

на правах рукописи



Хасбиуллина Наиля Рамилевна

**РЕПЕРТУАР АНТИГЛИКАНОВЫХ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА
В ПЕРВЫЕ МЕСЯЦЫ ЖИЗНИ**

03.01.04 Биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва 2019

Работа выполнена в лаборатории углеводов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор
Бовин Николай Владимирович

Официальные оппоненты:

Филатов Александр Васильевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России), заведующий лабораторией иммунохимии.

Мягкова Марина Александровна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН), заведующая лабораторией иммунохимии физиологически активных веществ.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

Защита состоится «__» _____ 2019 г. в часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 002.247.01,

кандидат биологических наук А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Естественными называются антитела, которые обнаруживаются в крови человека и млекопитающих в отсутствие явной специфической антигенной стимуляции. Репертуар и уровни этих иммуноглобулинов относительно постоянны в течение жизни, не зависят от пола и расовой принадлежности индивидов, мало зависят от места рождения и состава пищи. Репертуар естественных антител (ЕАТ) проявляет стабильность в пределах отдельно взятого организма, а также консервативность не только в популяции данного вида, но и в некоторой степени между видами. Естественные иммуноглобулины являются полиреактивными и низкоаффинными (в отличие от специфических высокоаффинных адаптивных иммуноглобулинов), и способны распознавать как собственные, так и чужеродные антигены. Часть пула ЕАТ направлена к гликанам – компонентам гликолипидов, гликопротеинов и полисахаридов. Наиболее известными являются антитела, направленные к антигенам систем групп крови АВ0, Le, Ii и Pp, а также ксено- и опухолеассоциированным антигенам.

Интерес к изучению ЕАТ связан, прежде всего, с функциями, которые они выполняют в организме, а также их происхождением, которое до сих пор является предметом дискуссий. Значительное внимание уделяется исследованию действия факторов, способных оказать влияние на процесс формирования репертуара ЕАТ: питания, микроорганизмов микрофлоры, применения лекарственных препаратов, перенесенных в раннем возрасте заболеваний, а также фактора наследственности.

Изучение антигликановых иммуноглобулинов затруднено из-за широкого их репертуара. Поэтому в работе был использован микроэррей – чип с иммобилизованными на его поверхности несколькими сотнями гликанов (далее – гликочип); этот формат имеет ряд дополнительных преимуществ по сравнению с традиционным твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА), в частности, низкие фоновые значения и широкий динамический диапазон величины сигналов.

Степень разработанности области исследования.

К настоящему моменту получены важные данные о закономерностях и особенностях функционирования системы врожденного иммунитета; накоплен обширный фактический материал, свидетельствующий о присутствии в организме большого разнообразия естественных иммуноглобулинов, способных связывать широкий спектр молекул различного происхождения. Являясь частью системы врожденного иммунитета, эти иммуноглобулины выполняют важные функции – защиты от патогенов, клиренса метаболитов, а также надзора за постоянно появляющимися трансформированными

клетками. В то же время, систематических исследований репертуара ЕАТ, в том числе направленных к гликанам, в действительности немного, и они пока не в состоянии дать ответа на вопрос о происхождении данной группы иммуноглобулинов и о действии факторов, влияющих на их продукцию в организме.

Изучение репертуара иммуноглобулинов в крови затруднено сложностью самого объекта исследования, содержащего сотни, а возможно и тысячи разнообразных по специфичности молекул. Классические методы исследования, например, иммуноферментный анализ, имеют серьезные ограничения по количеству определяемых антигенов в доступном для работы объеме образца крови. Гликочип позволяет выявлять иммуноглобулины, направленные к нескольким сотням антигенов одновременно, используя при этом 50-100 мкл сыворотки крови, что существенно расширяет возможности исследований в данной области, а также открывает перспективы использования данного метода в медицине.

Цель и задачи исследования.

Цель работы: изучение генезиса антигликановых иммуноглобулинов и закономерностей формирования их репертуара.

Задачи исследования:

1. Изучить репертуар антигликановых иммуноглобулинов на модели мышей-гнотобиотов, которые контактировали с микроорганизмами, входящими в состав нормальной микрофлоры млекопитающих и человека.
2. Изучить репертуар антигликановых иммуноглобулинов детей в развитии, в течение первого года их жизни.
3. Изучить роль фактора питания в процессе формирования репертуара антигликановых иммуноглобулинов у детей в течение первого года жизни.
4. Изучить репертуар антигликановых иммуноглобулинов в группе пациенток с нормальной и осложненной беременностью.
5. Улучшить качество гликочипа, который является основным инструментом исследования антигликановых иммуноглобулинов.

Научная новизна работы.

В современной литературе врожденный иммунитет описывается, прежде всего, с позиций ответа на антигены пептидной природы, в то время как ответ к гликанам охарактеризован в значительно меньшей степени.

В данной работе было проведено исследование репертуаров антигликановых антител человека (АГАТ) с момента рождения до двенадцатого месяца жизни; были найдены диагностически значимые АГАТ у пациенток, страдающих патологиями

беременности. С помощью исследований, проведенных на модельных животных, было показано, что репертуар антигликановых иммуноглобулинов формируется в результате активации В-клеток, а не иммунизации в классическом представлении. Обнаружена необычная динамика материнских IgG в крови детей в первые месяцы их жизни. Обнаружена избирательность передачи IgG от матери к ребенку. Предложена новая методология иммобилизации гликанов на чипе.

Научно-практическая значимость работы.

Полученные данные по диагностически значимым иммуноглобулинам востребованы клиницистами в области акушерства и гинекологии; на основе этих данных предпринимаются практические шаги по валидации тест-систем для выявления преэклампсии и синдрома задержки развития плода.

Усовершенствование методики печати гликочипов позволяет уменьшить расход гликанов и упростить контроль их качества.

Степень достоверности полученных результатов.

Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов обусловлена объемом экспериментального материала, а также использованием адекватных статистических методов.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Полноценный репертуар естественных иммуноглобулинов формируется в результате контакта иммунной системы с полноценным репертуаром интестинальных бактерий.
2. Питание является важным фактором формирования антигликановых иммуноглобулинов.
3. Сроки появления антигликановых иммуноглобулинов у человека не совпадают с теми, которые описаны в литературе для естественных антител.
4. У детей отсутствует ряд антигликановых антител, которые обнаруживаются у подавляющего большинства взрослых людей.
5. Репертуары антигликановых иммуноглобулинов при нормальной и патологически протекающей беременности достоверно отличаются.

Личный вклад диссертанта

Основные результаты работы были получены либо лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, оптимизацию методик, обработку, оформление и публикацию полученных данных. Обсуждение, обобщение, анализ и интерпретация результатов

исследований, формулировка основных положений диссертации, формирование структуры диссертации проводилось совместно с научным руководителем.

Публикации и апробация работы. По теме диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах. Материалы диссертации были представлены на следующих международных и российских конференциях: «I Всероссийская конференция «Фундаментальная Гликобиология», 2012, Казань, Россия; «5th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates», 2012, Суздаль, Россия; «17th European Carbohydrate Symposium», 2013, Тель-Авив, Израиль; «II Всероссийская конференция «Фундаментальная Гликобиология», 2014, Саратов, Россия; «3th International Conference and Exhibition on Probiotics, Functional and Baby Foods», 2014, Неаполь, Италия; «III Всероссийская конференция «Фундаментальная Гликобиология», 2016, Владивосток, Россия; «19th European Carbohydrate Symposium», 2017, Барселона, Испания; «IV Национальный конгресс «Дискуссионные вопросы современного акушерства», 2017, Санкт-Петербург, Россия, а также на XXIV и XXVI Зимних молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2012, 2014, Москва, Россия.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 166 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения и выводов, списка цитируемой литературы, включающего 472 ссылки. Диссертация содержит 12 рисунков, 17 таблиц и 2 приложения.

