

РОЛЬ СТРЕПТОКИНАЗЫ В МОДЕЛИРОВАНИИ ПОСТСТРЕПТОКОККОВОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА

Л.А. Бурова¹, Е.А. Гаврилова², П.В. Пигаревский¹, Артем А. Тотолян¹

¹ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² ГБУЗ Госпиталь для ветеранов войн, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Постстрептококковый гломерулонефрит (PSGN) относится к осложнениям острой инфекции, вызванной *Streptococcus pyogenes* (стрептококком группы А, СГА). Данная патология изучается давно, но и сегодня предпринимаются попытки идентификации продуктов жизнедеятельности стрептококков, способных инициировать иммунопатологический процесс в почках. Наибольшее внимание уделяется стрептокиназе — ферменту, трансформирующему плазминоген крови в плазмин, способный в комплексе с плазминовым рецептором (NAP1r) повреждать структуру почечных гломерул, а также активировать систему комплемента. Цель исследования состояла в решении двух задач: в изучении способности стрептокиназы СГА трансформировать плазминоген различной видовой принадлежности в плазмин, а также в изучении его роли в развитии PSGN у кроликов с подкожно имплантированными сетчатыми тканевыми камерами. *Материалы и методы.* В работе использованы СГА типов M1, M12, M22 и их *ska*⁻ мутанты. Препараты чистого плазминогена получали из свежей плазмы крови человека, кролика или мыши с помощью хроматографии на колонках с лизин-сефарозой 4В. Для выявления способности стрептокиназы активировать плазминоген в плазмин к ее препарату в концентрации 1 мг/мл добавляли по 10 мкг очищенного плазминогена человека, кролика или мыши. Концентрацию плазмينا определяли фотометрически с использованием хроматогенного субстрата S-2251 (Chromogenix, США). С целью воспроизведения PSGN на кроликах им под кожу вживляли по четыре камеры; животных заражали путем введения культур СГА в камеры после полного заживления ран и наблюдали в течение трех недель. На 14-й день животных обрабатывали бензилпенициллином. Почку выживших кроликов подвергали иммуногистологическому анализу. *Результаты.* Стрептокиназа из СГА типа M1, M12 и M22 в опытах *in vitro* показала выраженную функциональную активность в отношении плазминогена человека, трансформируя его в плазмин: показатели оптической плотности при $\lambda = 405$ нм составляли 0,4–0,7 в сравнении с отрицательным контролем (ОП < 0,001). Стрептокиназа не активировала мышинный плазминоген (ОП = 0,001) и крайне слабо влияла на трансформацию кроличьего плазминогена (ОП = 0,002). В опытах на кроликах по индукции PSGN не удалось выявить участие стрептокиназы, поскольку не были обнаружены какие-либо различия в инициации гломерулонефрита как исходными штаммами, так и *ska*⁻ изогенными мутантами. Мутантные штаммы, дефицитные по гену, ответственному за синтез стрептокиназы, но сохранившие способность связывать IgG кролика и человека, вызывали изменения в ткани почек, характерные для PSGN. Проведен сравнительный анализ кроличьей и мышинной моделей PSGN; вы-

Адрес для переписки:

Бурова Лариса Александровна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-05-42.
E-mail: lburova@yandex.ru

Contacts:

Larisa A. Burova
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Academic
Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-05-42.
E-mail: lburova@yandex.ru

Для цитирования:

Burova L.A., Gavrilova E.A., Pigarevsky P.V., Totolian Artem A. A role of streptokinase in experimental post-streptococcal glomerulonephritis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 5, pp. 853–864. doi: 10.15789/2220-7619-ARO-1594

Citation:

Бурова Л.А., Гаврилова Е.А., Пигаревский П.В., Тотолян Артем А. Роль стрептокиназы в моделировании постстрептококкового гломерулонефрита // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 5. С. 853–864. doi: 10.15789/2220-7619-ARO-1594

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

The study was supported by Grant No. 14-04-00390 of the Russian Foundation for Basic Research.

полненные по одной и той же схеме, они допускают противоположные выводы о роли стрептокиназы в развитии экспериментального гломерулонефрита. Обсуждается роль IgG Fc-связывающих белков СГА в генезе экспериментального постстрептококкового гломерулонефрита.

Ключевые слова: *Streptococcus pyogenes*, стрептокиназа, плазминоген, плазмин, IgG Fc-связывающая активность стрептококков, экспериментальный стрептококковый гломерулонефрит.

A ROLE OF STREPTOKINASE IN EXPERIMENTAL POST-STREPTOCOCCAL GLOMERULONEPHRITIS

Burova L.A.^a, Gavrilova E.A.^b, Pigarevsky P.V.^a, Totolian Artem A.^a

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

^b Hospital for Veterans, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Post-streptococcal glomerulonephritis (PSGN) refers to the sequela of the acute infection, caused by *Streptococcus pyogenes* (group A streptococcus, GAS). This pathology has been studied for a long time, and today attempts are being made to identify the products of their life activity, able to initiate an immunopathological process in kidneys. Most attention has been paid to streptokinase, the enzyme transforming blood plasminogen into plasmin, capable, together with the plasmin receptor (NAP1r), of damaging the glomerular tissue, as well as activating the complement system. The aim of the study was to consider two tasks: to study the ability of the GAS-obtained enzyme to transform plasminogen of different species into plasmin as well as to study its role in the development of PSGN in rabbits having subcutaneously implanted tissue chambers. The animals were infected by inoculating GAS cultures into the chambers. **Materials and methods.** GAS strains of M types 1, 12, 22 and their *ska*⁻ isogenic mutants were used in the study. Purified plasminogen preparations were isolated from fresh human, rabbit or mouse plasma by using chromatographic column with Lysine Sepharose 4B. To reveal the ability of streptokinase to activate plasminogen into plasmin, its preparation at a concentration of 1 mg/ml was added to 10 µg of purified human, rabbit or mouse plasminogen. The concentration of plasmin was defined photometrically using S-2251 (Chromogenix, USA). To reproduce PSGN, four chambers were implanted under the skin in each rabbit; after the complete wound healing animals were infected and observed for three weeks. On day 14, the animals were treated with benzylpenicillin. The kidneys from survived rabbits were subjected to immunohistology analysis. **Results.** During *in vitro* experiments, M1, M12 and M22 GAS streptokinase showed distinct functional activity on human plasminogen, transforming it into plasmin: optical density indicators at $\lambda = 405$ nm were 0.4–0.7 compared with the negative control (OD < 0.001). Streptokinase did not activate mouse plasminogen (OD = 0.001) and exerted quite a weak effect on transformation of the rabbit plasminogen into plasmin (OD = 0.002). In experiments on PSGN induction in rabbits, we failed to detect streptokinase involvement, because no differences between initiation of glomerulonephritis by wild strains or *ska*⁻ isogenic mutants were identified. Mutant strains deficient in the gene responsible for streptokinase synthesis but retained ability to bind rabbit and human IgG, caused morphological changes in kidney tissue, specific for PSGN. In addition, a comparative analysis of PSGN “rabbit” and “mouse” models developed by the same technology, was carried out and led to opposing conclusions regarding a role of streptokinase in pathogenesis of experimental glomerulonephritis. The role of IgG Fc-binding activity of GAS in development of experimental PSGN is discussed.

Key words: *Streptococcus pyogenes*, streptokinase, plasminogen, plasmin, streptococcal IgG Fc-binding proteins, experimental streptococcal glomerulonephritis.

