

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН**

На правах рукописи



Хасбиуллина Наиля Рамилевна

Репертуар антигликановых антител человека в первые месяцы жизни

Специальность 03.01.04 Биохимия

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Николай Владимирович Бовин

Москва 2019

СОДЕРЖАНИЕ

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ	3
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. ЕАТ как часть системы врожденного иммунитета.....	13
1.1.1. Функции ЕАТ.....	13
1.1.2. Продуценты ЕАТ.....	20
1.1.3. Происхождение ЕАТ.....	27
1.1.4. АГАТ как часть пула ЕАТ.....	32
1.2 Онтогенез иммунной системы.....	36
1.2.1 Особенности иммунитета плода и новорожденного.....	39
1.2.2 Фактор питания в становлении иммунной системы новорожденного.....	41
1.2.3 Микрофлора.....	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
2.1 Материалы.....	51
2.2 Методы.....	56
2.2.1 Печать гликочипов.....	56
2.2.2 Анализ сывороток крови с использованием гликочипа.....	63
2.2.3 Получение и анализ флуоресцентных изображений гликочипа.....	64
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1 Формирование репертуара антител у мышей-гнотобиотов.....	71
3.2 Исследование репертуара антител детей первого года жизни.....	82
3.2.1 АГАТ детей в возрасте 3 дней, их матерей и пуповинной крови.....	83
3.2.2 АГАТ детей в возрасте 3, 6 и 12 месяцев.....	86
3.3 Исследование репертуара АГАТ пациенток, страдающих акушерскими патологиями.....	97
3.4 Усовершенствования гликочипа как инструмента изучения антител.....	99
3.4.1 Печать гликанов в виде полиакриламидных конъюгатов.....	100
3.4.2. Пластиковый слайд.....	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103
ВЫВОДЫ	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	110
ПРИЛОЖЕНИЯ	143
БЛАГОДАРНОСТИ	166

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ¹

Агглютинация – склеивание и выпадение в осадок из однородной взвеси бактерий, эритроцитов и др. клеток, несущих антигены, под действием специфических веществ – агглютининов, в роли которых могут выступать антитела или лектины.

Аутоантигены – антигены, присутствующие в собственных клетках организма, который воспринимает их как «свои» в норме и «чужие» при патологии.

Аутоиммунные заболевания – группа патогенетически различных заболеваний, которые условно объединяются в данную группу по одному общему признаку – агрессивному отношению иммунной системы к собственным клеткам.

Бактериальная транслокация – проникновение микроорганизма из просвета желудочно-кишечного тракта через слизистый барьер в системный кровоток или лимфоток; может быть физиологической (частота транслокации ограничивается единичными явлениями) и патологической (массированное попадание микроорганизмов в кровь, способное вызвать гнойно-септические осложнения).

Биопленка – конгломерат микроорганизмов, связанных между собой в составе слоя внеклеточного полимерного вещества; обладающее пространственной и метаболической структурой сообщество микроорганизмов.

Вирулентность – степень способности данного инфекционного агента (штамма микроорганизма или вируса) заражать организм хозяина. Вирулентность неравнозначна патогенности, поскольку после заражения микроорганизм может существовать в пределах организма-носителя, не вызывая явных отрицательных проявлений этого носительства.

Гестация – вынашивание, беременность.

¹ Общеизвестные термины приведены с той целью, чтобы их понимание Автором было понятно Читателю

Гипермутагенез (соматический гипермутагенез) – перестройка сегментов генов иммуноглобулинов, приводящая к возникновению огромного разнообразия антиген-распознающих участков иммуноглобулинов и рецепторов В- и Т-клеток.

Гликокаликс – совокупность протеогликанов, гликопротеинов и гликолипидов, закрепленных на клеточной поверхности.

Гликом – совокупность гликанов клетки, органа или организма в целом.

Гликочип, микрочип, чип – подложка из твердого материала с иммобилизованными на ее поверхности гликанами.

Гнотобиоты – организмы, полученные и выращенные в стерильных условиях, но затем подвергнутые воздействию определенного фактора (контакту с микроорганизмом, изменению условий обитания или режима питания и т.п.) с целью исследования влияния этого фактора.

Иммунизация – ответная реакция организма на контакт с антигеном, приводящая к выработке специфичных к данному антигену антител.

Иммунологическая память – способность иммунной системы сохранять информацию о структуре антигена, и при повторном контакте с ним реагировать быстрее и эффективнее, чем при первичном.

Иммунологическая толерантность – состояние организма, при котором отсутствует иммунный ответ на данный антиген.

Инбредные организмы – генетически близкие организмы одного вида, полученные в результате длительного скрещивания родственных особей.

Интестинальное введение – введение в желудочно-кишечный тракт.

Ксеноантигены – антигены, различающиеся между представителями различных биологических видов.

Малигнизация – приобретение клетками нормальной или патологически изменённой ткани организма свойств злокачественной опухоли в результате нарушения процессов дифференцировки и пролиферации клеток.

Микробиота – микрофлора, т.е. микробное сообщество, использующее многоклеточный организм как среду обитания. Условно делится на резидентную, т.е. постоянно присутствующую в организме хозяина, и транзиторную, т.е. пребывающую в организме хозяина в течение ограниченного периода времени.

М-клетки – от англ. microfold cells; клетки в составе ассоциированной с кишечником лимфоидной ткани.

Онкоэмбриональные антигены – антигены, которые 1) в норме обнаруживаются на клетках организма на эмбриональной стадии развития и отсутствующие во взрослом возрасте; 2) обнаруживаются на клетках некоторых видов опухолей у взрослого организма.

Онкотрансформация - частичная или полная дедифференцировка клеток, вызванная нарушением регуляции роста клеток, приводящая к их интенсивной неконтролируемой пролиферации и образованию опухоли.

Опухлеассоциированные антигены – антигены, появляющиеся на поверхности опухоли.

Патогенность – видовой генетический признак возбудителя, его потенциальная возможность вызывать при благоприятных условиях специфический инфекционный процесс.

Паттерн – устойчивая, часто повторяющаяся надмолекулярная структура в составе мембраны бактериальной или эукариотической клетки.

Полиреактивность – способность антитела связывать несколько антигенов совершенно разной химической структуры.

Пребиотики – компоненты пищи, которые не перевариваются и не усваиваются в верхних отделах желудочно-кишечного тракта многоклеточного организма, но ферментируются микроорганизмами его микрофлоры.

Премирование – активация В-клеток, продуцирующих ЕАТ.

Преэклампсия – патологическое состояние неясного генеза, возникающее при беременности; характеризуется значительным повышением артериального давления и протеинурией и угрожающее жизни матери и плода.

Пробиотики – микроорганизмы и вещества микробного происхождения, используемые в терапевтических целях (как лекарственные препараты, биологически активные добавки и продукты питания).

Рафты, кавеолы – специализированные микродомены, формирующиеся на мембране клетки как результат упорядочивания жидкостной фазы и выполняющие функции «платформы» для формирования разнообразных молекулярных.

Слайд – плоская подложка из твердого материала, которая может быть использована для производства микроэртеев.

Титр – в работе это понятие используется в значении характеристики антител, учитывающей совокупность концентрации и аффинности.