Термины и сокращения, использованные в тексте.

АГАТ – антигликановые антитела; ЕАТ – естественные антитела; ЛОС – липоолигосахарид; ОС – олигосахариды; ПС – полисахариды; -sp – спейсер – группа, необходимая для ковалентного связывания гликана с поверхностью чипа; SPF (specific pathogen free) – условия содержания лабораторных животных, предполагающие, что в окружающей их среде отсутствуют патогены, типичные для этого вида организмов; RFU (relative fluorescent units) – относительные флуоресцентные единицы; гнотобиоты – организмы, выращенные в стерильных условиях и затем подвергнутые определенному, заданному исследователем, воздействию; AUC (area under curve) – статистический термин; показатель качества классификатора (чем выше AUC, тем качественней классификатор), дающий количественную интерпретацию ROC-кривой ошибок; сигнатура – комбинация нескольких диагностически значимых маркеров; чувствительность метода – показатель частоты получения положительных результатов, т.е. «истинно положительные» результаты; специфичность метода – показатель частоты получения истинно отрицательных результатов у лиц, не страдающих данным заболеванием, т.е. «истинно

отрицательные» результаты; ПЭ – преэклампсия; СЗРП – синдром задержки развития плода; ГАГ – гестационная (ассоциированная с беременностью) артериальная гипертензия; ХАГ – хроническая артериальная гипертензия.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Использованные методы (кратко) и исследованные образцы

Гликочипы печатались партиями, обычно по 25 штук, из которых 2 подвергались проверке качества путем проявления стандартным образцом (коммерческим препаратом иммуноглобулина человека либо сывороткой крови здорового донора); на чип иммобилизовали ~600 гликанов двух типов: олигосахариды (ОС) – химически синтезированные компоненты гликопротеинов и гликолипидов млекопитающих, а также бактериальные полисахариды (ПС). Детекция связавшихся иммуноглобулинов сыворотки крови (как правило, IgG и IgM по-отдельности) проводилась на флуоресцентном сканере с помощью флуоресцентно-меченых анти-иммуноглобулиновых антител; диапазон интенсивностей при сканировании составлял 0 -65 535RFU (относительных флуоресцентных единиц), величина фона ~ 400 RFU. Изученные объекты исследования представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Группы изученных сывороток крови людей и животных.

Группы доноров / животных	Подгруппы доноров / животных	Количество образцов	Раздел работы
Мыши-гнотобиоты	сохранение условий стерильности	4	Исследование репертуара АГАТ в сыворотках крови мышей-гнотобиотов.
	контакт с <i>E.coli</i> W3110	4	
	контакт с <i>B.longum</i> NCC2705	4	
	контакт с <i>B.thetaiotaomicron</i> VPI-5482 (ATCC 29148)	4	
	контакт с <i>L.reuteri</i> SD2112 (ATCC 55730)	4	
	контакт с четырьмя вышеуказанными видами бактерий	4	
	переведенные на нестерильный лабораторный корм	4	
	гаваж непереваренной пищей нестерильных мышей	4	
нестерильные мыши	4		
Инбредные BALB/с мыши	SPF (specific pathogen free)	20	Исследование репертуара АГАТ в сыворотках крови инбредных мышей
Новорожденные в возрасте 3 дней и...		9	Исследование репертуара АГАТ в сыворотках крови детей первого года жизни.
их матери...		8	
Дети, получавшие различное питание в течение первого года (в 3, 6 и 12 месяцев) жизни и...	варианты питания	забор крови в 3, 6 и 12 месяцев	Исследование репертуара АГАТ в сыворотках крови детей первого года жизни.
	грудное молоко (ГМ)	5 + 5 + 5	
	стандартная молочная смесь (СМ)	5 + 5 + 5	
	смеси на основе частично гидролизованного белка молока (ЧГ)	5 + 5 + 5	
	смеси на основе глубоко гидролизованного белка молока (ГГ)	5 + 5 + 5	
...их матери		20	
Здоровые взрослые доноры		10	
Женщины с нормально и патологично протекающей беременностью, либо здоровые небеременные женщины	нормально протекающая беременность	95	Исследование репертуара АГАТ в сыворотках крови пациенток с нормально и патологично протекающей беременностью
	СЗРП (синдром задержки развития плода)	53	
	ХАГ (хроническая артериальная гипертензия в анамнезе)	28	
	ГАГ (гестационная артериальная гипертензия)	36	
	ПЭ (преэклампсия) умеренная и тяжелая	82	
	ПЭ, осложненная ХАГ	31	
Здоровые женщины фертильного возраста		26	

1. Формирование репертуара антител у мышей-гнотобиотов.

В этой части работы изучался репертуар антигликановых ЕАТ, образующихся в результате контакта организма животных-гнотобиотов с живыми бактериями. Антитела определяли через 4 недели после однократного введения антигена в ЖКТ.

1.1 Мыши, контактировавшие с бактериями одного или нескольких видов.

Группа мышей была подвергнута контакту с четырьмя штаммами разных видов бактерий: *E.coli* W3110, *B.longum* NCC2705, *B.thetaiotaomicron* VPI-5482 (ATCC 29148) и *L.reuteri* SD2112 (ATCC 55730). Четыре группы мышей подверглись контакту с одним штаммом бактерий: *E.coli* W3110, *B.longum* NCC2705, *B.thetaiotaomicron* VPI-5482 (ATCC 29148) или *L.reuteri* SD2112 (ATCC 55730); пятая группа контактировала со всеми четырьмя бактериями. Наблюдаемый через 1 месяц после контакта репертуар АГАТ в этих группах был ограничен – были выявлены антитела лишь к нескольким гликанам, которые к тому же отмечались не у всех особей в группе (Таблицы 2 и 3).

1.2 Мыши-гнотобиоты, переведенные на стандартное питание. Одна группа мышей, питавшаяся изначально стерильным кормом, была переведена на стандартный корм, не прошедший никакой специальной обработки. В этой группе, спустя месяц, когда осуществлялся забор крови, не было отмечено (Таблица 4) возникновения широкого репертуара АГАТ.

Таблица 2. Антигликановые антитела, обнаруженные у мышей, контактировавших с одним видом бактерий.