Введение

Данные медицинской науки и практики позволяют рассматривать стрептококковую инфекцию и вызываемые ею осложнения в качестве одной из глобальных проблем современного здравоохранения. Важную роль в этой патологии человека играет *Streptococcus pyogenes*, штаммы которого входят в серологическую группу А (СГА), объединяющую около 150 М-типов возбудителя. Они вызывают такие заболевания как тонзиллофарингит, скарлатина, пиодермия, некротический фасциит и миозит, сепсис, синдром токсического шока и другие проявления острой стрептококковой инфекции, не говоря уже об иммунопатологических процессах по типу ревматического

поражения сердца и острого постстрептококкового гломерулонефрита (PSGN). В отношении патогенеза этой формы гломерулонефрита большинство авторов придерживается представлений об иммунокомплексной природе ее развития [7, 11, 17, 33]. Усилия исследователей направлены на идентификацию микробного фактора, обеспечивающего так называемую «нефритогенность» штаммов СГА. Она приводит к воспалению, дегенерации и деструкции ткани почечных клубочков и в итоге к образованию аутоантигенных субстанций. Основное место среди кандидатов в ведущие факторы нефритогенности отводится стрептокиназе, поскольку этот экскретируемый продукт СГА способен расщеплять плазминоген крови в сериновую протеиназу — плазмин.

По мнению ряда авторов [16, 20, 28], он является иницирующим звеном в генезе гломерулонефрита. Было показано, что введение СГА, экспрессирующего стрептокиназу гено-типа *ska1* или *ska2* [21, 22, 23, 27], мышам линии BALB/c в подкожно имплантированные камеры сопровождается морфологическими изменениями в почках, лейкоцитарной инфильтрацией ткани гломерул, пролиферацией клеток мезангия и депозицией С3-компонента комплемента и IgG на базальной мембране клубочков. У некоторых животных обнаружены антитела к стрептокиназе, а также ее депозиция на базальной мембране [28]. Следует, однако, отметить, что во избежание ошибок в трактовке экспериментов по моделированию PSGN постулат о ведущей роли стрептокиназы в его генезе следует обязательно сопроводить доказательством ее способности активировать плазмин, расщепляя плазминоген экспериментального животного.

Неоднозначность данных, регистрируемых в разных экспериментах по изучению иммунопатологических процессов стрептококковой этиологии, может быть вызвана рядом обстоятельств. Во-первых, сложностью структуры микробной клетки, богатством активных компонентов, участвующих во взаимодействии патогена и хозяина; во-вторых, многоплановостью ответных реакций инфицированного организма; и, в-третьих, состоянием его иммунной системы. С этим связаны различные проявления постстрептококковых осложнений. Понять их можно тем полнее, чем ближе опытная модель к естественному процессу у человека [4]. Очевидно, что взаимосвязанность многих факторов затрудняет определение вклада каждого из них в патологию. Именно поэтому среди многих факторов перехода острой инфекции в иммунопатологию важно суметь определить ведущий, отделив его от факторов, поддерживающих развитие патологии. Ранее в опытах по индукции PSGN была обнаружена способность аутоантител к IgG экспериментального животного (кролика) повреждать почечные гломерулы [1, 2, 3, 5, 6, 9]. Формирование анти-IgG антител, а затем и иммунных комплексов типа IgG-анти-IgG, было вызвано введением кроликам массивных доз убитых микробных тел (10^8 – 10^9 КФЕ/мл) СГА, способных связывать IgG хозяина за счет поверхностных IgG Fc-связывающих белков микроба и последующей антигенной трансформации связанного IgG. Мутантные штаммы СГА, лишённые указанных белков, не вызывали патологический процесс в почечной ткани. Эти исследования позволили определить IgG Fc+ состояние СГА как ведущее условие, обуславливающее его нефритогенность [12, 13, 15].

С учетом вышеизложенного были определены задачи настоящего исследования:

- изучить способность стрептокиназы ряда М-типов СГА трансформировать плазминоген различного видового происхождения в плазмин в качестве важного звена в генезе PSGN;
- смоделировать гломерулонефрит у кроликов введением в имплантированные под кожу камеры IgG Fc-связывающих СГА, продуцирующих и не продуцирующих стрептокиназу.

Решение этих задач позволит дать сравнительную оценку разным подходам по моделированию PSGN и попытаться определить патогенетическое значение отдельных факторов процесса, например стрептокиназы.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе были использованы следующие стрептококки группы А: штаммы M1 (40/58) и M12 (1800) из коллекции WHO Streptococcal Reference Laboratory (Национальный институт общественного здоровья, Прага, Чехия); штамм M22 (AL168), выделенный от больного фарингитом, полученный от доктора Lindahl G. (Отдел медицинской микробиологии, Лундский университет, Швеция); изогенные мутанты *ska*⁻ типов M1 и M22, полученные от доктора Sjobring U. (Отдел медицинской микробиологии, Лундский университет, Швеция). Штаммы хранили при -70°C в среде Тодда-Хьюита (Todd-Hewitt Broth, THB) с 20% эмбриональной телячьей сывороткой. Для их культивирования также использовали среду Тодда-Хьюита (Difco, США; Hi-Media, Индия).

Препараты. В иммуноморфологических тестах использовали кроличью сыворотку с антителами к С3-компоненту комплемента человека, перекрестно реагирующую с С3 кролика (Dako, Дания); поликлональные козы антитела к TNF α кролика (AMS Biotechnology, США), поликлональные мышинные антитела к IL-1 β кролика и поликлональные козы антитела к IL-6 человека (Biosource International, США). Также использовали моноспецифические антисыворотки к IgG кролика, козы и мыши, меченые пероксидазой (Sigma-Aldrich, США).

Выделение и очистка стрептокиназы. Для выделения стрептокиназы из культур СГА типов M1, M12 или M22 использовали пролонгированную инкубацию микробов: 2 мл 18–20-часовой культуры вносили в 200 мл подогретой до 37°C среды THB с 2% дрожжевого экстракта и дополнительно инкубировали еще 8–10 ч. Надосадок, полученный после 25 мин центрифугирования при 12 000g и 4°C , фильтровали через фильтры 0,45 мкм (Millipore, США) и концентрирова-

ли в 10 раз с помощью мембран Amicon PM-10 (Millipore, США). Сконцентрированный супернатант со скоростью 6 мл/ч наносили на HiTrap NHS-активированную аффинную колонку, конъюгированную с плазминогеном человека. Для элюции использовали 0,1 М раствор глицина pH 2,0. Объем собираемых фракций не превышал 200 мкл; каждую фракцию с наивысшим показателем оптической плотности при длине волны 280 нм исследовали в вестерн-блоте на наличие стрептокиназы.

Вестерн-блот анализ для выявления стрептокиназы. 10 мл 18-часовой культуры исследуемых СГА центрифугировали и 1 мл каждого надосадка переносили в пробирки, куда добавляли 500 мкл 10% трихлоруксусной кислоты и смесь выдерживали в течение 1 ч при 4°C. Для получения осадка пробирки центрифугировали в течение 10 мин при 14 000 об/мин. К осадку добавляли 20 мкл SDS-буфера, перемешивали на мешалке типа Vortex трижды по 45 с до полного растворения осадка. 15 мкл образца исследовали SDS-электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле по методике Neville D. [27]. Для электропереноса использовали PVDF-мембраны согласно методике Tombin H. и соавт. [36]. После электропереноса мембраны помещали в PBS с 0,25% Tween-20 и 0,25% желатины и инкубировали с моноклональными антителами к стрептокиназе, разведенными 1:1000 в блокирующем буфере. После отмывания к мембране добавляли ¹²⁵I-протеин G в концентрации 200 000 cpm/мл. Отмытую и высушенную мембрану для выявления стрептокиназы помещали в кассету Phosphor Imager. Радиоактивность определяли с помощью компьютерной программы STORM 840 Phosphor Screen. При исследовании фракций с аффинной Hi-Trap колонки на наличие стрептокиназы образцы после нейтрализации до pH 7,0–7,2 добавлением 1 М раствора NaOH наносили в 10% SDS-полиакриламидный гель в объеме 15 мкл. Остальные этапы (электрофорез, электроперенос и обработка мембран) аналогичны описанному выше.

Очистка плазминогена различной видовой специфичности. Плазминоген получали из свежей плазмы крови человека, кролика или мыши. Отцентрифугированную в течение 1 ч при 40°C и 20 000g плазму смешивали с лизин-сефарозой 4B (GE Healthcare, США) и смесь выдерживали 2 ч при 40°C. Затем ее переносили в хроматографическую колонку, которую отмывали PBS из расчета 5–10 мл на 1 мл исходного объема плазмы и повторно PBS с 0,5 М NaCl из расчета 1–2 мл на 1 мл исходного объема плазмы. Для элюции плазминогена использовали 0,2 М раствор ε-аминокапроновой кислоты

(Sigma Aldrich, США). Объем фракций не превышал 2,0–2,5 мл. Чистоту полученных фракций с плазминогеном контролировали путем SDS-электрофореза в 10% полиакриламидном геле и хранили при температуре –70...–80°C. Допускалось лишь однократное их размораживание во избежание потери препаратом функциональной активности.

Тест на функциональную активность плазминогена. К 2 мкл коммерческой стрептокиназы С (Streptase, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мг/мл добавляли 10 мкг очищенного плазминогена человека, кролика или мыши. Смесь инкубировали 1 ч при 37°C. К концу срока инкубации для выявления плазмина в смесь добавляли специфический хроматогенный субстрат (S-2251, Chromogenix, Sigma) в объеме 1 мл. Инкубацию смеси продолжали еще в течение одного часа, после чего определяли оптическую плотность (ОП) раствора при λ = 405 нм. Показатели ОП контрольных проб, содержащих только плазминоген различной видовой принадлежности или с одной стрептокиназой, не должны были превышать 0,001, что указывало на отсутствие в растворе плазмина. При модификации плазминогена в плазмин в результате действия исследуемой стрептокиназы показатели ОП при λ = 405 нм равнялись или превышали 0,1. При тестировании разных образцов стрептокиназы к элюатам с HiTrap аффинной колонки в объеме 5, 10 или 20 мкл добавляли 10 мкг плазминогена человека, кролика или мыши. Остальные этапы анализа аналогичны описанному выше [10].

Радиоиммунологический метод определения IgG Fc-связывающей активности СГА. IgG Fc-связывающую активность бактериальных клеток определяли по их способности связывать IgG человека, меченный ¹²⁵I [14]. Йодирование препаратов IgG человека проводили с использованием ¹²⁵I производства радиохимического центра Amersham (Англия) и объединения «Изотоп» (Россия) по методу Greenwood F.C. и соавт. [18]. В исследованиях был использован коммерческий IgG человека фирмы Kabi (Швеция). Кроличий и мышинный IgG были выделены из пула соответствующих сывороток методом аффинной хроматографии на колонке с сефарозой 4B, конъюгированной с протеином G.

Суть теста состояла в следующем: 1,0–1,5 мкг IgG, меченного ¹²⁵I, добавляли к 200 мкл стандартной взвеси СГА (10⁹ КФЕ/мл) и замеряли общую радиоактивность смеси. После 60 мин инкубации при комнатной температуре, центрифугирования и отмывания осадка раствором PBS с 0,1% Tween-20 измеряли радиоактивность осадка. IgG Fc-связывающую активность исследуемого штамма рассчитывали в процентах связанного

IgG ¹²⁵I от добавленного общего IgG ¹²⁵I. Разница между двумя параллельными тест-пробирками не должна была превышать 3%. За позитивный принимали штамм, связывающий >10%, а за негативный — < 5% меченого IgG.

Иммуноморфологическое исследование почечной ткани кроликов. Фиксированные в 4%-ном параформальдегиде (12 ч) и депарафинированные тканевые срезы подвергали иммуноморфологическому анализу. На них наносили соответствующие антитела (к IgG, С3-компоненту комплемента или к цитокинам) в разведении 1:50 в 0,01 М фосфатном буфере (PBS, pH 7,4) с 1% BSA и выдерживали 1 ч при комнатной температуре. После отмывания в PBS срезы инкубировали 1 час с антителами, мечеными пероксидазой, так называемыми вторыми антителами. В качестве субстрата применяли 0,05%-ный диаминобензидин-тетрагидрохлорид и 0,03%-ную перекись водорода в PBS и после 20 мин контакта срезы промывали дистиллированной водой и заключали в глицерин-желатину.

Фиксацию кроличьего IgG в срезах выявляли козьими моноспецифическими антителами к IgG кролика с последующей обработкой срезов антителами к козью IgG, мечеными пероксидазой. Депозицию-С3 компонента комплемента определяли обработкой срезов первоначально кроличьей сывороткой к С3-компоненту человека, а затем моноспецифической сывороткой к кроличьему IgG, меченному пероксидазой. Для выявления цитокинов срезы обрабатывали мышинными антителами к IL-1β кролика, козьими антителами к IL-6 человека и козьими антителами к TNFα кролика соответственно. В качестве вторых антител использовали антикозий или антмышинный IgG, меченные пероксидазой. Для окрашивания срезов использовали гематоксилин-эозин. Срезы изучали в микроскопе Axiomat (Opton, Германия). Анализ каждого образца ткани включал оценку изменений при низком и среднем увеличении (×100–600). Материал, обработанный иммунными сыворотками, исследовали при увеличении ×900–1100 для выявления депозитов IgG и С3-комплемента, а также провоспалительных цитокинов.

Результаты

Способность стрептокиназы трансформировать плазминоген различной видовой специфичности в плазмин

Согласно современным представлениям повреждение гломерул при PSGN у человека развивается по следующей схеме: стрептокиназа, продуцируемая СГА, трансформирует плазминоген крови в плазмин — протеолитический

фермент. Последний, в совокупности с нефрит-ассоциированным плазминовым рецептором (NAP1r), разрушает белки ткани и приводит к формированию аутоантигенов и синтезу противотканевых антител. Процесс сопровождается деградацией внеклеточного матрикса гломерул, продукцией провоспалительных цитокинов, депозицией С3-компонента комплемента и различных иммунных комплексов. Исходя из вышеизложенного, при моделировании PSGN на животных крайне необходимо контролировать ход ответных реакций организма, и в первую очередь трансформацию плазминогена того или иного вида животного в плазмин. В соответствии с этим, нами выполнена серия опытов по способности стрептокиназы, выделенной из различных М-типов (M1, M12 и M22) СГА, трансформировать плазминоген разного происхождения в плазмин. Чистоту полученных с колонки лизин-сефарозы 4В фракций плазминогена выявляли методом SDS электрофореза в полиакриламидном геле. Результаты приведены на рис. 1.

Все три М-типа СГА активно продуцировали стрептокиназу, однако наибольшей активностью обладали штаммы типов M1 и M22. Результат анализа в вестерн-блоте препаратов стрептокиназы, выделенных из стрептококков типа M1, представлен на рис. 2. Положительные в вестерн-блоте фракции стрептокиназы ис-

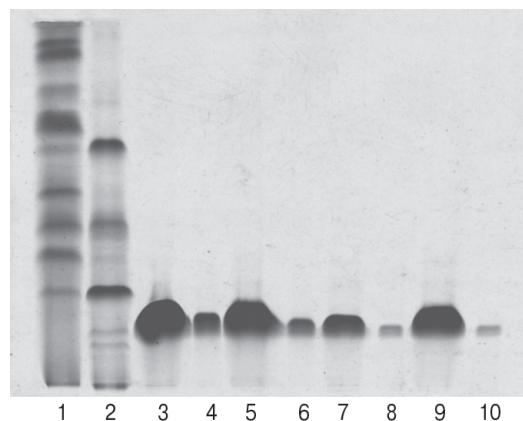


Рисунок 1. Чистота препаратов плазминогена различной видовой принадлежности в SDS-электрофорезе в полиакриламидном геле
Figure 1. Purity of species-specific plasminogen preparations in SDS-PAGE

Примечания. 1 — стандарт белков высокого молекулярного веса, 2 — стандарт белков низкого молекулярного веса, 3–6 — фракции плазминогена человека, 7–8 — фракции плазминогена мыши, 9–10 — фракции плазминогена кролика.

Notes. 1 — standard for high molecular weight proteins, 2 — standard for low molecular weight proteins, 3–6 — fractions of human plasminogen, 7–8 — mouse plasminogen fractions, 9–10 — rabbit plasminogen fractions.

следовали в функциональном тесте с плазминогеном различной видовой специфичности. Стрептокиназа из СГА этих М-типов проявила четко выраженную активность только в отношении плазминогена человека, трансформируя его в плазмин: ОП при $\lambda = 405$ нм составляла 0,4–0,7 по сравнению с отрицательной контрольной пробой (ОП < 0,001). Стрептокиназа не активировала мышиный плазминоген — ОП не превышал 0,001. В отношении плазминогена кролика отмечалось некоторое превышение показателей ОП (0,002), что рассматривалось как крайне слабая его активация. Типичный пример одного из многих испытаний активности стрептокиназы приведен в табл. 1. Стрептокиназа из СГА М1 (стрептокиназа А), как и стрептокиназа С (коммерческий препарат Streptase), трансформировали в плазмин только плазминоген человека: показатели ОП составляли 0,5112 и 0,6947 при $\lambda = 405$ нм соответственно. Обе стрептокиназы не действовали на плазминоген мыши и вызывали незначительное повышение ОП

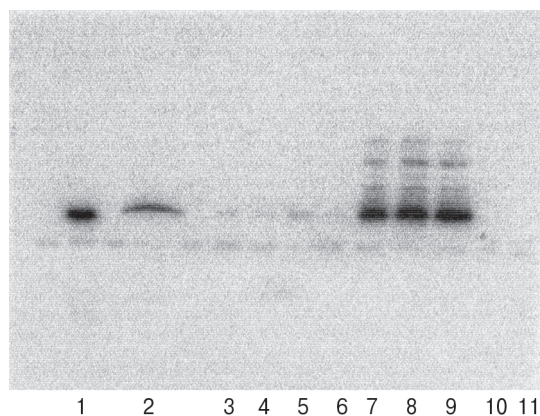


Рисунок 2. Исследование фракций стрептокиназы, выделенной из стрептококка типа М1 (40/58), элюированных с HiTrap NHS-активированной аффинной колонки

Figure 2. Study of streptokinase fractions isolated from GAS type M1 (40/58) eluted from HiTrap NHS-activated affinity column

Примечания. 1 — препарат коммерческой стрептокиназы С (Streptase) — контроль; 2 — супернатант культуральной жидкости стрептококка типа М1 (40/58), обработанный 10%-ной трихлоруксусной кислотой для осаждения стрептокиназы; 3–11 — фракции, элюированные с HiTrap NHS-активированной аффинной колонки и исследованные в вестерн-блоте на наличие стрептокиназы: 3–6 и 10–11 — отрицательные, 7–9 — положительные на наличие стрептокиназы фракции.

Notes. 1 — commercial streptokinase C (Streptase) — control; 2 — culture fluid supernatant of GAS type M1 (40/58), treated with 10% trichloroacetic acid for streptokinase precipitation; 3–11 — fractions eluted from HiTrap NHS-activated affinity column and tested in Western blot for streptokinase: 3–6 and 10–11 — negative fractions, 7–9 — positive fractions for streptokinase.

(0,0019 и 0,0115) при добавлении к плазминогену кролика, что соответствовало минимальной концентрации плазмينا в растворе: 0,002 и 0,01 мг в пересчете на 1 мл. Полученные данные фактически позволяют допустить, что система «плазминоген–плазмин» не участвует ни в инициации, ни в развитии PSGN у мышей и оставляют слабую надежду на ее вовлечение в процесс у кроликов.

Индукция гломерулонефрита у кроликов с использованием подкожно имплантированных тканевых камер

Более строгие аргументы в пользу высказанного выше тезиса были получены в опытах по моделированию PSGN непосредственно на кроликах с использованием метода, ранее примененного для воспроизведения процесса на мышах [29]. «Живые» культуры *ska*⁺ штаммов СГА и их *ska*⁻ мутантных клонов вводили кроликам в камеры, вживленные под кожу. Создавая таким образом локальные очаги стрептококковой инфекции, экспериментатор обеспечивал долговременное поступление в организм животного секретуемых продуктов СГА, в частности стрептокиназы. Кроме того, испытываемые штаммы обладали выраженной продукцией IgG Fc-связывающих белков, также способных в силу их молекулярной массы, близкой к таковой для стрептокиназы (45 kDa), проникать в организм хозяина. Напомним, что IgG Fc-связывающие белки обладают уникальной способностью связывать IgG ограниченного числа видов (человека, кролика и свиньи, но не мыши [24, 25]). Ранее нам удалось показать роль этих же белков в инициации развития PSGN у кроликов, сходного по морфологии с проявлениями постстрептококкового гломерулонефрита у человека [3, 5, 12].

Сетчатые стальные камеры цилиндрической формы и размером 1,8 × 2,2 см (рис. 3), из-

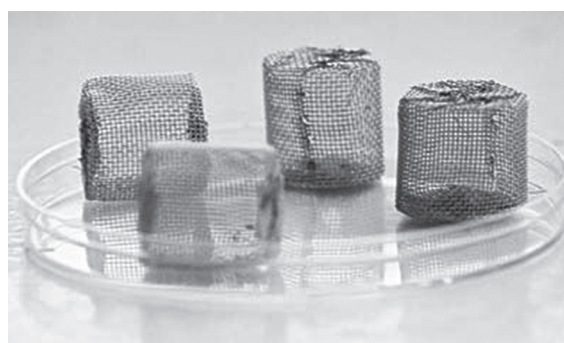


Рисунок 3. Тканевые камеры, использованные для подкожной имплантации кроликам

Figure 3. Tissue chambers used for subcutaneous implantation in rabbits

готовленные в мастерской Университета Умео (Швеция), использовали для вживления под кожу кроликам весом 3,5–4,0 кг (по четыре на кролика) в условиях обезболивания и под контролем ветеринарного врача Института экспериментальной медицины. Через 4 недели после снятия швов, при условии заживления ран

и отсутствия воспаления в области имплантата (в противном случае кролик исключался из опыта), в камеры вводили суспензии СГА типов М1, М22 и их *ska*⁻ мутантов. Характеристика штаммов приведена в табл. 2. Все они обладали высокой IgG-связывающей активностью в отношении IgG человека (34–78,5%) и кролика

Таблица 1. Активация плазминогена различной видовой специфичности в присутствии стрептокиназы С и стрептокиназы, выделенной из стрептококка типа М1 (40/58)