BALB/c – линия мышей, выведенная в лаборатории из обычной домашней мыши; наиболее распространенная в исследованиях линия мышей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГАТ – антигликановые антитела

АПК – антигенпрезентирующие клетки

ГОС – галактоолигосахариды

ЕАТ – естественные антитела

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

СЗРП – синдром задержки развития плода

ФОС - фруктоолигосахариды

BCR – B-cell receptor (англ. В-клеточныйрецептор)

DAMP – ассоциированные с повреждениями молекулярные паттерны
(англ. damage/danger associated molecular patterns)

GALT – gut-associated lymphoid tissue (англ. Ассоциированная с
кишечником лимфоидная ткань)

MAMP – ассоциированные с микроорганизмами молекулярные
паттерны (англ. Microorganism associated molecular patterns)

MLN – mesenteric lymph nodes (англ. мезентеральные лимфатические
узлы)

MZB – marginal zone B-cells (англ. В-лимфоциты маргинальной зоны
селезенки)

NK – естественные киллерные клетки, или натуральные киллеры

PGA – printed glycan array, микроэррей (дословно с англ. напечатанный
массив гликанов).

SPF – specific pathogen free (англ. не несущие специфицированную
патогенную микрофлору)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Естественными называются антитела, которые обнаруживаются в крови человека и млекопитающих в отсутствие явной специфической антигенной стимуляции [Coutinho, Kazatchkine, Avrameas, 1995; Mouthon и др., 1996; Ehrenstein, 1998; Lutz, 2012]. 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 [Avrameas, 1991; Lutz, 2012; Holodick, Rodriguez-Zhurbenko, Hernandez, 2017]. Естественные иммуноглобулины являются полиреактивными и низкоаффинными (в отличие от специфических высокоаффинных адаптивных иммуноглобулинов), и способны распознавать как собственные, так и чужеродные антигены [Baumgarth, 2005]. 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 [Spalter, 1999; Milland, Sandrin, 2006; Arend, 2011; Bailly, Bouhours, 1995, Daniels, Bromilow, 2010], а также ксено- [Cramer, 2000; Galili, 2004; Ezzelarab, Ayares, Cooper, 2005; Cooper, 2007] и опухолеассоциированным антигенам [Brooks, 2010, Cazet, 2010, Predergast, 2017].

Интерес к изучению ЕАТ связан, прежде всего, с функциями, которые они выполняют в организме, а также с 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 фактор наследственности [Granato, Chen, Wesemann, 2015; New, King, Kearney, 2016].

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, или просто чип); 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 антител, способных связывать широкий спектр молекул различного происхождения. Являясь частью системы врожденного иммунитета, эти антитела выполняют важные функции – защиты от патогенов, клиренса метаболитов, а также надзорную функцию – за постоянно появляющимися трансформированными клетками. В то же время, систематических исследований репертуара естественных иммуноглобулинов, в том числе направленных к гликанам, в действительности не много, и они пока не в состоянии дать ответа на вопрос о происхождении данной группы антител и о действии факторов, влияющих на их продукцию в организме.

Изучение репертуара иммуноглобулинов в крови затруднено в связи со 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 [Parthasarathy и др., 2008; Oyelaran и др., 2009], 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 работы и основные 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

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

антигликановые ЕАТ формируются в результате премирования 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 антителам востребованы клиницистами в области акушерства и гинекологии; на основе этих данных предпринимаются практические шаги по созданию и валидации тест-систем для выявления преэклампсии и синдрома задержки развития плода.

Усовершенствования методики печати гликочипов позволяют 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.

Апробация работы и публикации

По основным материалам диссертации было опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах и сделано 10 докладов на российских и международных тематических 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 и 2014, Москва, Россия.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 ЕАТ как часть системы врожденного иммунитета

Естественные иммуноглобулины относятся преимущественно к классу IgM, реже – IgG и IgA [Lutz, 2012; Panda, 2015]. Являясь частью системы врожденного иммунитета, они выполняют ряд функций, в том числе защитную, надзорную и регуляторную. Первая выражается в быстром реагировании на попадание инфекции в организм, что оказывается возможным благодаря тому, что они постоянно присутствуют в крови [Ochsenbein и др. 1999; Voes, 2000; Gronwall, Vas, Silverman, 2012; Panda S. и др. 2013]. За счет реализации второй функции ЕАТ – надзорной – организм избавляется от клеток и их фрагментов, которые подлежат удалению. Изменения, которым подвергаются клетки в течение своей жизни, могут носить как патологический (например, при онкотрансформации), так и физиологический характер (старение и смерть клеток в результате апоптоза). При этом ЕАТ в норме связывают и удаляют именно поврежденные и видоизмененные части клеток, не повреждая при этом здоровые [Brandlein и др., 2003; Brandlein, Vollmers, 2007; Diaz-Rodriguez и др. 2015]. Третья функция – регуляторная – обеспечивает толерантное отношение к собственным нормальным клеткам и молекулам, а также к микроорганизмам, входящим в состав нормальной микрофлоры [Dighiero, Rose, 1999; Elkon, Casali, 2008; Xu и др., 2015; Holodick, Rodriguez-Zhurbenko, Hernandez, 2017]. Далее каждая функция будет рассмотрена подробнее на примере ЕАТ, направленных к углеводам.

1.1.1 Функции ЕАТ

Защита от инфекций

Наш организм постоянно контактирует с множеством бактерий и вирусов, обладающих различной патогенностью и вирулентностью. До момента активации Т-клеточного звена иммунитета, выработки специфических иммуноглобулинов и последующего формирования клеток

памяти (все перечисленное – адаптивный иммунитет) ведущую роль в обеспечении защиты организма выполняет врожденный иммунитет. Значительная часть компонентов врожденного иммунитета локализована в области слизистых оболочек – основного барьера между внутренней средой организма и окружающим миром. Рассеянные в подслизистом слое мелкие лимфатические узлы и клетки-гранулоциты постоянно отражают атаки микроорганизмов, которые мы вдыхаем или проглатываем с пищей [Nochi, Kiyono, 2006; Sheehan, Kesimer, Pickles, 2006; Hooper, Littman, Macpherson, 2012]. Некоторые из этих патогенов способны преодолеть барьер слизистых оболочек и в кратчайшие сроки привести к массивной инфекции. Этого удастся избежать во многом благодаря одному из компонентов врожденного иммунитета – естественным антителам [Baumgarth и др., 2000; Racine, Winslow, 2009; Kinnebrew, Pamer, 2012; Elliott, Siddique, Weinstock, 2014, S. Panda и др., 2015; Romo, Perez-Martinez, Ferrer, 2016].

Основная часть пула ЕАТ относятся к иммуноглобулинам класса М, которые, будучи пентамерами, связывают молекулы антигенов в широких диапазонах авидности ($10^{-3} - 10^{-11} \text{ M}^{-1}$; в среднем – $10^{-6} - 10^{-7} \text{ M}^{-1}$). И действительно, IgM в 100 – 10 000 раз более эффективны в агглютинации по сравнению с IgG, что оказывается крайне важным именно в первые часы после попадания инфекции в кровь [Zhou и др., 2007; Baumgarth, 2005].

Работа ЕАТ по защите от инфекций осуществляется четырьмя путями, как показано на Рисунке 1.

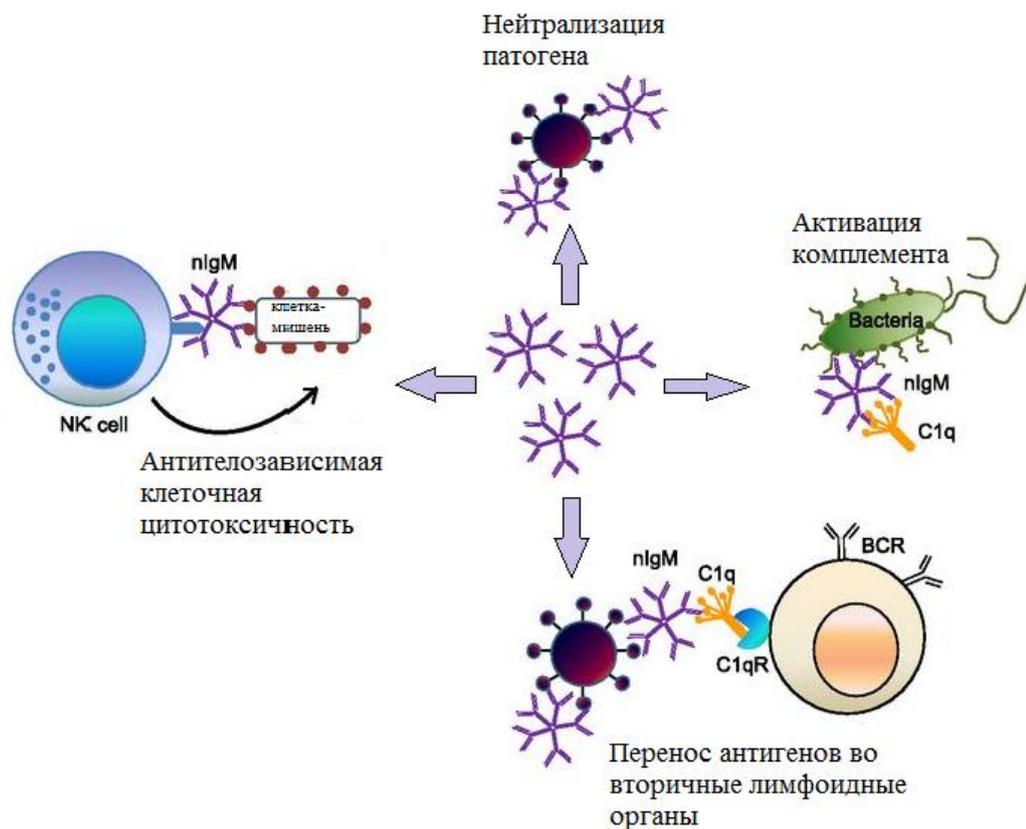


Рисунок 1. Защитная функция естественных антител (ЕАТ), направленная на элиминацию патогена [Ochsenbein, Zinkernagel, 2000].

Антитела могут непосредственно нейтрализовать патоген, связываясь с его поверхностными структурами [Hayashi и др., 2004; Forthal, 2014; Rothstein, 2016; Xu и др., 2015; Jayasekera, Moseman, Carroll, 2007]. При этом белки, гликопротеины и гликолипиды, необходимые патогену для адгезии и проникновения в клетку организма хозяина, оказываются блокированными антителами. В случае, если такая блокировка происходит в дыхательных путях или просвете кишечника, связанный иммуноглобулинами вирус может выводиться из организма даже «неузнанным» другими звеньями иммунной системы. Защитная функция антител в данном сценарии дополняется естественным барьером, который обеспечивают слизистые оболочки. Если же патоген вступил во взаимодействие с клеткой организма хозяина – проник в ткани и кровеносную систему, образующийся комплекс АГ-АТ вызывает

активацию комплемента, а также распознавание антигена и его последующую презентацию [Navin, Krug, Pearson, 1989; Rahyab и др., 2011; Ochsenbein, Zinkernagel, 2000; Ding и др., 2013]. Такое разнообразие вариантов действия ЕАТ делает их эффективным орудием в борьбе организма с различными инфекциями. Доказательством этому утверждению служат опыты с животными, лишенными способности к секреции IgM, в которых при инфицировании даже относительно безобидными бактериями наблюдалось утяжеление симптомов вплоть до летального исхода [Baumgarth, Tung, Herzenberg, 2005; Yu и др. 1996].

Поддержание гомеостаза

Опасность для организма представляют не только микроорганизмы, но и компоненты собственных клеток, которые гибнут в результате естественного старения или развивающейся патологии. Образующиеся в процессе гибели клеток радикалы способны запускать цепную реакцию, повреждающую соседние здоровые клетки. Считается, что именно таким образом развивается атеросклероз и другие заболевания сердечно-сосудистой системы, приводящие к ишемии. ЕАТ участвуют в утилизации поврежденных молекул, имеющих в своем составе гидролизованные компоненты клеток - пептиды и липиды, гликопептиды, гликолипиды [Lutz, 2007; Chou и др., 2009; Lutz, 2012; Tsiantoulas, Gruber, Binder, 2013]. Некоторые из таких молекул хорошо изучены, и роль ЕАТ в их утилизации доказана. К ним относятся окисленные формы кардиолипина и фосфорилхолина, которые в нативной форме антитела не связывают [Binder, 2005; Faire, Frostegard, 2009]. Утилизация эритроцитов в организме происходит аналогично: десалирированные гликопротеины поверхности этих клеток связывают иммуноглобулины, вызывающие опсонизацию эритроцитов [Bratosin и др., 2001]. С точки зрения клинического значения, изменение титров ЕАТ, направленных к гидролизованным компонентам клеток, может служить

маркером, например, воспалительных заболеваний, при которых локально или генерализованно повышается количество погибающих клеток. В ряде работ [Binder, Silverman, 2005; Wang и др., 2018; Zhang, Wang, Shenghu, 2015; Tuominen и др., 2006] описывается связь между повышением уровней ЕАТ к окисленному ЛПНП у мышей с индуцированным атеросклерозом.

Трансформация клеток может носить и патологический характер, что в большинстве случаев связывают с малигнизацией – процессом, который является результатом нарушения процессов дифференцировки и пролиферации клеток. Такие клетки характеризуются изменениями в строении макромолекул, возникающими вследствие нарушения метаболических путей и придающими клетке метастатический потенциал (повышенная выживаемость, усиление клеточного роста, возможность избегать распознавания клетками иммунной системы и др.). Значительная часть таких макромолекул появляется вследствие изменений в процессах посттрансляционной модификации, в том числе и гликозилирования [Popa, Ganea, Petrescu, 2014; Munkley, Elliott, 2016; Varki, 2017]. Гликом онкотрансформированной клетки существенно отличается от нормального за счет как укорочения, так и удлинения углеводных цепей [Singhal, Nakomori, 1990; Brockhausen и др., 1991; Chia, Goh, Bard, 2016; Stowell, Tongzhong, Cummings, 2016, Hoja-Łukowicz и др., 2013]. Например, для гликопротеина Muc-1 в опухолевых клетках наблюдается укорочение цепей О-связанных гликанов; при этом обнаруживаются структуры Tn и TF-антигенов (Рисунок 2), являющиеся перспективными с точки зрения ранней диагностики онкологических заболеваний и оценки дальнейшего развития заболевания в более тяжелые формы, а также как потенциальные мишени для терапии на основе моноклональных антител, распознающих эти антигены [Brockhausen и др., 1995; Slovin, Keding, Ragupathi, 2005; Smorodin и др., 2007; Nath, Mukherjee, 2014; Horm, Schroeder, 2013].

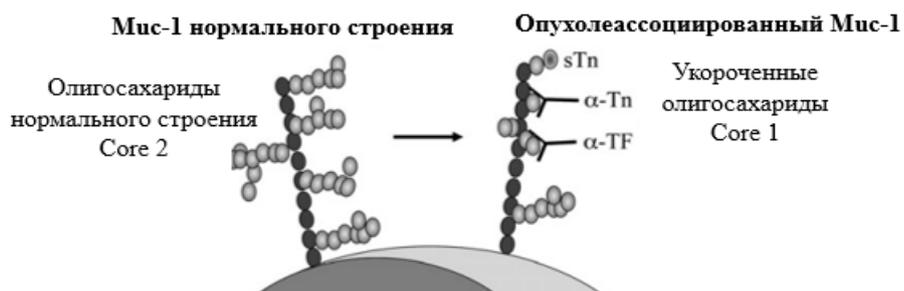


Рисунок 2. Укорочение цепей O-связанных гликанов гликопротеина Muc-1 в опухолевых клетках.

Известны и другие гликаны [Накомори, Cummings, 2012; Накомори, 1984], ассоциированные с различными типами опухолей (Таблица 1). Однако, выявление изменений титров антител к одному маркеру не может рассматриваться как надежный признак заболевания, т.к. и у здоровых доноров могут выявляться такие же антитела [Ronda N. и др., 1994; Padler-Karavani, и др. 2008; Ohtsubo, Marth, 2006; Wu и др., 2013; Kailemia, Park, Lebrilla, 2017].

Таблица 1. Гликаны, ассоциированные с различными видами опухолей.

Вид опухоли	Углеводные антигены
Нейробластома	GD1a, GD3 (CD60a), GM2, GM1
Меланома	GM1, GM2, GM3, GM2, GD3 (CD60a), 9-O-ацетилированный GD3 (CD60b), 7-ацетилированный CD3 (CD60c)
Саркома	GM2, GM3, GD1a, GD2, GT1b, полисиалилированные гликаны (NCAM/CD56)
Карцинома молочных желез	GM2, сиалил-Tn (CD715s), Томсена-Фриденрайха (TF/CD176), Льюиса Y (CD174), сиалил-Льюис А (CA 19-9), сиалил-Льюис X (CD15s)
Карцинома толстой кишки	GM2, CD175s, CD176, сиалил-Льюис А, CD174
Карцинома поджелудочной железы	GM2, GD1b, сиалил-Льюис А, CD15s

Безусловно, при том, что практически все характеристики, отличающие опухолевую клетку от нормальной, служат для ее максимальной выживаемости и избегания от распознавания иммунной системой, наш

организм имеет систему защиты от постоянно и спонтанно возникающих единичных трансформированных клеток. Частью этой системы являются ЕАТ, роль которых в данном случае заключена в инициации процессов комплемент-зависимого лизиса или апоптоза трансформированных клеток [Brandelein и др., 2003; Varambally и др., 2004; Rasche и др., 2013].

Регуляторная функция

ЕАТ принимают участие в формировании толерантности к собственным антигенам. Суть процесса формирования толерантности до конца не находит экспериментального подтверждения и продолжает активно обсуждаться в литературе. Однако согласно одной из наиболее распространенных точек зрения, циркулирующие ЕАТ связывают антигены, препятствуя их распознаванию В-клетками и продукции адаптивных иммуноглобулинов [Dighiero, Roseb 1999; Elkon, Casali, 2008; Xu и др., 2015; Holodick, Rodriguez-Zhurbenko, Hernandez, 2017]. Являются ли изменения уровня каких-либо ЕАТ причиной или следствием аутоиммунных, воспалительных заболеваний и аллергии, пока не ясно. Об участии ЕАТ в процессе развития патологий свидетельствуют факты обнаружения ЕАТ, обладающих аутореактивностью и направленных к широкому спектру молекул – цитокинам, гормонам, ДНК, фрагментам ядерной мембраны, белкам теплового шока, некоторым белкам плазмы [Rothstein, 2016; Bellis и др., 2005; Meager, и др., 2003; Capellano и др., 2012; Shaw и др., 2000]. Такие антитела, во-первых, могут блокировать действие биологически активных молекул (интерфероны), участвовать в их транспорте (интерлейкины) или защищать от повреждения неспецифическими ферментами; во-вторых, маскируют эпитопы этих молекул для распознавания В-клетками.

Подобно тому, как ЕАТ благодаря своим уникальным свойствам выделяются среди остальных иммуноглобулинов в отдельную группу, так и продуценты ЕАТ – особая группа лимфоцитов, которые описаны ниже.

1.1.2 Продуценты ЕАТ

Все наивные В-клетки подразделяют на три группы: фолликулярные В2-клетки, В1-клетки и В-клетки маргинальной зоны селезенки (МЗВ) (Таблица 2).

Таблица 2. Сравнение характеристик В1-, В2- и МЗВ-клеток [Weller и др., 2004].

Клетка / Характеристика	В1-клетки	МЗВ (В-клетки маргинальной зоны селезенки)	В2-клетки
Изоотипы иммуноглобулинов	Обычно IgM (M>>G)	M>G	IgM/IgD, IgG, IgA (G>M)
Дополнительный маркер	CD5, CD ν 11	?	CD23
Перестройка генов Ig	Ограниченное число V-сегментов	Многообразие частично ограничено	Используются все механизмы генерации разнообразия
N-вставки	Мало или нет	Есть	Много
Соматический мутагенез	Отсутствует	?	Есть
Синтез антител	Спонтанный	Индукцированный	Индукцированный
Локализация	Серозные полости	Маргинальные зоны селезенки	Вторичные лимфоидные органы, кровь
Память	?	+/-	++

В2-лимфоциты отвечают за иммунный ответ при контакте с пептидными антигенами, презентированными дендритными клетками. От пре-В-клеток до плазматических, продуцирующих иммуноглобулины, они проходят сложный путь развития, в течение которого происходит перестройка генов иммуноглобулинов, отбор клонов по специфичности (аутоспецифичные клоны подвергаются делеции, анергии или редактированию В-клеточного рецептора), пролиферация с аффинным созреванием антител. Заканчивается развитие В2-лимфоцитов превращением в плазматические клетки, продуцирующие значительные количества отобранных высокоспецифичных иммуноглобулинов, или переходом в пул В-клеток памяти. При этом, разные стадии развития В2-лимфоцитов происходят в различных частях организма, где микроокружение влияет на переход клетки от одной стадии к другой [Hoffman, Lakkis, Chalasani, 2016; Mongini и др., 2005; Baumgarth, 2013; Zhang, Sariatava, Lu, 2004; Pelanda, Torres, 2012; Cancro, Kearney, 2004; Ollila, Vihinen,

2005; Makii др., 1980; Kelsoe, Haynes, 2018; Zhang, Garcia-Ibanez, Toellner, 2016; Mishra, Mariuzza, 2018; Silva, Klein, 2015].

Две другие группы – MZB и B1-клетки – существенно отличаются от B2-лимфоцитов и являются продуцентами EAT [Weller и др., 2004]. Они ограничены в способности мигрировать: B1-клетки локализованы в серозных полостях, а MZB – совершают т.н. «челночную» миграцию в пределах одного органа – селезенки. И B1- и MZB-клетки способны обеспечивать иммунную защиту без привлечения T-клеток. MZB-клетки отличаются от B1 эпизодическими гипермутациями с возможностью N-вставок [Zhang, 2013; Hendricks, Bos, Kroese, 2018; Song, Cerny, 2003; Hendricks и др., 2011]. Кроме того, предполагается, что MZB-клетки могут дифференцироваться в клетки памяти [Weller и др., 2004]. В целом, функциональную границу между двумя этими группами клеток провести весьма трудно, т.к. по самой важной своей задаче – защите от инфекции до момента выработки специфичных иммуноглобулинов – они сходны. Можно даже сказать, что MZB занимают промежуточное положение между B1- и B2-клетками, т.к. продуцируют низкоаффинные полиреактивные EAT, находясь при этом в самом «центре» организма – в селезенке, через которую протекает вся кровь [Kretschmer и др., 2003; Kaminski, Stavnezer, 2006; Cinamon и др., 2008]. Популяции MZB и B1-клеток подробно описаны у грызунов и пока недостаточно исследованы у человека, но, судя по общим чертам строения иммунной системы человека и животных, можно с уверенностью говорить о том, что у человека они есть и выполняют те же функции [Allman, Pillai, 2008; Alyce, Oliver, Kearney, 2001; Cerutti, Cols, Puga; Hendricks, Bos, Kroese, 2018].

Адаптивный иммунитет, т.е. B2-клетки и высокоспецифичные антитела развились в филогенезе относительно недавно и представляют собой наиболее совершенный вариант иммунного ответа. Врожденный иммунитет, эволюционно более древний, устроен на первый взгляд проще: B1-клетки и MZB не проходят строгого клонального отбора и не подвергаются

гипермутагенезу. Однако с функциональной точки зрения, именно эти особенности позволяют продуцентам ЕАТ выполнять важнейшие задачи: защищать организм на начальных этапах инфицирования, осуществлять клиренс метаболитов, поддерживать гомеостаз аутоиммунной реактивности и толерантности к аутоантигенам, а также, в широком смысле, служить основой работы адаптивного звена иммунной системы [Parra, Takizawa, Sunyer, 2018; Ghosn и др., 2011; Attananvanich, Kearney, 2004]. Особенности функционирования В1 и МЗВ клеток заслуживает более детального рассмотрения.

В-клеточный рецептор

BCR всех популяций В-клеток имеет принципиально единообразное строение (Рисунок3), и фактически представляет собой мембранную форму антитела с ко-локализованным вспомогательным гетеродимером $Ig\alpha/Ig\beta$, а также другими молекулами, необходимыми для осуществления интернализации BCR, формирования комплексов BCR-АГ и передачи сигнала внутрь клетки [Нои и др., 2006; Stoddart, Jackson, Brodsky, 2005; Malhotra и др., 2009; Caballero и др., 2006; Chatterjee и др., 2012; Geisberger, Cramer, Achatz, 2003].

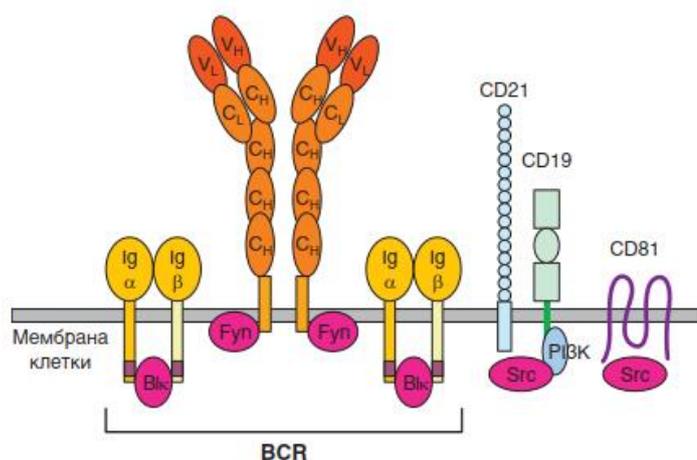


Рисунок 3. Схема В-клеточного рецептора и связанных с ним молекул: mIgG, $Ig\alpha/Ig\beta$ – трансмембранные молекулы, образующие рецептор; связанные с ним внутриклеточные тирозинкиназы и трансмембранные молекулы CD19, CD21, CD81 [Ярилин, 2010].

Возникает закономерный вопрос: если по структуре BCR популяции В-клеток мало отличаются друг от друга, почему реакции на контакт с антигеном различны? И почему В2-клетки продуцируют высокоспецифичные иммуноглобулины, а В1 и МЗВ – полиреактивные и низкоаффинные? Ответ на этот вопрос следует искать в (1) природе самого антигена, его количестве и презентации, (2) в характеристике места, где происходит встреча лимфоцита и антигена, а также (3) в особенностях иммунного статуса организма в связи с возрастом.

Природа антигена и его распознавание

Для передачи сигнала необходимо одновременное сшивание АГ с несколькими BCR для агрегации последних. Для этого молекула АГ должна содержать несколько повторяющихся эпитопов. Для пептидных АГ такое строение не характерно, и потому для распознавания пептидов первостепенное значение играют молекулы ко-рецепторов и участие Т-клеток [Gascoigne и др., 2010; Chen, Flies, 2013; Cole и др., 2012; DeFranco, 1996; Choudhuri и др., 2005]. Полисахариды, фрагменты мембран собственных клеток, а также различные агрегаты содержат в своем составе повторяющиеся эпитопы, что обеспечивает связывание с несколькими BCR без дополнительной стимуляции [Martin, Oliver, Kearney, 2001; Carrol, Holers, 2005; Li, Li, Weigert, 2005; Rowley и др., 2007]. В отсутствие необходимости затрачивать время на дополнительную стимуляцию с привлечением Т-клеток, время реакции на контакт с АГ значительно уменьшено по сравнению с процессом распознавания пептидных АГ.

Локализация

Основным местом локализации В1-клеток являются слизистые оболочки, а точнее, подлежащие слои слизистых; МЗВ сосредоточены в области маргинальной зоны селезенки и способны совершать «челночную» миграцию в пределах селезенки – между лимфоидными фолликулами и маргинальной зоной. Слизистые и селезенка в наиболее полной мере отвечают

основной задаче: быстрому реагированию на попадание антигена. В области слизистых источником антигенов являются многочисленные микроорганизмы резидентной и транзиторной микрофлоры, а селезенка, через которую проходит и где депонируется значительный объем крови, контролирует наличие опасных агентов, попавших в кровяное русло [Appelgren и др., 2008; Pillai, Cariappa, 2009].

Селезенка и MZB-клетки в большей мере функционируют как защитный механизм в системе врожденного иммунитета, а слизистая выполняет сразу две функции: предотвращение проникновения чужеродных микроорганизмов внутрь и обеспечение условий для стабильного существования микроорганизмов-комменсалов. Можно сказать, что две эти функции являются взаимоисключающими, т.к. микроорганизмы не имеют специфических маркеров патогенности или, напротив, «полезности» для организма [Zouali, Richar, 2011; Danzer и др., 2001; Pillai, Cariappa, Moran, 2005; Lopez-Carvalho, Kearney, 2004; Wen и др., 2005]. Более того, бактерия-комменсал, попавшая в кровоток, также, как и любой другой патоген, наносит вред организму. В то же время, исключительно агрессивный вариант ответа со стороны иммунной системы был бы опасен: бактерии-комменсалы были бы уничтожены, а возникшее воспаление привело бы к повреждению и гибели собственных клеток. В норме, однако, этого не происходит, и именно потому, что слизистые оболочки и подлежащие слои имеют специфическую организацию.

Структура, выполняющая функцию защиты, в составе слизистых оболочек – это довольно толстый и плотный слой выделяемых бокаловидными клетками муцинов, которые не позволяют одним микроорганизмам соприкоснуться с эпителием, а другим – предоставляют весьма широкие возможности для закрепления, размножения и длительного существования. Так, уже на первой стадии микробной колонизации производится отбор: комменсальные бактерии, для которых углеводные фрагменты муцинов

являются подходящим субстратом, закрепляются и выживают, а все остальные остаются в просвете и, в конечном итоге, выводятся из организма [Choudhuri и др., 2005; Suzuki и др., 2010; Johansson, Larsson, Hansson, 2011; Rooks, Garrett, 2016; Maunard и др., 2015; Pagliari и др., 2017].

Очевидно, что защита от заражения не может ограничиваться лишь механическим барьером: малейшее повреждение слизистой приводило бы инфицированию всего организма. Надзор за областью контакта между внутренней средой организма и микробным сообществом, входящими в состав нормальной и транзитной микрофлоры, осуществляют GALT (gut-associated lymphoid tissue, ассоциированная с кишечником лимфоидная ткань) и MLN (mesenteric lymph nodes, мезентеральные лимфатические узлы) (Рисунок 4).

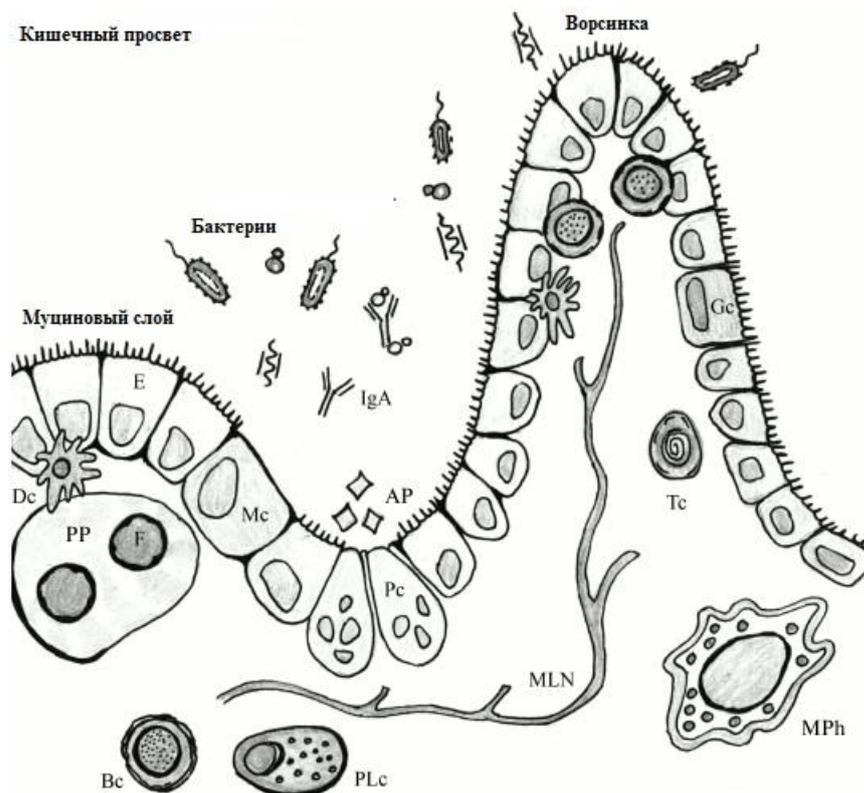


Рисунок 4. Организация ассоциированной с кишечником лимфоидной ткани; область активного взаимодействия между компонентами микрофлоры и клетками организма хозяина. F, фолликулы; PP, Пейеровы бляшки, E, энтероцит; Dc, дендритная клетка; Bc, В-клетка; PLc, плазматическая клетка; MPh, макрофаг; Tc, Т-клетка; Mc, М-клетка; Gc, бокаловидная клетка; AP, антимикробные пептиды; MLN, мезентеральные лимфатические узлы; Pc, клетка Паннета (адаптировано из Abreu и др., 2010).

Захваченные эпителиальными клетками микроорганизмы и их фрагменты не только обезвреживаются, но и воспринимаются иммунной системой как сигнал для дальнейшего развития про- или противовоспалительной реакции [Brandzaeg, 2009; Myhill и др., 2018; McGhee, Fujihashi, 2012].

В-клетки в онтогенезе

Известно, что закладка органов иммунной системы начинается на ранней стадии внутриутробного развития. К моменту рождения можно говорить лишь об относительной морфологической зрелости, но не о функциональной [Zhang, 2013; Kollman и др., 2017; Dowling, Levy, 2014; Marchant, Kollman, 2015; Simon, Hollander, McMichael, 2015; Pilgrimi и др., 1975; Savilahti, Jarvenpaa, Raiha, 1983; Hibel, Schitz, 2016; Pineda-Martinez и др., 2016; Shen и др. 2014]. С одной стороны, организм оказывается не способен защищать себя от микробной инвазии, с другой – создаются условия для формирования толерантности к ауто- и антигенам микроорганизмов-симбионтов, а также компонентам пищи. Ведущую роль в защите организма новорожденного от агрессии окружающей среды выполняют собственные макрофаги, а также множество разнообразных защитных факторов, имеющих материнское происхождение, в том числе IgA грудного молока и IgG, переданный в значительных количествах внутриутробно [Gregory, Walker, 2013; Jackson, Nazar, 2006; Kraft и др., 2013; Battersby и др., 2013; Marchini и др., 2002; Cunliffe, Mahida, 2002].

В этот период жизни – с момента рождения и до перехода к рациону питания взрослых – происходит становление микрофлоры. Активно колонизирующие полости тела микроорганизмы контактируют с эпителием кишечника и дыхательных путей, стимулируя развитие GALT и локализованных в ней структур – мезентеральных лимфатических узлов. Находящиеся здесь В1-клетки получают сигнал для конститутивного синтеза ЕАТ, а проницаемый эпителиальный слой кишечника и дыхательных путей

позволяет единичным микроорганизмам достигать кровяного русла, где они будут распознаны MZB-клетками [Hardy, Hayakawa, 2015; Zouali, Richar, 2011; Alyce, Oliver, Kearney, 2001; Schneider др., 2001, Appelgren и др., 2008; Hardy, 2006; Weller и др., 2004].

В заключение можно сказать, что все три группы клеток: B1, B2 и MZB, выполняя присущие только им одним функции, действуют согласованно, обеспечивая иммунную защиту организма на разных этапах с момента первого контакта с антигеном. Эволюционно более древний и функционально менее специфичный врожденный иммунитет составляет основу, на которой будет развиваться адаптивный ответ. Можно сказать, что высокоспецифичный набор антител – это отражение текущего состояния организма, в то время как врожденный иммунитет и EAT – это ретроспектива, причем не только на индивидуальном, но и на популяционном уровне.

1.1.3 Происхождение EAT

Клонально-селекционная теория завоевала право быть доминирующей в иммунологии, но общепринятая модель индуцированного иммунизацией антителообразования не объясняет существование EAT, присутствующих в здоровом организме в течение всей жизни. По вопросу происхождения EAT существует несколько точек зрения, которые можно сформулировать тремя гипотезами.

Первая гипотеза: EAT – результат стимулирующего действия бактерий. Данная гипотеза предполагает, что решающее значение имеет специфическая стимуляция В-лимфоцитов, производимая бактериальной микрофлорой. Репертуар EAT обусловлен разнообразием микрофлоры – источника стимулирующих антигенов [Lu, Walker, 2001; Panigrahi и др., 2008; Lopez и др., 2016; Cisalpino и др., 2017]. Впервые гипотеза бактериальной стимуляции была выдвинута в середине 20 века Спрингером и соавторами [Springer, 1971; Springer, Horton, Forbes, 1959], описавшими факт появления в крови человека анти-В (система групп крови АВ0) алло-антител в результате

контакта с бактерией, полисахарид которой структурно сходен с антигеном группы крови В. Под стимуляцией он подразумевал иммунизацию, когда в ответ на распознавание бактериального антигена появляются иммуноглобулины соответствующей специфичности. Концепция Спрингера не объясняет, почему такая стимуляция не приводит к выработке адаптивных иммуноглобулинов, а также сопутствующим этому процессу активации комплемента, развития воспаления и элиминации антигена. Ответ на этот вопрос может быть связан с природой антигена: в норме комменсалы не стремятся попасть в кровоток, вызывая бактериемию, а остаются в пределах биопленки, которую они сами и формируют. Транслокация бактерий-комменсалов является редким событием, не приводящим к повреждению слизистого слоя [Berg, 1999; Katayama, Specian, Deitch, 1997; Vega-Magana и др., 2018; Maxton и др., 1994; Fadri и др., 2015]. При этом, проникающие сквозь эпителий единичные микроорганизмы захватываются М-клетками (microfoldcells) и распознаются ближайшими АПК (антиген-презентирующими клетками) [Ohno, 2016; Tyrer и др., 2006; Mabbott и др., 2013; Rouch и др., 2016; Sakhon и др., 2015; Grutzkau и др., 1990; Jang и др., 2004; Wang и др., 2014; Rios и др., 2016; Corr, Gahan, Hill, 2008].

В пользу гипотезы Спрингера свидетельствуют модельные эксперименты [Hrncir и др., 2008; Kennedy, King, Baldrige, 2018; Fiebiger, Bereswill, Heimesaar, 2016; Grover, Kashyap, 2014], которые показали, в частности, что после контакта стерильных опытных животных с условно патогенными микроорганизмами, происходит увеличение разнообразия иммуноглобулинов и их титров. Противоречие заключается в том, что даже в отсутствие взаимодействия с окружающей средой, стерильные животные обладают определенным набором предсуществующих антител. Как показал в 2000 году Батлер с соавт., как у стерильных, так и у контактировавших с микроорганизмами животных активны одни и те же периферические В-клетки

[Buler, 2000]. Кроме того, гипотеза Спрингера не объясняет в полной мере «мирное» существование естественных аутоантител.

Вторая гипотеза: ЕАТ – результат эндогенной стимуляции. Клетки-продуценты формируются еще в период внутриутробного развития в ответ на антигены, являющиеся продуктами деградации собственных клеток. Многочисленные данные [Bovin, 2013; Holodick, Rodriguez-Zhurbenko, Hernandez, 2017, 2017; Lobo, 2016; Nagele и др., 2013; Gronwall, Sliverman, 2014] не позволяют усомниться в существовании у здоровых людей широкого набора иммуноглобулинов, способных связывать собственные антигены. Благодаря исследованиям последних двух десятилетий накоплены данные о том, что аутоантитела присутствуют в организме здоровых людей и поддерживают в организме равновесие, осуществляя клиренс метаболитов и удаляя фрагменты разрушенных и поврежденных клеток.

В дальнейшем, в течение всей жизни индивида, эти иммуноглобулины, выработанные в ответ на аутоантигены, выполняют работу по элиминированию отработанного клеточного материала, играя важную роль в поддержании гомеостаза. За счет полиреактивности этих иммуноглобулинов возможно их связывание с микробными антигенами и выполнение защитной функции [Holodick, Rodriguez-Zhurbenko, Hernandez, 2017; Avrameas, Alexopoulos, Moutsopoulos, 2018; Racine, Winslow, 2009].

Гипотеза об эндогенной стимуляции имеет экспериментальное подтверждение, однако не позволяет дать ответа на вопрос, почему при контакте с аутоантигенами не вырабатывается толерантность к ним за счет запрограммированного уничтожения клонов В-клеток, связавшихся с аутоантигеном.

Третья – гипотеза молекулярных паттернов, - предполагает, что источником антигенов-стимуляторов В-лимфоцитов являются молекулярные паттерны – группы молекул (как экзогенных, так и эндогенных),

формирующие на мембране характерные только для патологических состояний регулярные и часто встречающиеся сочетания.

На первый взгляд, молекулярные паттерны не представляются удачными мишенями для иммунитета, так как благодаря комбинаторике сочетаний, число вариантов составных антигенных детерминант стремится к бесконечности. Но более существенным оказывается другое, а именно то, что отбираются, во-первых, только те сочетания, которые сходны или даже идентичны для разных клеток, во-вторых, только многократно повторяющиеся (гриды, паттерны) комбинации, что многократно же увеличивает avidность взаимодействия с IgM. Упрощенно их можно разделить на две группы: DAMP – damage (или danger) associated molecular patterns (ассоциированные с повреждениями молекулярные паттерны) и MAMP – microorganism associated molecular patterns (ассоциированные с микроорганизмами молекулярные паттерны) [Choi, Klessig, 2016; Tang и др., 2012; Jounai и др., 2012; Schwartzman, Ruby, 2016; Garcia-Martinez, Shaker, Mehal, 2015; Feinberg и др., 2013]. DAMP – это структуры собственных клеток и тканей; изменения, которым подвергаются клетки в течение жизни, могут носить как патологический (например, при онкотрансформации), так и физиологический характер (старение, апоптоз). Формирование на клеточной мембране устойчивых псевдокристаллических молекулярных комплексов типа рафтов и кавеол общеизвестно; несложно предположить, что на мембране aberrантной клетки (например, из-за иной кривизны) нормальные белки, фосфолипиды и гликолипиды могут сформировать тоже устойчивые, но иные молекулярные комплексы – то есть DAMP – мишени для EAT. Понятие MAMP объединяет различные варианты молекул, характерных для микроорганизмов, в первую очередь, бактерий [New, King, Kearney, 2016; Varki, 2011; Mogensen, 2009; Patel, Kearney, 2016; Wolfert, Boons, 2013; Rabinovich, Kooyk, Cobb, 2012]. В строении бактерий встречаются повторяющиеся мотивы, в частности, в структуре большинства липидов А и в значительном числе коров

липополисахаридов. Но наиболее важным «материалом» повторяющихся молекулярных паттернов являются полисахариды, построенные из повторяющихся олигосахаридных звеньев. Большинство полисахаридов стремится принять конформацию спирали, причем число архетипов этих спиралей весьма ограничено, и зависит не столько от структуры моносахаридных остатков, сколько от типа связи между ними (то есть, 1 – 2, 1 – 4 и т.д.) [Горшкова, 2007]. Иными словами, практически бесконечное разнообразие первичных структур у бактериальных полисахаридов парадоксальным образом рождает общие мотивы на уровне вторичных и третичных структур – основание для распознавания надзорными ЕАТ. Как аналогию можно привести наличие всего лишь около 230 кристаллографических групп у миллионов известных кристаллических веществ, а также наличие всего лишь $\sim 10^3$ белковых фолдов у $\sim 10^5$ белков известной третичной структуры. Более того, можно предположить, что повторяющиеся молекулярные паттерны формируются соседними плотно упакованными на бактериальной стенке полисахаридами [Горшкова, 2007; Baldus и др., 1998]. Кроме полисахаридов, необходимо обратить внимание также на повторяющиеся мотивы пептидогликанов как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, к которым у человека, как экспериментально показано, формируется несколько типов ЕАТ. Косвенным образом сказанное выше подтверждается специфичностью многих лектинов, которые способны связываться с разнообразными классами гликанов, на первый взгляд совершенно различных по специфичности распознавания [Bovin, 2013; Knirel, 2014].

Все три вышеописанные гипотезы происхождения ЕАТ имеют свои преимущества и недостатки, и согласуются единым мнением о важности раннего возраста в процессе формирования репертуара ЕАТ и о стабильности их уровней в течение жизни индивида. Можно предположить, что в будущем

эти три гипотезы постигнет судьба эволюционных теорий, которые в конечном итоге были объединены в синтетическую теорию эволюции.

При попытке обобщить все три гипотезы, мы можем получить следующий сценарий. В период до своего рождения организм в норме ограничен в контактах с окружающей средой, и в связи с отсутствием стимулов для В-клеток, собственных ЕАТ у него мало; ЕАТ относятся преимущественно к классу М, в то время как способностью преодолевать плацентарный барьер обладают в норме исключительно IgG. Сразу после рождения происходит активная оккупация кишечника микроорганизмами, благодаря чему начинает формироваться репертуар ЕАТ – к классическим полисахаридным и МAMP-эпитомам бактерий, к собственным белкам, к алло- и ксено-антигенам, к DAMP и гликопептидным опухолеассоциированным эпитомам, к анионным полимерам (ДНК, ГАГ) и другим. Подчеркнем еще раз, что все разнообразие ЕАТ в этом случае будет генерироваться путем стимуляции микроорганизмами, входящими в состав нормальной микрофлоры.

Развитие методов молекулярной биологии (высокопроизводительное секвенирование) и биоинформатики (моделирование), вероятно уже в ближайшее время поможет расширить наше представление о процессах распознавания антигенов, ответной продукции иммуноглобулинов и о факторах, влияющих на формирование их репертуара.

1.1.4 АГАТ как часть пула ЕАТ

Гликаны наряду с соединениями белковой и липидной природы составляют основу строения всех живых объектов, а их участие в процессах жизнедеятельности отдельных клеток и целых организмов не ограничивается структурными и энергетическими функциями. Гликаны как компоненты мембран клеток эукариот (животных, растений и грибов) и клеточных стенок прокариот (бактерий), а также составляющие вирусных частиц участвуют в бесчисленных процессах межклеточного взаимодействия [Varki, 2017; Schnaar,

2016; Moll, Kauffman, Maisner, 2004; Chandler, Costello, 2016; Amon и др., 2014, Schnaar, 2015; Schachner, Martini, 1995; Arda, Jimenez-Barbero, 2018].

С иммунологической точки зрения гликаны – хорошая мишень для распознавания. Ввиду участия гликанов в подавляющем большинстве процессов, протекающих внутри организма, а также в связи с их широким распространением в составе микроорганизмов, способность отвечать на гликаны-антигены по сути означает управление и контроль над этими процессами и адекватную реакцию на микробную инвазию. Антигены белковой природы нуждаются в довольно длительном и сложном процессинге: молекула белка расщепляется до пептидов, которые интернализуются на мембране в комплексе с белками МНС. Эффективность иммунного ответа на пептидные антигены достигается за счет участия Т-клеток, а точнее, за счет кооперации Т- и В-клеток [Weissler, Caton, 2014; Wang, Reinherz, 2002; Yin и др., 2013; Petrova, Ferrante, Gorski, 2012; Janeway и др., 1988; Kalish, 1995; Edwards, Evavold, 2011]. Значительная часть гликанов относится к тимуснезависимым антигенам, т.е. участие Т-клеток не является обязательным, хотя и возможно в некоторых случаях [Johnson и др., 2013; Wood, Elliott, 1998; Polonskaya и др., 2017; Wang, 2012; Wong, Herscowitz, 1979; Lesinsky, Westerink, 2001; Obukhanych, Nussenzweig, 2006; Li, Bally, Schutze-Redelmeier, 2001].

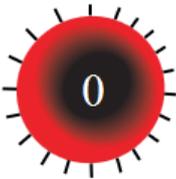
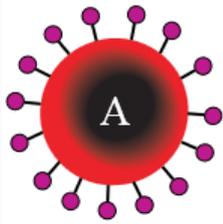
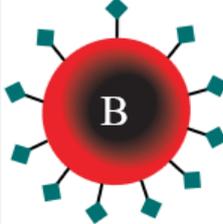
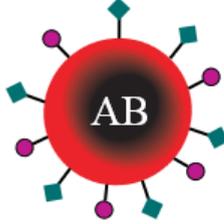
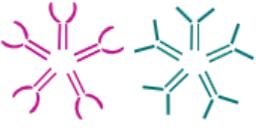
В ряде работ показано, что репертуар АГАТ в норме достаточно широк даже в отсутствие острых или хронических заболеваний. Отклонения в уровне некоторых из АГАТ ассоциированы с патологическим процессом (аутоиммунным и воспалительным), а также с онкотрансформацией [Rothstein, 2016; Hernandez, