 62: 523-527.
37. Sesso R.C., Ramos O.L., Pereira A.B. Detection of IgG-rheumatoid factor in sera of patients with acute poststreptococcal glomerulonephritis and its relationship with circulating immunocomplexes // *Clin. Nephrol.* 1986; 26: 55-60.
38. Sjobholm A.G. Complement components and complement activation in acute poststreptococcal glomerulonephritis // *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1979; 58: 274-284.
39. Stollerman G.H. Rheumatogenic and nephritogenic streptococci // *Circulation* 1971; 43: 915-921.
40. Tewodros W., Nordstrand A., Kronvall G., Holm S.E., Norgren M. Streptokinase gene polymorphism in group a streptococci isolated from ethiopian children with various disease manifestations // *Microb. Pathog.* 1993; 15: 303-311.
41. Thern A., Wastfelt M., Lindahl G. Expression of two different antiphagocytic m proteins by *Streptococcus pyogenes* of the OF+ lineage // *J. Immunol.* 1998; 160: 860-869.
42. Voltchek N., Gupalova T., Totolian A. Protein G expressed by human group C and G streptococci: Cloning of gene and binding properties // *Folia Microbiol. (Praha)* 1999; 44: 735-736.
43. Wyatt R.J., Forristal J., West C.D., Sugimoto S., Curd J.G. Complement profiles in acute post-streptococcal glomerulonephritis // *Pediatr. Nephrol.* 1988; 2: 219-223.
44. Yoshizawa N., Treser G., McClung J.A., Sagel I., Takahashi K. Circulating immune complexes in patients with uncomplicated group A streptococcal pharyngitis and patients with acute poststreptococcal glomerulonephritis // *Am. J. Nephrol.* 1983; 3: 23-29.
45. Yoshizawa N., Yamakami K., Fujino M., Oda T., Tamura K., Matsumoto K., Sugisaki T., Boyle M.D. Nephritis-associated plasmin receptor and acute poststreptococcal glomerulonephritis: Characterization of the antigen and associated immune response // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004; 15: 1785-1793.

поступила в редакцию 19.03.2012  
принята к печати 23.03.2012