Гликаны, к которым выявляются антитела	Число мышей (1-4), у которых отмечалось достоверное связывание антител с данным гликаном
Мыши, контактировавшие с <i>E.coli</i> W3110	
Gal α 1-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β	1
Fuca1-2Gal β 1-4GlcNAc β	1
ПС из <i>P.mirabilis</i> O31: [-3LQuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-6(S-Lac1-3)GlcNAc α 1-] _n ¹	1
Мыши, контактировавшие с <i>B.longum</i> NCC 2705	
GlcA β 1-6Gal β	1
Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GalNAc α	1
Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GalNAc β	1
GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GalNAc α	1
GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GalNAc β	1
ПС из <i>E.coli</i> O58: [-4(R-Lac2-3Rhap2Ac α 1-3)Man β 1-4Man α 1-3GalNAc β 1-] _n	1
ПС из <i>E.coli</i> O127: [-2Fuc3(65%)Ac4(35%)Ac α 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-3GalNAc α 1-] _n	2
ПС из <i>E.coli</i> O148: [-3Rha α 1-3Rha α 1-2Glc α 1-3GlcNAc α 1-] _n	1
ПС из <i>Sh.dysenteriae</i> type 1: [-3Rha α 1-3Rha α 1-2Gal α 1-3GlcNAc α 1-] _n	1
Мыши, контактировавшие с <i>L.reuteri</i> SD 2112 (ATCC 55730)	
Rha α	1
3,4-O-Su ₂ -Gal β 1-4GlcNAc β	3
GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-4)GalNAc α	1
GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GalNAc α	1
(GlcNAc β 1) ₃ -3,4,6-GalNAc α	1
GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GalNAc β	1
ПС из <i>E.coli</i> O127: [-2Fuc3(65%)Ac4(35%)Ac α 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-3GalNAc α 1-] _n	3
ПС из <i>E.coli</i> O148: [-3Rha α 1-3Rha α 1-2Glc α 1-3GlcNAc α 1-] _n	1
ПС из <i>P.mirabilis</i> O28: [-4(Lys2-6)GalA α 1-4Gal α 1-3(Ser-(2-6)GalA4Ac α 1-3GlcNAc β 1-] _n	1
ПС из <i>P.mirabilis</i> O31: [-3LQuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-6(S-Lac1-3)GlcNAc α 1-] _n	1
ПС из <i>Sh.dysenteriae</i> type 1: [-3Rha α 1-3Rha α 1-2Gal α 1-3GlcNAc α 1-] _n	1
Мыши, контактировавшие с <i>B.thetaiotaomicron</i> VPI-5482 (ATCC 29148)	
GalNAc β 1-4GlcNAc β	1
GalNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β	1
3-O-Su-GalNAc β 1-4GlcNAc β	1
6-O-Su-GalNAc β 1-4GlcNAc β	1
3,6-O-Su ₂ -GalNAc β 1-4GlcNAc β	3
6-O-Su-GalNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β	2
GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-4)GalNAc α	1
GlcNAc β 1-4(Fuca1-6)GlcNAc β	1
(GlcNAc β 1-4) ₆	1
ПС из <i>E.coli</i> O127: [-2Fuc3(65%)Ac4(35%)Ac α 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-3GalNAc α 1-] _n	1
ПС из <i>P.mirabilis</i> O31: [-3LQuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-6(S-Lac1-3)GlcNAc α 1-] _n	3

¹Информация о структурах полисахаридов содержится в базе данных Carbohydrate Structure Database (CSDB) <http://csdb.glycoscience.ru/bacterial/>

Таблица 3. Антигликановые антитела, обнаруженные у мышей, контактировавших с четырьмя видами бактерий².

Гликаны, к которым выявляются антитела	Число мышей (из 4), у которых отмечалось достоверное связывание антител с данным гликаном
Мыши, контактировавшие одновременно с четырьмя видами бактерий	
GalNAc β	3
Rha α	1
GalNAc β	2
(6-O-Bn-Gal β 1)-3(6-O-Bn)GlcNAc β	2
GlcA β 1-6Gal β	1
(GalNAc β -PEG) ₃ - β -Asp-Asp	3
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β	1
GalNAc α 1-4(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β	2
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α	3
ПС из <i>E. coli</i> O127: [-2Fuc3(65%)Ac4(35%)Ac α 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-3GalNAc α 1-] _n	3
ПС из <i>E. coli</i> O148: [-3Rha α 1-3Rha α 1-2Glc α 1-3GlcNAc α 1-] _n	1
ПС из <i>P. mirabilis</i> O13: [-3GlcNAc β 1-3(S,R-CetLys2-6GalA α 1-4)Gal α 1-] _n	1
ПС из <i>Sh. dysenteriae</i> type 7: [-GalNAcA3Ac6NH2 α 1-4GalNAcA α 1-3GlcNAc-] _n	1

Таблица 4. Антигликановые антитела, обнаруженные у мышей, переведенных на стандартное нестерильное питание.

Гликан	Число мышей (из 4), у которых отмечалось достоверное связывание антител с гликаном
3,4-O-Su ₂ -Gal β 1-4GlcNAc β	1
3-O-Su-GalNAc β 1-4GlcNAc β	1
3,6-O-Su ₂ -GalNAc β 1-4GlcNAc β	2
ПС из <i>E. coli</i> O58: [-4(R-Lac2-3Rhap2Ac α 1-3)Man β 1-4Man α 1-3GalNAc β 1-] _n	1
ПС из <i>E. coli</i> O127: [-2Fuc3(65%)Ac4(35%)Ac α 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-3GalNAc α 1-] _n	1
ПС из <i>P. aeruginosa</i> O4ac: [-2Rha α 1-3FucNAc α 1-3FucNAc α 1-3D-FucNAc α 1-] _n	1

1.3 Мыши, однократно подвергнутые гаважу переваренной пищей нестерильных мышей. Репертуары АГАТ в данной группе животных принципиально отличались от описанных выше: иммуноглобулины этих мышей связывались с относительно большим числом гликанов - с 26 олиго- и 26 полисахаридами; кроме того, было отмечено, что индивидуальные отличия между особями группы были минимальными.

1.4 Мыши с сохранением условий стерильности были использованы в качестве контрольной группы. В данной группе антител практически не было.

1.5 Нестерильные лабораторные мыши. В сыворотках крови животных, выращенных в стандартных лабораторных условиях, содержащихся в общих клетках и признанных здоровыми, были обнаружены антитела, направленные более чем к 100

²Так как полисахариды представлены в этой работе существенно меньше олигосахаридов, и для более удобного сравнения, мы использовали для полисахаридов номенклатуру олигосахаридов.

гликанам из ~400, иммобилизованных на чипе. Таким образом, по разнообразию АГАТ, мыши с однократно произведенным гаважем оказались сопоставимыми с данной группой; по специфичности детектированных антител также отмечалось сходство этих двух групп - более четверти всех обнаруженных антител были общими (Таблица 5).

Таблица 5. Гликаны, с которыми связываются антитела в сыворотках крови мышей после однократно произведенного гаважа переваренным материалом и в группе нестерильных мышей.

Rha α
ManNAc β
GlcNAc α
GlcNAc β 1-3GalNAc α
GlcNAc β 1-4GlcNAc β
GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Asn
Gal α 1-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β
Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GalNAc α (blood group B)
GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GalNAc α (blood group A)
GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GalNAc β (blood group A)
ЛОС из <i>E.coli</i> O14: -Gal α 1-2Gal α 1-2(Gal β 1-4)Glc α 1-3Glc α 1-inner core-lipid A
ПС из <i>E.coli</i> O58: [-4(R-Lac2-3Rhap2Ac α 1-3)Man β 1-4Man α 1-3GalNAc β 1-] _n
ПС из <i>E.coli</i> O95: [-3Fuca1-3Xluf β 1-] _n
ПС из <i>E.coli</i> O127: [-2Fuc3(65%)Ac4(35%)Ac α 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-3GalNAc α 1-] _n
ПС из <i>E.coli</i> O148: [-3[Rha α 1-3Rha α 1-2Glc α 1-3GlcNAc α 1-] _n
ПС из <i>P.mirabilis</i> O13: [-4(Lys2-6)Gal α 1-4Gal α 1-3(Ser-(2-6)GalA4Ac α 1-3GlcNAc β 1-] _n
ПС из <i>P.mirabilis</i> O31: [-3LQuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-6(S-Lac-1-3)GlcNAc α 1-] _n
ПС из <i>S.enterica</i> O13: [-2Fuca1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-3GlcNAc α 1-] _n (blood group H)
ПС из <i>Sh.boydii</i> type 17: [-6(R-Lac2-4)Glc β 1-4GalNAc α 1-3GalNAc β 1-] _n
ПС из <i>Sh.dysenteriae</i> type 1: [-3Rha α 1-3Rha α 1-2Gal α 1-3GlcNAc α 1-] _n
ПС из <i>Sh.dysenteriae</i> type 7: [-GalNAcA3Ac6NH2 α 1-4GalNAcA α 1-3GlcNAc-] _n
ПС из <i>Sh.flexneri</i> type 6b: [-2Rha3(60%)Ac4(30%)Ac α 1-2Rha α 1-4GalA β 1-3GalNAc β 1-] _n

1.6. Мыши линии BALB/c, выращенные в SPF условиях. Изучение антител крови этих мышей выявило, что в группе инбредных, т.е. генетически близких особей, обитавших в одинаковых условиях, репертуары антител похожи, но не идентичны. Из 419 гликанов чипа антитела мышей данной группы связывались всего с 71 гликаном, из которых только 7 были общими для всех 20 особей данной группы (Рисунок 1).

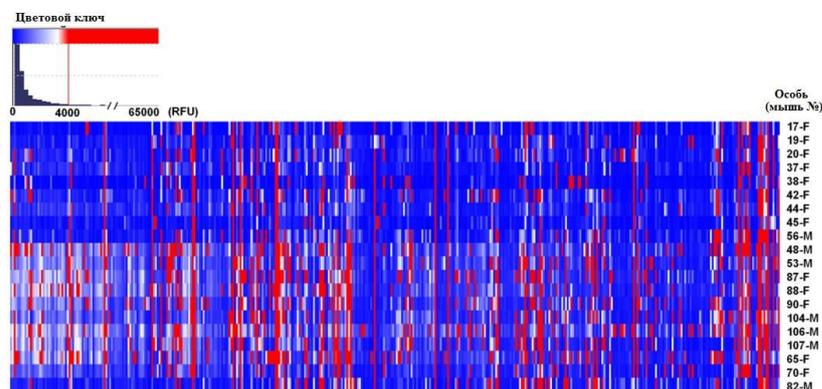


Рисунок 1. Тепловая карта, представляющая репертуары АГАТ в сыворотках крови мышей BALB/C, выращенных в SPF условиях. Значимые сигналы (значения, выше 4000 RFU) отмечены красным цветом.

2. Исследование репертуара антител детей первого года жизни.

Несмотря на активные предшествующие исследования в области изучения детского иммунитета, а также общепринятое представление о важности первых дней жизни ребенка для адекватного развития звеньев его иммунитета, о специфичности антител у плода и новорожденного известно крайне мало - в связи с объективной сложностью получения материала для исследований.

2.1 АГАТ детей в возрасте 3 дней, их матерей и пуповинной крови.

Были проанализированы репертуары АГАТ IgG и IgM в сыворотках крови новорожденных в возрасте 3 дней, их матерей, а также в пуповинной крови. Наблюдалось почти полное отсутствие значимых сигналов связывания IgM с гликанами чипа в сыворотках крови новорожденных и в пуповинной крови, что согласуется с литературными данными. Относительно IgG известно, что иммуноглобулины этого класса передаются ребенку на стадии внутриутробного развития. Однако сведений о специфичности передаваемых от матери к ребенку IgG нет, и в нашей работе при сравнении пар «ребенок и его мать» было найдено, что по репертуару IgG они совпадают лишь частично. Оценивать качественные различия при небольшом количестве доноров трудно, однако для пяти гликанов (Таблица 6) справедливо то, что при высоком титре у матери, эти иммуноглобулины совсем не детектируются у детей. На основе вышесказанного, можно говорить об избирательном характере внутриутробной передачи IgG.

Таблица 6. Гликаны, антитела (IgG) к которым отсутствуют у детей, но присутствуют в высоком титре у матерей.

ManNAc β
Rha α
GlcNAc β 1-4GlcNAc β
GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β
Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β

Гликаны, к которым обнаруживается связывание IgG у всех девяти детей, представлены в Таблице 7.

Таблица 7. Гликаны, к которым обнаруживаются IgG у всех девяти новорожденных.

Гликан
Gal α 1-3GlcNAc β
GlcNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β
GlcNAc β 1-4Mur-L-Ala-D-i-Gln-Lys
GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α
GlcNAc β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β
GlcNAc β 1-6 (GlcNAc β 1-4)GalNAc α
Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β

Антитела к этим гликанам у взрослых доноров также входят в доминирующую группу.

2.2 АГАТ детей в возрасте 3, 6 и 12 месяцев.

Показано, что в течение первого года жизни разнообразие и титры IgG снижаются. Для IgM характерна противоположная тенденция: в возрасте 3 и 6 месяцев АГАТ практически не обнаруживаются, но в возрасте 12 месяцев репертуар IgM разнообразен и сопоставим со взрослыми индивидами (Рисунок 2).

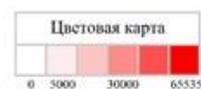
Разнонаправленные тенденции в динамике IgG и IgM (снижение первых и рост уровня вторых) объясняются физиологическими особенностями «поведения» иммуноглобулинов этих двух классов. IgG преодолевает фетоплацентарный барьер, в то время как IgM в норме не обладает такой способностью, и полученные нами данные по АГАТ в целом согласуются с литературными, которые касаются иммуноглобулинов в целом, безотносительно их специфичности. В то же время, обнаруживается и противоречие: независимо от типа питания, у всех детей в возрасте 3 месяцев всё ещё наблюдается широкое разнообразие IgG, которое существенно снижается в изученных нами точках 6 и 12 месяцев. Если эти антитела были переданы внутриутробно, то их период полу-жизни согласно нашим данным существенно превышает конвенционный период 21 – 22 дня³.

Различия в репертуарах IgM в группах детей, получавших различное питание, рассмотрены для 12-месячных детей. К этому возрасту наблюдался максимум их разнообразия (Рисунок 3). Репертуар IgG в данном случае не описывается, потому что, во-первых, не исключается прямое влияние IgG материнского происхождения, и, во-вторых, интересующие нас ЕАТ принадлежат преимущественно к классу *M*. Максимальное разнообразие иммуноглобулинов наблюдается в группе детей, которых кормили смесями, изготовленными на основе частично гидролизованного белка. Примечательно, что группа детей, питавшихся грудным молоком, т.е. те дети, которые максимально тесно контактировали с матерью после рождения, имеет самый узкий репертуар IgM.

³См., например, Roopenian, D. C., and Akilesh, S. (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 715–725

		20 детей в возрасте 3, 6 и 12 месяцев						Их матери (20)	
		IgG						IgG	
		ОС			ПС			ОС	ПС
		3м	6м	12м	3м	6м	12м		
ГМ		102	62	53	122	71	44	47	33
		69	14	8	97	21	9	39	50
		52	41	33	65	45	14	73	43
		90	48	18	102	30	14	89	32
		40	16	9	63	23	17	27	44
СС		88	37	40	76	40	28	26	47
		59	36	14	61	34	12	99	33
		68	18	63	61	22	59	19	29
		72	37	18	77	24	9	69	49
		65	38	95	101	56	73	32	58
ГТС		60	22	8	72	27	8	23	29
		2	46	29	5	35	15	63	58
		104	44	18	88	16	13	22	24
		69	26	23	71	33	14	31	22
		50	67	28	74	103	19	13	18
ЧГС		63	27	44	81	36	17	7	29
		76	53	48	108	68	39	28	29
		69	36	25	97	57	32	8	31
		184	57	41	125	45	26	9	24
		69	41	41	98	45	28	46	41
		IgM						IgM	
		ОС			ПС			ОС	ПС
		3м	6м	12м	3м	6м	12м		
ГМ		14	4	14	3	5	11	119	71
		3	1	21	4	4	19	104	86
		4	49	119	3	12	27	43	57
		4	5	23	5	9	34	199	111
		4	2	10	5	3	7	127	97
СС		13	6	90	2	14	94	115	90
		2	1	31	3	6	26	188	111
		2	3	2	3	5	4	72	56
		6	2	2	2	3	1	34	63
		3	16	199	2	20	41	175	120
ГТС		3	3	22	2	3	13	71	51
		23	2	36	31	7	25	1	3
		6	1	56	5	5	53	92	63
		2	12	42	5	12	28	70	46
		1	3	117	1	7	78	38	48
ЧГС		3	8	108	2	5	81	66	85
		12	13	99	5	9	86	118	77
		2	1	39	2	7	58	53	85
		2	20	81	2	14	62	46	47
		3	40	117	2	27	37	111	82
		10 здоровых доноров							
		IgG		IgM					
		ОС	ПС	ОС	ПС				
		21	131	12	116				
		161	124	97	121				
		109	118	157	81				
		96	115	53	27				
		87	125	39	102				
		130	129	136	128				
		170	136	286	148				
		65	84	77	113				
		80	87	122	112				
		44	37	103	26				
						Обозначения на рисунке: ГМ - грудное молоко; СС - стандартная молочная смесь; ГТС - смесь на основе глубоко гидролизованного белка; ЧГС - смесь на основе частично гидролизованного белка; 3м, 6м, 12м - 3, 6 и 12 месяцев соответственно (возраст детей)			

Рисунок 2. Динамика антигликановых иммуноглобулинов IgG и IgM в сыворотках крови детей 3, 6 и 12 месяцев, получавших различное питание, а также в сыворотках крови их матерей и десяти здоровых неродственных доноров. Цифрами показано абсолютное количество гликанов (олиго- и полисахаридов), которые связывают иммуноглобулины из сыворотки крови.



№ гликана	Структура	Дети с различными типами питания			
		Грудное молоко	Молочная смесь на основе коровьего молока	Смеси на основе глубокого гидролиза белка коровьего молока	Смеси на основе частичного гидролиза белка коровьего молока
002	Gal α				
003	Gal β				
100	Gal β 1-6Gal β				
101	GalNAc α 1-3GalNAc β				
102	GalNAc α 1-3Gal β				
103	GalNAc α 1-3GalNAc α				
111	Glc β 1-4Glc β				
113	GlcNAc β 1-3GalNAc α				
118	GlcNAc β 1-6GalNAc α				
137	Gal β 1-4Glc β -аминокислота				
142	GlcNAc α 1-3GalNAc β				
146	Gal β 1-4(6-O-Su)Glc β				
166	GlcA β 1-6Gal β				
225	Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β				
242	GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β				
264	Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β				
396	(GlcNAc β 1) $_3$ -3,4,6-GalNAc α				
485	Gal β 1-4GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β				
506	Aras				
1008	<i>S. enterica</i> O67				
1232	<i>E. coli</i> O14				
1233	<i>E. coli</i> O19ab				
1234	<i>Escherichia coli</i> O27				
1239	<i>Escherichia coli</i> O54				
1403	<i>P. aeruginosa</i> O11ab				
1603	<i>P. mirabilis</i> 3B-m				
1605	<i>P. mirabilis</i> O11				
1606	<i>P. mirabilis</i> O13				
1610	<i>P. mirabilis</i> O31				
1614	<i>P. mirabilis</i> O3ab				

Рисунок 3. Гликаны, с которыми связываются IgM детей в возрасте 12 месяцев, в группах, получавших различные варианты питания.

Репертуар IgM, связывающих олигосахариды в сыворотках крови детей в возрасте 12 месяцев, в сравнении со взрослыми донорами, представлен в Таблице 8.

Таблица 8. Олигосахариды, к которым у взрослых здоровых доноров наиболее часто встречаются АГАТ, и наличие / отсутствие антител к этим гликанам у детей («+» означает наличие достоверно значимого сигнала у одного из пяти детей в данной группе, "++" у двоих, и т.д.). Серым цветом помечены гликаны, к которым есть антитела у взрослых и практически нет у детей.

Структура гликана	Грудное молоко	Смесь на основе коровьего молока	Смеси на основе глубоко гидролизованного белка	Смеси на основе частично гидролизованного белка
Rha α	+	++	++	+++
Gal α 1-3GlcNAc β	++	+++	+	++++
GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	++	+++	++	+++++
Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β	+	+	+++	++
GalNAc α 1-3GalNAc α	++	++	+++++	++++
GalNAc α 1-3Gal β	+	++	+++	+++++
GlcNAc α 1-3GalNAc β	+	+++	+++	+++++
GalNAc α 1-3GalNAc β	+++	++	+++++	+++++
GlcNAc β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β	++	+++	+++	+++
Fuc β 1-3GlcNAc β	+	+	-	-
Gal α 1-3GalNAc(fur) β	-	-	+	-
Gal β 1-3GlcN(Fm) β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β	+	+	+	++
GlcNAc β 1-6GalNAc α	+	+++		+++++
Neu5Gc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β	+	+	-	-
KDN α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β	+	-	-	-
3-O-Su-GlcNAc β	+	+	-	++
GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-4)GalNAc α	++	++	+++	+++
GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β	+	+++	-	-
Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β	++++	+++	+++++	+++++
Gal β 1-3GlcNAc β	+	-	-	-
GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α	-	++	-	-
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β	+	-	-	-
Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	+	+	+++	+++
Gal β 1-3GlcN(Fm) β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	+	+	-	-
Gal α 1-4GlcNAc β	-	++	+	+++
Gal α 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	+	++	+++	++++
Gal α 1-4GlcNAc β	-	+	+	-
Fuc α 1-3GlcNAc β	-	++	-	-
ManNAc β -Gly	++	++	++	+++++
GlcNAc β 1-3GalNAc α	-	+++	+++	+++++
GlcNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β	++	++	+	++
GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Gly	+	++	-	++++
Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β		-	+++	-
GlcA β 1-3GlcNAc β	-	++	-	-
Gal β 1-3GlcNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β	-	-	-	-
6-O-Su-Gal β 1-3GlcNAc β	+	-	-	-
Fuc α 1-4GlcNAc β	-	++	-	-
(GalNAc β -PEG ₂) ₃ - β -Lys-Lys	++	++	++	++++
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β	+	-	-	-
GlcNAc β	-	+	-	-

Проведенное сравнение показывает, что наиболее «приближенной» к взрослым донорам группой является та, в которой дети получали смесь, изготовленную на основе частично гидролизованного белка. Наиболее существенные отличия были выявлены между группой взрослых доноров и группой детей, питавшихся грудным молоком.

Примечательно, что у детей не обнаружены антитела к Le^c и структурно родственным гликанам, которые в репертуаре здоровых взрослых доноров обнаруживаются в высоких титрах и, как считается, играют важную роль в противоопухолевом иммунитете. Отметим также, что уровень этих иммуноглобулинов существенно (на фоне всех остальных антител, данные не показаны) падает у беременных женщин, но это справедливо для IgG. С уверенностью можно говорить о том, что формирование репертуара АГАТ продолжается и после достижения 12-месячного возраста.

3. Исследование репертуара АГАТ пациенток, страдающих акушерскими патологиями.

Беременность как особое состояние организма женщины характеризуется физиологической иммуносупрессией, обеспечивающей толерантное отношение в полуаллогенному плоду. В связи с этим мы предположили, что изменение иммунного статуса при беременности затрагивает репертуар АГАТ, причем в норме и при патологии эти изменения могут иметь различную направленность. Было проведено исследование репертуара иммуноглобулинов трехсот пятидесяти пациенток, выбранных и разделенных на группы по их акушерскому диагнозу. В результате были выявлены иммуноглобулины, точнее комбинации (сигнатуры) нескольких ЕАТ, которые представляют собой диагностически значимый фактор (от двух до семи иммуноглобулинов в сигнатуре) (Таблица 9).

Таблица 9. Диагностические сигнатуры иммуноглобулинов, выявляемые в крови пациенток с нормальной и осложненной беременностью.

Группы сравнения	Диагностические сигнатуры	AUC	Чувствительность / специфичность
Умеренная поздняя ПЭ /Здоровые беременные	2 олигосахарида	0.75	0.59/0.72
Ранняя ПЭ / здоровые беременные	2 полисахарида	0.9	0.67/0.86
Умеренная поздняя ПЭ/Гипертензивные расстройства	4 олигосахарида и 3 полисахарида	0.74	0.58/0.75
СЗРП/ Здоровые беременные	4 олигосахарида и 1 полисахарид	0.87	0.86/0.67

Такие показатели чувствительности / специфичности позволяют говорить о диагностической ценности выявленных сигнатур.

4. Усовершенствования гликочипа как инструмента изучения иммуноглобулинов.

Анализ данных, полученных при исследовании репертуаров иммуноглобулинов здоровых беременных женщин и пациенток с осложненной беременностью, выявил необходимость усовершенствования гликочипа, что мотивировало нас изменить подход к его производству. В результате был выбран другой тип материала подложки и другой вариант химического присоединения лигандов к ней.

4.1. Печать гликанов в виде полиакриламидных конъюгатов.

Гликаны, входящие в используемый нами эррей, сильно разнятся по размерам (от моно до 11-олигосахарида), гидрофобности и заряду (есть такие, в состав которых входит 3 и более анионных групп), это сказывается на морфологии точек, формирующихся при печати, а форма и размер точек влияют на количественный обсчет их интенсивности. Из 600 гликанов эррея существенная часть точек характеризуется разнородностью, что негативно сказывается на достоверности результатов обработки изображений. Чтобы преодолеть влияние природы гликана на морфологию точек, мы ввели дополнительную стадию – синтеза полиакриламидных (РАА) конъюгатов – предшествующую печати. Химия иммобилизации в этом случае иная, ковалентная связь (сложноэфирная) образуется между первичными гидроксильными группами полимера (РАА – это полимер с боковыми заместителями $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$). Вместе с тем, был осуществлен переход от контактного типа печати (раствор переносится на поверхность в результате капиллярных сил при контакте капилляра с поверхностью) на бесконтактный (капля раствора переносится на поверхность при «выпадении» из капилляра в результате увеличения диаметра за счет сжатия пьезокристалла). За счет введения стадии синтеза РАА-конъюгатов и использования бесконтактного способа печати удалось улучшить морфологию точек: флуоресцентный сигнал оказался равномерно распределенным по всей площади спота (Рисунок 4).

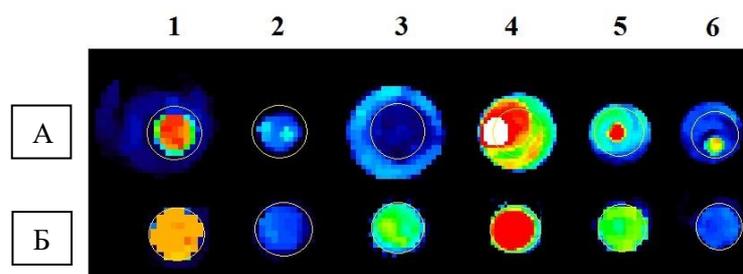


Рисунок 4. Сравнение морфологии точек (А) аминоспейсерированных гликанов на слайдах, напечатанных контактным способом и (Б) РАА-конъюгатов гликанов, напечатанных бесконтактным способом: желтым контуром обозначен диаметр, равный 70 мкм. Под номерами 1-6 обозначены гликаны, являющие наиболее показательными для демонстрации изменений в морфологии точек: №1 – $\text{GlcNAc}\beta\text{1-2Gal}\beta\text{1-3GalNAc}\alpha$; 2 – $\text{Gal}\alpha$; 3 – $\text{GalNAc}\beta\text{1-4(6-O-Su)GlcNAc}\beta$; 4 – $\text{Gal}\alpha\text{1-6Glc}\beta$; 5 – $\text{Neu5Ac}\alpha\text{2-3Gal}\beta\text{1-3GlcNAc}\beta$; 6 – $\text{Gal}\alpha\text{1-4Gal}\beta\text{1-4Glc}\beta$.

Кроме того, удалось повысить эффективность использования гликанов, так как выход на стадии синтеза РАА-конъюгата количественный, а на стадии иммобилизации близок к этому, в то время как в случае иммобилизации аминоспейсерированных гликанов выход в среднем составляет 15% и зависит от природы гликана. Дополнительно в состав полимера было введено небольшое количество флуоресцентной метки (1 мольный %), что позволило осуществить тотальный контроль (как качественный, так и количественный) качества печати, иными словами, появилась возможность контролировать каждую из ~3 500 точек на чипе.

4.2. Пластиковый слайд.

Конъюгирование гликана с РАА и переход к бесконтактному способу печати значительно повысили качество производимых гликочипов, однако не решило проблему, связанную с невозможностью оценивать качество коммерческих подложек до момента, когда партии гликочипов будут произведены и проанализированы стандартными образцами. В связи с этим было принято решение о необходимости разработки собственного варианта подложки, обеспечивающего контроль качества всех стадий производства. Был разработан активированный слайд на пластиковой (черный полистирол) подложке, которую методом спин-коатинга (метод нанесения частиц или тонких пленок на плоские поверхности за счет центрифугирования и растекания раствора прекурсора) покрывали полимером, содержащим эпоксидные группы. Затем на этот слайд печатали аминоспейсерированные и конъюгированные с РАА гликаны, а также полисахариды. Одновременно с существенным снижением стоимости производимых

гликочипов, отмечалось высокая воспроизводимость результатов анализа стандартных образцов, а также оптимальные морфологические характеристики точек.

Часть настоящей работы по исследованию АГАТ человека проводилась уже с помощью таких пластиковых чипов. В результате, процесс печати гликочипов стал воспроизводимым (меж-чипная воспроизводимость более 90%) и перестал быть зависимым от возможных нарушений технологии фирмой-производителем слайдов-подложек.

Заключение

Естественные антитела как часть системы врожденного иммунитета, вызывают у исследователей интерес уже на протяжении более полувека. И интерес этот связан не только с желанием использовать новейшие знания для решения практических задач в области здравоохранения, но и с фундаментальными основами работы иммунной системы. Можно сказать, что ЕАТ, по мере их изучения, все менее вписывались в общую схему функционирования иммунной системы, хотя бы по той причине, что в отличие от адаптивных антител, они формируются в отсутствие явной антигенной стимуляции. Механизм появления ЕАТ лишь предполагается, а роль внешних факторов в их продукции изучена слабо.

Представленная работа посвящена изучению генезиса АГАТ, которые составляют существенную часть репертуара ЕАТ. Чтобы выяснить, как внешние факторы влияют на репертуар ЕАТ, мы сфокусировали внимание на работе с модельными животными. Возможность изолированного содержания и варьирования условий их жизни позволили определить, что контакт с ограниченным числом микроорганизмов, а также пища, не являются достаточными условиями для формирования полноценного репертуара АГАТ. Максимальное разнообразие иммуноглобулинов было отмечено в группе мышей, которых однократно подвергли гаважу остатками непереваренной пищи нестерильных мышей. Значительную часть содержимого гаважа составляют комменсальные бактерии кишечника (микробиота) и их «обломки». Тот факт, что по репертуару антител эти экспериментальные животные приблизились к нестерильным мышам, дает основание считать, что антигенов микробиоты достаточно для формирования полноценного набора ЕАТ.

Особый интерес вызывает отсутствие связи между структурой антигенов бактерий, с которыми контактировали подопытные животные, и специфичностью активированных ими АГАТ. В частности, среди этих антител часто наблюдаются антитела

к антигенам системы АВН, хотя в структуре полисахаридов использованных в работе бактерий таких антигенов нет. Таким образом, говорить о прямой иммунизации бактериальным антигеном нет оснований. В литературе такой процесс иногда называют премириванием (priming), т.е. инициацией клеток-продуцентов антител. В пользу предположения о премиривании в противоположность классической иммунизации говорит и то, что у разных особей, контактировавших с одной и той же бактерией, появлялись антитела различной специфичности. В то же время, после премиривания полным набором антигенов микробиоты, как обсуждалось выше, у разных мышей формируются сходные репертуары ЕАТ, близкие к таковым у нестерильных особей. Наблюдаемое сходство (но не идентичность) позволяет считать, что репертуар ЕАТ в конечном итоге определяется двумя факторами: его потенциал – генетическим, а реальность – бактериальным. То же самое должно быть справедливо и для человека: хотя репертуары антител мыши и человека различны, по общему плану строения иммунной системы сходство имеется, в наиболее древней части – врожденном иммунитете.

Для изучения происхождения ЕАТ человека большой интерес представляет ранний возраст. Начиная с момента рождения за относительно небольшой промежуток времени осуществляется переход от практически стерильных условий жизни в материнском организме к богатой антигенами окружающей среде, а затем и смена питания – от материнского молока к регулярной пище. Поэтому, часть нашей работы была посвящена изучению репертуаров АГАТ детей, получавших различные варианты питания, в течение первого года их жизни. Наибольшее разнообразие антител было отмечено в группе, получавшей в пищу смеси, изготовленные на основе частично гидролизованного белка коровьего молока, в то время как минимальный – у детей, вскормленных материнским молоком. Т.е. искусственное питание напрямую (являясь источником крупных, по-видимому, антигенных пептидов) или опосредованно – через микрофлору, для которой наша пища служит субстратом, повлияло на репертуар иммуноглобулинов. Учитывая, что молоко матери является золотым стандартом в питании новорожденных, можно сказать, что искусственные молочные смеси приводят к формированию избыточности репертуара иммуноглобулинов, несоответствующего запрограммированному природой для этого возраста. Действительно, согласно литературным данным, в течение первого года жизни одновременно с созреванием всех звеньев иммунитета, вырабатывается толерантность к антигенам собственных клеток и тканей, а также к микрофлоре. Физиологическая иммуносупрессия, свойственная здоровому детскому организму, необходима для предотвращения чрезмерной реакции на

обилие антигенов окружающей среды. Наблюдаемая при искусственном вскармливании избыточность иммуноглобулинов в таком случае не выглядит преимуществом.

В данной работе было обнаружено практически полное отсутствие антител к дисахариду Le^c, даже в возрасте 12 месяцев, когда репертуар ЕАТ практически сформирован. Эти иммуноглобулины ассоциированы с раком молочной железы, их количество у больных РМЖ достоверно ниже, чем у здоровых женщин, поэтому для них предполагается надзорная за появлением опухолевых клеток функция. Можно ожидать, что у детей существует механизм задержки синтеза этих иммуноглобулинов, скорее всего из-за наличия в раннем возрасте соответствующего антигена, который таким образом является не просто опухолевым, а онкоэмбриональным. Интересно, что изомерный дисахарид Gal β 1-4GlcNAc(LN) встречается в составе гликопротеинов и гликолипидов в линейном виде, то есть повторов LN-LN-LN, только на эмбриональной стадии и в раннем возрасте, а его разветвленная форма имеется у взрослых. Полученные данные являются основанием для поиска антигена Le^c (и выяснения его функции) на стадии эмбрионального развития.

Несмотря на имеющиеся различия в репертуарах, для всех детей, независимо от типа питания, характерны общие тенденции в динамике антител: в 3 и 6 месяцев IgM практически не детектируются – появляются в возрасте между 6 и 12 месяцами; максимум разнообразия IgG приходится на 3 месяца, а в 6 их становится значительно меньше. Эта закономерность характерна для всех четырех групп, различающихся питанием.

Результаты, полученные при сравнении репертуаров иммуноглобулинов детей, их матерей и здоровых взрослых доноров, показали, что беременность с точки зрения функционирования иммунной системы, является особым состоянием. Несмотря на способность IgG, пересекая плацентарный барьер, проникать в кровоток плода, репертуары иммуноглобулинов этого класса у матери и ребенка не идентичны, т.е. происходящая внутриутробная передача IgG по не выясненным пока причинам селективна. Репертуар АГАТ при беременности изменяется, а при патологической беременности изменяется, но по-другому: при преэклампсии, гипертензивных расстройствах и синдроме задержки развития плода выявляется набор иммуноглобулинов, которые могут быть маркерами данных патологий.

В заключение особо выделим два обнаруженных факта, которые противоречат существующим представлениям об антителах в детском возрасте:

– Продолжительность циркуляции материнских IgG в крови ребенка оказалась существенно выше, чем описано в литературе; синтез собственных IgG начинается в более позднем возрасте (начиная с одного года). Вряд ли это можно объяснить особыми свойствами АГАТ. В то же время, длительная циркуляция антител класса IgG хорошо согласуется с поздним (после 6 месяцев) появлением IgM, то есть, большее время жизни IgG сокращает «мертвую» зону до появления IgM.

– Репертуар IgG матери и ребенка, еще не способного синтезировать собственный IgG, совпадают не полностью. То есть, существуют барьеры для прохождения через плаценту некоторых антител. Происходит их нейтрализация у ребенка, или действуют иные, неизвестные пока механизмы. Этот факт стимулирует изучение плацента-связанных антител.

Выводы

1. Близкий к полноценному репертуар антигликановых иммуноглобулинов формируется у мышей, которым однократно интестинально вводили широкий набор антигенов микробиоты. В группе инбредных BALB/c SPF-мышей, несмотря на их близкое генетическое родство и сходные условия содержания, наблюдаются вариации в репертуаре антигликановых иммуноглобулинов. Полученные данные хорошо согласуются с гипотезой о ключевой роли микробиоты в премировании В1-клеток и последующей продукции ими естественных антител.

2. В возрасте 3 и 6 месяцев антигликановые антитела класса IgM у детей практически не обнаруживаются, а к 12 месяцам их репертуар сопоставим с репертуаром взрослого человека, однако в нем отсутствуют иммуноглобулины специфичные к дисахариду Le^c, которые выявляются в высоком титре практически у всех взрослых людей. Так как для антител к Le^c предполагается функция надзора за появлением опухолевых клеток, то антиген Le^c можно отнести к онкоэмбриональным. Максимальное разнообразие IgG наблюдается в 3 месяца; в 6 и 12 месяцев разнообразие и титры иммуноглобулинов этого класса уменьшаются.

3. Максимальное разнообразие антигликановых IgM наблюдалось в группе детей, питавшихся смесью, изготовленной на основе частично гидролизованного белка, в то время как минимальное – в группе детей, питавшихся материнским молоком, которое, по-видимому, гармонизирует процесс формирования естественных иммуноглобулинов. Питание напрямую или опосредованно (через микрофлору) влияет на репертуар антигликановых иммуноглобулинов.

4. Репертуары антигликановых иммуноглобулинов при нормальной и патологически протекающей беременности достоверно отличаются, что стало основой разработки молекулярной диагностики отклонений при беременности.
5. Гликочип как инструмент исследования репертуаров антигликановых иммуноглобулинов, существенно улучшен за счет использования пластика в качестве материала для подложки, а также нового подхода к химии иммобилизации лигандов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Shilova N., Navakouski M., **Khasbiullina N.**, Blixt O., Bovin N. Printed glycan array: antibodies as probed in undiluted serum and effects of dilution // *Glycoconj J.* 2012. Т. 29. № 2-3. С. 87-91.
2. Shilova N., Huflejt M., Viscovic M., Obukhova P., Navakouski M., **Khasbiullina N.**, Pazynina G., Galanina O., Bazhenov A., Bovin N. Natural antibodies against sialoglycans // *Top Curr Chem.* 2015. Т. 366. С. 169-181.
3. **Khasbiullina N.**, Bovin N. Hypotheses of the origin of natural antibodies: a glycobiologist's opinion // *Biochemistry (Mosc).* 2015. Т. 80. № 7. С. 820-835.
4. Bello-Gil D., **Khasbiullina N.**, Shilova N., Bovin N., Manez R. Repertoire of BALB/c mice natural anti-carbohydrate antibodies: mice vs. humans difference, and otherness of individual animals // *Front Imm.* 2015. Т. 6. № 8. С. 1449.
5. Зиганшина М.М., Шилова Н.В., **Хасбиуллина Н.Р.**, Новаковский М.Е., Николаева М.А., Кан Н.Е., Вавина О.В., Николаева А.В., Тютюнник Н.В., Сергунина О.А., Бот И., Тютюнник В.Л., Бовин Н.В., Сухих Г.Т. Аутоантитела к антителам эндотелия при преэклампсии // *Акушерство и гинекология.* 2016. № 3. С. 24-31.
6. **Хасбиуллина Н.Р.**, Шилова Н.В., Полякова С.М., Ракитько А.С., Нокель А.Ю., Бовин Н.В. Естественные антитела в диагностике и прогнозировании патологий беременности // *Журнал акушерства и женских болезней.* 2017. Т. 66. № 5. С. 85-86.
7. **Khasbiullina N.**, Shilova N., Navakouski M., Nokel A., Knirel Y., Blixt O., Bovin N. Repertoire of Abs primed by bacteria in gnotobiotic mice // *Innate Immun.* 2018. Т. 3. С. 180-187.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Хасбиуллина Н.Р.**, Новаковский М.Е., Тимофеева Л.А., Шилова Н.В., Бовин Н.В. Антиуглеводные антитела в сыворотке крови новорожденных, сборник тезисов IV Всероссийской школы-конференции «Химия и биохимия углеводов», 2011, с. 42-43.
2. **Хасбиуллина Н.Р.**, Новаковский М.Е., Тимофеева Л.А., Шилова Н.В., Бовин Н.В. Формирование репертуара антиуглеводных антител человека, сборник тезисов XXIV Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2012, с. 67.
3. **Хасбиуллина Н.Р.**, Бликст О., Новаковский М.Е., Шилова Н.В., Бовин Н.В. Генезис антигликановых естественных антител человека, сборник тезисов «I Всероссийской конференции «Фундаментальная Гликобиология», 2012, с. 104.

4. **Khasbiullina N.**, Shilova N., Navakouski M., Timofeeva L., Kumar S., Schwartz-Albiez R., Sorensen R., Inostroza J., Bovin N., Blixt O. Formation of natural anti-carbohydrate antibody repertoire, 5th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates, 2012, с. 26.
5. **Khasbiullina N.**, Shilova N., Navakouski M., Timofeeva L., Kumar S., Schwartz-Albiez R., Sorensen R., Inostroza J., Bovin N., Blixt O. The origin of natural anti-glycan antibodies: first 12 months of life, Eurocarb №17, 2013, с. 36.
6. **Хасбиуллина Н.Р.**, Шилова Н.В., Новаковский М.Е., Кумар С., Шварц-Альдаец Р., Соренсен Р.У., Иностроза Ж., Бовин Н.В., Книрель Ю.А., Бликст О. Формирование репертуара антиуглеводных антител человека в первые месяцы жизни, сборник тезисов XXVI Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2014, с. 23.
7. **Хасбиуллина Н.Р.**, Новаковский М.Е., Шилова Н.В., Бликст О., Книрель Ю.А., Бовин Н.В. Антиуглеводные антитела мышей-гнотобиотов как результат колонизации различными видами бактерий, сборник тезисов VII Всероссийской школы-конференции «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: углеводные детерминанты в межорганизменных взаимодействиях», 2014, с. 59.
8. **Khasbiullina N.**, Shilova N., Navakouski M., Kumar S., Schwartz-Albiez R., Sorensen R., Inostroza J., Knirel Y., Blixt O., Bovin N. The repertoire of natural anti-glycan antibodies during first year of life, 3rd International Conference and Exhibition on Probiotics, Functional and Baby Foods, 2014, с. 99.
9. **Хасбиуллина Н.Р.**, Новаковский М.Е., Шилова Н.В., Бликст О., Книрель Ю.А., Бовин Н.В. Генезис антигликановых антител, в сборнике тезисов III Всероссийской конференции «Фундаментальная Гликобиология», 2016, с.39.
10. **Khasbiullina N.**, Bello-Gil D., Dobrochaeva K., Obukhova P., Shilova N., Knirel Y., Manez R., Bovin N.V. Natural antibodies in mice. Whether the mouse to replace the human? 19th European Carbohydrate Symposium, 2017, с. 713.