Table 1. Activation of species-specific plasminogen in the presence of streptokinase C and streptokinase isolated from streptococcus type M1 (40/58)

Номер образца Sample number	Исследуемый препарат Studied preparation	Показатели оптической плотности при $\lambda = 405$ нм Optical density at $\lambda = 405$ nm	Концентрация белка (плазмина) в мг/мл Protein (plasmin) concentration in mg/ml
1	Плазминоген человека 10 мкг + стрептокиназа М1 (40/58) Human plasminogen 10 μ g + streptokinase M1 (40/58)	0,5112	0,5
2	Плазминоген человека 5 мкг + стрептокиназа М1 (40/58) Human plasminogen 5 μ g + streptokinase M1 (40/58)	0,3823	0,38
3	Плазминоген кролика 20 мкг + стрептокиназа М1 (40/58) Rabbit plasminogen 20 μ g + streptokinase M1 (40/58)	0,0019	0,002
4	Плазминоген мыши 20 мкг + стрептокиназа М1 (40/58) Mouse plasminogen 20 μ g + streptokinase M1 (40/58)	0,001	0
5	Streptase + плазминоген человека 10 мкг Streptase + human plasminogen 10 μ g	0,6947	0,7
6	Streptase + плазминоген кролика 20 мкг Streptase + rabbit plasminogen 20 μ g	0,0115	0,01
7	Streptase + плазминоген мыши 20 мкг Streptase + mouse plasminogen 20 μ g	0,0003	0
8	Плазминоген человека 10 мкг Human plasminogen 10 μ g	-0,0015	0
9	Плазминоген кролика 20 мкг Rabbit plasminogen 20 μ g	-0,0026	0
10	Плазминоген мыши 20 мкг Mouse plasminogen 20 μ g	-0,0029	0
11	Стрептокиназа М1 (40/58) 20 мкл Streptokinase M1 (40/58) 20 μ g	-0,0046	0
12	Streptase 10 мкл Streptase 10 μ g	-0,0052	0

Таблица 2. Характеристика штаммов стрептококков группы А, использованных в экспериментах на кроликах с имплантированными тканевыми камерами

Table 2. Characteristics of GAS strains used in experiments on rabbits with implanted tissue chambers

Вводимые стрептококковые штаммы Inoculated streptococcal strains	Связывание IgG, % Binding of IgG, %			Продукция стрептокиназы* Streptokinase production*
	человека human	кролика rabbit	мыши mouse	
М1 (40/58)	78,5 \pm 2,1	54,8 \pm 1,5	3,0 \pm 0,3	+
М1 (40/58) <i>ska</i> ⁻	75,0 \pm 1,7	54,0 \pm 2,0	3,0 \pm 0,08	-
М22 (AL 168)	34,0 \pm 1,5	22,0 \pm 1,4	3,0 \pm 0,09	+
М22 (AL 168) <i>ska</i> ⁻	34,5 \pm 1,3	21,5 \pm 1,3	3,0 \pm 0,2	-

Примечания. *Наличие стрептокиназы выявляли в культуральных супернатантах, осажденных 10% трихлоруксусной кислотой, с помощью вестерн-блота. Нитроцеллюлозную мембрану для выявления стрептокиназы обрабатывали моноклональными антителами к стрептокиназе С и протеину G, меченным ¹²⁵I. Продукция стрептококками стрептокиназы: (+) — выраженная, (-) — отсутствует.

Note. *The presence of streptokinase was detected in culture supernatants sedimented with 10% trichloroacetic acid using a Western blot. The nitrocellulose membrane was treated with monoclonal antibodies to streptokinase C and protein G labeled ¹²⁵I to detect streptokinase. Expression of streptokinase by streptococci: (+) — pronounced, (-) — absent.

(22–54,8%), но не IgG мыши (3%). Исходные штаммы СГА в отличие от *ska*⁻ мутантов продуцировали стрептокиназу.

Штаммы были испытаны на вирулентность на белых беспородных мышях весом 8–10 г: по 5 мл 18-часовых культур центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин; осадки взвешивали в исходных объемах PBS и использовали для приготовления 10-кратных разведений. Каждое разведение по 0,5 мл вводили 5 мышам в полость брюшины. Вирулентность оценивали по числу павших через 24 ч мышей из числа зараженных. Количество КФЕ стрептококков, вызвавших 100% гибель мышей, принимали за летальную дозу — ЛД₁₀₀. Высокая летальность для мышей была выявлена у штамма типа М1 и его *ska*⁻ мутанта: ЛД₁₀₀ составляла 10³ КФЕ. Штаммы типа М22 были авирулентны: доза в 10⁸ КФЕ не вызывала гибель мышей.

Для введения в камеры использовали 18-часовые культуры СГА, выращенные в среде ТНВ: 100 мкл в стационарной фазе роста микробов переносили в 10 мл свежей, подогретой до 37°C среды для последующей инкубации в течение 5–6 ч до экспоненциальной фазы роста; после центрифугирования микробные клетки отмывали и ресуспендировали в 10 мл PBS. Непосредственно перед введением в камеры готовили следующие разведения микробов: 10⁷ КФЕ/мл для исходных и 10⁸ КФЕ/мл для мутантных штаммов. Более высокая концентрация мутантных бактерий обусловлена более длительной начальной фазой их роста. Живые СГА высевались из тканевых камер до 11-го дня с момента инфицирования кроликов с максимумом на 3-й день. На этот период приходилась и наибольшая летальность кроликов от стрептококка

типа М1 и его *ska*⁻ мутанта по сравнению с кроликами, которым вводили штаммы типа М22. На 14-й день из камер бактерии больше не высеивались. На 16-й день всем выжившим кроликам инъецировали внутримышечно бензилпенициллин из расчета 10 мг на 1 кг веса. На 21-й день кроликов обескровливали, а их почки забирали для иммуногистологического анализа.

Всего в опыт были взяты 30 кроликов с имплантированными камерами. Суммарные итоги экспериментов приведены в табл. 3. Очевидно, что моделирование гломерулонефрита у кроликов с имплантированными камерами было сопряжено с гибелью животных, которая связана с высокой вирулентностью либо токсигенностью культур, а также с невозможностью по условиям опытов применять антибиотики в течение почти двух недель после введения микробов в камеры. Высокая летальность совпала с введением вирулентных штаммов типа М1 — выжило по 2 кролика из 10 в опыте и контроле. Из числа кроликов, зараженных штаммами типа М22, выжило по четыре кролика из пяти зараженных. Высокая вирулентность для кроликов может ограничивать использование данной модели при изучении нефритогенной потенции высоковирулентных штаммов СГА.

Технология создания очагов инфекции в имплантированных камерах позволяет сосредоточить внимание на роли экстрацеллюлярных продуктов микроба, а не на иных клеточно-ассоциированных патогенетических факторах бактерий, к которым можно отнести и IgG Fc-связывающие М-белки СГА. Иницирующая роль последних в генезе PSGN была неоднократно показана в наших многолетних опытах [1, 2, 3, 13]. Введение кроликам убитых IgG Fc-

Таблица 3. Индукция экспериментального гломерулонефрита у кроликов при введении стрептококков типа М1 или М22 и их *ska*⁻ мутантов в имплантированные подкожно тканевые камеры

Table 3. Induction of experimental glomerulonephritis in rabbits by injections of M1 or M22 type streptococci and their *ska*⁻ mutants into implanted subcutaneous tissue chambers

Штаммы стрептококков Strains of streptococci	Количество прооперированных кроликов Number of operated rabbits	Число кроликов с гломерулонефритом*/ число выживших кроликов Number of rabbits with glomerulonephritis*/number of surviving rabbits	Депозиция IgG и С3 Deposition IgG and C3	Продукция IL-1β, IL-6, TNFα Production IL-1β, IL-6, TNFα
M1 (40/58)	10	2/2	+	+
M1 (40/58) <i>ska</i>⁻	10	2/2	+	+
M22 (AL168)	5	3/4	+	+
M22 (AL168) <i>ska</i>⁻	5	4/4	+	+

Примечания. *Кролики, у которых при гистологическом и иммуноморфологическом анализе почечной ткани были выявлены четкие морфологические изменения, характеризующие развитие иммунного воспаления и мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита. Степень выраженности депозиции IgG, С3-комплемента и продукции интерлейкинов: (+) — выраженная.

Note. *Rabbits with verified histological and clear immunomorphological renal tissue morphological changes that characterize the development of immune inflammation and membranous-proliferative glomerulonephritis. Level of deposited IgG, C3 complement and interleukin expression: (+) — pronounced.

позитивных бактерий СГА ряда М-типов, отмытых от внеклеточных продуктов, вызывало в почках изменения, типичные для мембранозно-пролиферативного PSGN с лимфоцитарной инфильтрацией ткани, депозицией IgG, С3-комплемента и продукцией провоспалительных цитокинов. В контрольных опытах, с использованием убитых природных или мутантных IgG Fc-негативных клонов СГА, такие проявления отсутствовали [13]. Допускалось, что связывание IgG животного сопровождалось его аутоантигенным преобразованием и синтезом анти-IgG антител к собственным IgG животного (с титром 1:80–1:640), ведущим к развитию иммунокомплексного повреждения мембран гломерул. Полученные результаты позволили перейти к опытам по моделированию PSGN с помощью «живых» культур СГА в качестве более адекватного подхода. Подтверждением сказанному стали воспалительные процессы в гломерулах, что подтверждалось обнаружением депозитов С3-комплемента и IgG, а также продукцией провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF α (табл. 3).

Обсуждение

Основными факторами патогенности СГА являются типовые М-белок и так называемые М-подобные белки. Оценивая их роль в патологии, следует отметить, что они способны противостоять фагоцитозу микроба в организме хозяина, реагировать с широким спектром сывороточных белков человека: IgG, IgA, альбумином, фибронектином, плазминогеном и различными компонентами системы комплемента [7, 8, 17]. Среди них важное место занимают поверхностные белки, реагирующие с Fc-фрагментом нативного IgG человека и некоторых млекопитающих — IgG Fc-связывающие белки СГА. Гены, контролируемые М- и М-подобные белки, локализованы в пределах одного *Mga*-регулона, в значительной мере определяющего патогенность СГА [19].

Сегодня исследователи имеют хорошую возможность для сравнительного анализа как минимум двух моделей PSGN: мышинной и кроличьей [4, 29], тем более что в них использован один и тот же принцип — создание локального очага СГА-инфекции во вживленных под кожу животным камерах. Несмотря на внешнее сходство использованных моделей и ряда патоморфологических проявлений обоих процессов, обращают на себя внимание значительные расхождения в интерпретации и в выводах, в первую очередь в трактовке роли стрептокиназы в развитии экспериментального стрептококкового гломерулонефрита. В опытах на кроликах, в отличие от мышинной

модели, штаммы СГА, дефицитные по стрептокиназе, обладавшие способностью связывать IgG кролика и человека, но не мыши, вызывали деструктивно-дегенеративные изменения в почечной ткани, характерные для гломерулонефрита. В мышинной модели предпочтение отдается в известной мере спорному тезису о стрептокиназе как инициаторе процесса [20, 27, 28, 29]. При этом ее участие на других этапах патогенеза PSGN вряд ли должно оспариваться. Кроличья модель с использованием убитых и «живых» СГА разработана в отделе молекулярной микробиологии ИЭМ. Она не только вновь подтвердила роль IgG Fc-связывающих М-подобных белков в инициации экспериментального гломерулонефрита [13], но и позволила отрицать участие в нем стрептокиназы как в опытах со взвесью убитых бактерий, обладающих IgG Fc-активностью, так и в опытах с введением живых бактерий в подкожные камеры. На это однозначно указывает наличие патологических изменений в опытах со *ska*⁻ мутантными клонами, сохранившими IgG Fc⁺ фенотип. В то же время мышинная модель, описанная в работах S. Holm и соавт. [20, 27, 28, 29], вряд ли может дать ответ на вопрос об иницирующей роли стрептокиназы в патогенезе PSGN, поскольку положительный ответ на него нуждается в более строгом обосновании. Тем не менее в данной работе были найдены только статистически достоверные различия в проявлении ряда признаков гломерулонефрита между группами мышей, зараженных *ska*⁺ и *ska*⁻ клонами штамма NZ131. При этом признаки PSGN (окклюзия капилляров, депозиция С3-комплемента, протеинурия) обнаруживались в ряде случаев не только у мышей, зараженных *ska*⁻ клоном, но и у контрольных мышей, которым не вводили ничего либо вводили физиологический раствор. Непонятно, каким образом стрептокиназа могла иницировать PSGN, если она не способна модифицировать в плазмин мышинный плазминоген, что было показано как в настоящем исследовании, так и в описанном ранее [32]. В модели на мышах обнаруживалась выраженная адсорбция стрептокиназы на гломерулах; именно с этим свойством стрептокиназы авторы связывали ее нефритогенность, хотя обнаружение данного продукта на клубочках почек могло отражать лишь депозицию иммунных комплексов, содержащих данный фермент. Развитие PSGN у мышей нельзя объяснить и с позиций феномена IgG Fc-рецепции, поскольку, как известно, штаммы СГА не связывают мышинный IgG [24, 25], что подтвердилось и в настоящей работе. Исходя из изложенного, вопрос о механизме моделирования PSGN на мышах остается открытым.

В этом плане более целесообразным является использование модели экспериментального поражения гломерул на кроликах с живыми камерами, которая обеспечила возможность ответить сразу на оба вопроса относительно роли стрептокиназы и IgG Fc-статуса СГА. С этой целью кроликов заражали стрептококками группы А типов M1 или M22 и их *ska*⁻ мутантами; при этом все использованные штаммы активно связывали IgG кролика и человека. Данные опыты однозначно исключили стрептокиназу, но не IgG-связывающие белки, из числа факторов инициации PSGN, так как не было выявлено различий в проявлениях гломерулонефрита, вызванных исходными и мутантными штаммами. Мутантные штаммы, дефицитные по гену, ответственному за синтез стрептокиназы, но сохранившие способность связывать IgG кролика и человека, сохраняли способность вызывать иммунное воспаление в ткани почек, характерное для гломерулонефрита. С этих позиций развитие экспериментального гломерулонефрита можно объяснить IgG-связывающей активностью СГА, как это ранее было показано в опытах с убитыми IgG Fc⁺ штаммами СГА и их изогенными мутантами [12, 13, 15].

Нами была также предпринята попытка изучить способность стрептокиназы из разных M-типов СГА трансформировать плазминоген различного видового происхождения в плазмин как важный этап в генезе PSGN. С этой целью были выделены препараты очищенного плазминогена из плазмы крови человека, кролика и мыши. Стрептокиназа, выделенная из СГА типов M1, M12 и M22, в опытах *in vitro* показала четко выраженную функциональную активность только в отношении плазминогена человека, трансформируя его в плазмин и слабо воздействуя на плазминоген кролика. На основании этих данных невозможно объяснить роль стрептокиназы в развитии гломерулонефрита у мышей. По-видимому, для решения подобных вопросов более подходящим может оказаться использование «гуманизированных» трансгенных мышей, экспрессирующих плазминоген человека [35].

Критический анализ проблемы моделирования PSGN отнюдь не исключает участия стрептокиназы в генезе данного заболевания. Речь идет лишь о том, является ли она пусковым механизмом, иницирующим процесс, или служит важным звеном развития патологии. Достаточно убедительные данные японских исследователей [30, 31], полученные на клиническом материале, свидетельствуют о непосредственном участии этого фермента СГА в PSGN, поскольку он активирует плазмин путем расщепления плазминогена, что ведет к форми-

рованию комплекса плазмин–NAP1r с протеолитическим действием в отношении структуры гломерул. Наши опыты по моделированию гломерулонефрита позволяют рассматривать эту активность как вторичную — она проявляется тем глубже, чем значительнее первичное поражение ткани почек, вызванное иммунными комплексами IgG–анти-IgG, индуцированными IgG Fc⁺ белками СГА. Нефритогенная активность подобных иммунных комплексов вряд ли может вызвать сомнение, она была доказана еще пионерами этого направления в первой половине прошлого века [7, 33, 34].

Заключение

Исследование способности стрептокиназы, выделенной из различных M-типов СГА (M1, M12 и M22), трансформировать плазминоген различной видовой принадлежности в плазмин в опытах *in vitro* показало четко выраженную функциональную активность стрептокиназы в отношении только плазминогена человека. Стрептокиназа не способна была активировать мышинный плазминоген и крайне слабо активировала плазминоген кролика. Для выяснения роли стрептокиназы в индукции экспериментального гломерулонефрита у кроликов использована модель, при которой в имплантированные подкожно тканевые камеры инъецировали стрептококки группы А типов M1 или M22 и их *ska*⁻ мутанты. Данными опытами не установлена роль стрептокиназы в инициации патологического процесса в почечной ткани, так как не было выявлено различия в развитии гломерулонефрита между исходными штаммами стрептококков типов M1 и M22 и их *ska*⁻ изогенными мутантами. На кроличьей модели с использованием живых СГА, вводимых в подкожно имплантированные камеры, была подтверждена роль IgG Fc-связывающих M-подобных белков в инициации экспериментального гломерулонефрита. Проведен сравнительный анализ условий по моделированию PSGN на двух видах лабораторных животных — мышах и кроликах — с оценкой их преимуществ и недостатков.

Благодарности

Авторы выражают благодарность доктору Schalen С. за приобретение для данного исследования тканевых камер, а также доктору Sjobring U. (Отдел медицинской микробиологии, Лундский университет, Швеция) за возможность выполнения в его лаборатории опытов по способности стрептокиназы ряда M-типов СГА трансформировать плазминоген различного видового происхождения в плазмин.

Список литературы/References

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 М12 связывать иммунные комплексы и их роль в патогенезе постстрептококкового гломерулонефрита // Медицинская иммунология. 2006. Т. 8, № 5–6. С. 623–630. [Burova L.A., Gavrilova E.A., Pigarevskiy P.V., Seliverstova V.G., Nagornev V.A., Schalen K., Totolian Artem A. Capacity of group A type M12 streptococci to bind immune complexes and their role in pathogenesis of post-streptococcal glomerulonephritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, vol. 8, no. 5–6, pp. 623–630. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2006-5-6-623-630
2. Бурова Л.А., Королева И.В., Тотолян Артем А. Выявление и оценка биологической активности рецепторов у штаммов стрептококков, выделенных от носителей и больных // Вестник Академии медицинских наук СССР. 1989. № 6. С. 30–34. [Burova L.A., Koroleva I.V., Totolian Artem A. Identification and evaluation of the biological activity of receptors in streptococcal strains isolated from carriers and patients. *Vestnik Akademii medicinskih nauk SSSR = Bulletin of the Medical Sciences Academy of the USSR*, 1989, no. 6, pp. 32–37. (In Russ.)]
3. Бурова Л.А., Тотолян А.А. Роль стрептококковых Fc рецепторов для IgG в формировании микробного очага и развитии иммунопатологических состояний // Ревматология. 1988. № 3. С. 9–12. [Burova L.A., Totolian A.A. The role of streptococcal Fc receptors for IgG in the formation of a microbial focus and the development of immunopathological conditions. *Revmatologiya = Rheumatology*, 1988, no. 3, pp. 9–12. (In Russ.)]
4. Гаврилова Е.А. Сравнительная оценка экспериментальных моделей изучения патогенеза острого постстрептококкового гломерулонефрита // Медицинский академический журнал. 2004. Т. 3, № 4. С. 34. [Gavrilova E.A. Comparative evaluation of experimental models for studying the pathogenesis of acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal = Medical Academic Journal*, 2004, vol. 3, no. 4, p. 34. (In Russ.)]
5. Тотолян А.А., Бурова Л.А. Fc-рецепторные белки *Streptococcus pyogenes* и патогенез постинфекционных осложнений (критический обзор) // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 3. С. 78–90. [Totolian Artem A., Burova L.A. Fc-receptor proteins of *Streptococcus pyogenes* and pathogenesis of post-infection complications. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 3, pp. 78–90. (In Russ.)]
6. Тотолян А.А., Бурова Л.А., Нагорнев В.А., Пигаревский П.В. Анализ механизмов развития иммунопатологического постстрептококкового гломерулонефрита (APSGN) // Терапевтический архив. 2008. Т. 80, № 6. С. 90–95. [Totolian A.A., Burova L.A., Nagornev V.A., Pigarevskiy P.V. Analysis of mechanisms of development of immunopathological post-streptococcal glomerulonephritis (APSGN). *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2008, vol. 80, no. 6, pp. 90–95. (In Russ.)]
7. Тотолян А.А., Бурова Л.А., Пигаревский П.В. Экспериментальный постстрептококковый гломерулонефрит. СПб.: Издательство «Человек», 2019. 108 с. [Totolian A.A., Burova L.A., Pigarevskiy P.V. Experimental post-streptococcal glomerulonephritis. *St. Petersburg: "Chelovek" Publishing House*, 2019. 108 p. (In Russ.)]
8. Тотолян Артем А. Патогенность стрептококков и ее молекулярные и генетические механизмы. Л., Наука, 1988. 18 с. [Totolian Artem A. Pathogenicity of streptococci and its molecular and genetic mechanisms. *Leningrad: Nauka*, 1988. 18 p. (In Russ.)]
9. Тотолян Артем А., Бурова Л.А. Критический анализ предполагаемых механизмов патогенеза постстрептококкового гломерулонефрита // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001, Т. 3, № 4. С. 316–323. [Totolian Artem A., Burova L.A. Critical analysis of the proposed mechanisms of pathogenesis of post-streptococcal glomerulonephritis. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, vol. 3, no. 4, p. 316–323. (In Russ.)]
10. Bajaj S.P., Castellino F.J. Activation of human plasminogen by equimolar levels of streptokinase. *J. Biol. Chem.*, 1977, vol. 252, pp. 492–498.
11. Barabas A.Z., Cole C.D., Lafreniere R., Weir D.M. Immunopathological events initiated and maintained by pathogenic IgG autoantibodies in an experimental autoimmune kidney disease. *Autoimmunity*, 2012, vol. 45, no. 7, pp. 495–509. doi: 10.3.109/089.934.2012.70281216
12. Burova L., Pigarevskiy P., Duplik N., Snegova V., Suvorov A., Schalen C., Totolian A. Immune complex binding *Streptococcus pyogenes* type M12/emml2 in experimental glomerulonephritis. *JMM*, 2013, vol. 62, pt. 9, pp. 1272–1280. doi: 10.1099/jmm.0.059196-0
13. Burova L., Thern A., Pigarevskiy 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, vol. 111, pp. 955–962. doi: 10.1034/j.1600-0463.2003.1111007.x
14. Burova L.A., Christencen P., Grubb R., Schalen C., Svensson M.-L., Beltukov P.P., Totolian Artem A. Anti-immunoglobulins in experimental streptococcal immunization: relation to bacterial growth conditions and Fc-receptors. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, 1985, vol. 93, pp. 19–23. doi: 10.1111/j.1699-0463.1985.tb02916.x
15. Burova L.A., Pigarevskiy P.V., Seliverstova V.G., Gupalova T.V., Schalen C., Totolian A.A. Experimental post-streptococcal glomerulonephritis elicited by IgG Fc-binding M family proteins and blocked by IgG Fc-fragment. *APMIS*, 2012, vol. 120, pp. 221–230. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02826.x
16. Cu G.A., Mezzano S., Bannan J.D., Zabriskie J.B. Immunohistochemical and serological evidence for the pole of streptococcal proteinase in acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Kidney Int.*, 1998, vol. 54, no. 3, pp. 819–826. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00052.x
17. Cunningham M.W. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2000, vol. 13, no. 3, pp. 470–511. doi: 10.1128/cmr.13.3.470-511.2000
18. Greenwood F.C., Hunter W.M., Glover J.S. The preparation of ¹²⁵I-labelled human growth hormone of high specific activity. *Biochem. J.*, 1963, vol. 89, no. 1, pp. 114–123. doi: 10.1042/bj0890114

19. Heat D.G., Cleary P.P. Fc-receptor and M-protein genes of group A streptococci are products of gene duplication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, no. 12, pp. 4741–4745. doi: 10.1073/pnas.86.12.4741
20. Holm S.E. Hypothesis on the pathogenesis of post-streptococcal glomerulonephritis based on recent clinical and experimental research. *Zbl Bact. Hug.*, 1990, vol. 274, no. 3, pp. 325–332. doi: 10.1016/s0934-8840(11)80689-4
21. Huang T.T., Malke H., Ferretti J.J. The streptokinase gene of group A streptococci: cloning, expression in *Escherichia coli*, and sequence analysis. *Mol. Microbiol.*, 1989, vol. 3, no. 2, pp. 197–205. doi: 10.1111/j.1365-2958.1989.tb01808.x
22. Johnston K.H., Chaiban J.I., Wheeler R.C. Analysis of the variable domain of the streptokinase gene from streptococci associated with post-streptococcal glomerulonephritis. *Zbl Bact.*, 1992, vol. 22, pp. 339–342.
23. Malke H. Polymorphism of the SK gene: implication for the pathogenesis of post-streptococcal glomerulonephritis. *J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.*, 1993, vol. 278, pp. 3686–3693. doi: 10.1016/S0934-8840(11)80842-X
24. Myhre E.B., Kronvall G. Binding of murine myeloma proteins of different Ig classes and subclasses to Fc-reactive surface structures in gram-positive cocci. *Scand. J. Immunol.*, 1980, vol. 11, pp. 37–46. doi: 10.1111/j.1365-3083.1980.tb00206.x
25. Myhre E.B., Kronvall G. Specific binding of bovine, ovine, caprine and equine IgG subclasses to defined types of immunoglobulin receptors in gram-positive cocci. *Comp. Immun. Microb. Infect. Dis.*, 1981, vol. 4, no. 3–4, pp. 317–328. doi: 10.1016/0147-9571(81)90018-7
26. Neville D.M. Jr. Molecular weight determination of protein–dodecyl sulphate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. Biol. Chem.*, 1971, vol. 246, pp. 6328–6334. doi: 10.1111/j.1365-3083.1980.tb00206.x
27. Nordstrand A., McShan W.M., Ferretti J.J., Stig E., Holm S.E., Norgren M. Allele substitution of the streptokinase gene reduces the nephritogenic capacity of group A streptococcal strain NZ131. *Infect. Immun.*, 2000, vol. 68, no. 3, pp. 1019–1025. doi: 10.1128/iai.68.3.1019-1025.2000.
28. Nordstrand A., Norgren M., Ferretti J.J., Holm S.E. Pathogenic mechanism of acute poststreptococcal glomerulonephritis. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1999, vol. 31, no. 6, pp. 523–537. doi: 10.1080/00365549950164382
29. Nordstrand A., Norgren M., Holm S.E. An experimental model for acute glomerulonephritis in mice. *APMIS*, 1996, vol. 104, pp. 805–816. doi: 10.1111/j.1699-0463.1996.tb04946.x.
30. Oda T., Yoshizawa N., Yamakami K., Tamura K., Kuroki A., Sugisaki T., Sawanobori E., Higashida K., Ohtomo Y., Hotta O., Kumagai H. Localization of nephritis-associated plasmin receptor in acute poststreptococcal glomerulonephritis. *Hum. Pathol.*, 2010, vol. 41, no. 9, pp. 1276–1285. doi: 10.1016/j.humpath.2010.02.006.
31. Oda T., Yoshizawa N., Yamakami K., Yutaka Sakurai Y., Hanako Takechi H., Yamamoto K., Oshima N., Kumagai H. The role of nephritis-associated plasmin receptor (NAPlr) in glomerulonephritis associated with streptococcal infection. *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2012, no. 6: 417675. doi: 10.1155/2012/417675
32. Okada K., Katano T., Kamogashira T., Zahn R.J., Morimito Y., Kagami S., Yasutomo K., Kuhara T., Kuroda Y. Streptokinase gene variable region classification in streptococci: lack of correlation with post-streptococcal glomerulonephritis. *Clin Nephrol.*, 1995, vol. 44, no. 1, pp. 8–13.
33. Rodrigues-Iturbe B., Haas M. Post-streptococcal glomerulonephritis. In: *Streptococcus pyogenes: basic biology to clinical manifestations* / Ed. by J.J. Ferretti, D.L. Stevens, V.A. Fischetti. Oklahoma City: University of Oklahoma, Health Sciences Center, 2017, pp. 869–892.
34. Rodriguez-Iturbe B., Musser J.M. The current state of poststreptococcal glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2008, vol. 19, no. 10, pp. 1855–1864. doi: 10.1681/asn.200801009
35. Sun H., Ringdahl U., Homeister J.W., Fay W.P., Engleberg N.C., Yang A.Y., Rozek L.S., Wang X., Sjöbring U., Ginsburg D. Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. *Science, New Series*, vol. 305, no. 5688, pp. 1283–1286. doi: 10.1126/science.1101245
36. Tombin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, pp. 4350–4354. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350

Авторы:

Булова Л.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии, ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Гаврилова Е.А., к.м.н., зав. кардиологическим отделением ГБУЗ Госпиталь для ветеранов войн, Санкт-Петербург, Россия;
Пигаревский П.В., д.б.н., руководитель отдела общей морфологии, ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Тотolian Артем А., академик РАН, д.м.н., 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;
Gavrilova E.A., PhD (Medicine), Head of the Cardiology Department, Hospital for Veterans, St. Petersburg, Russian Federation;
Pigarevsky P.V., PhD, MD (Biology), Head of the Department of General Morphology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Totolian Artem A., RAS full member, PhD, MD (Medicine), Head Researcher, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.04.2021
 Принята к печати 28.03.2021

Received 17.04.2021
 Accepted 28.03.2021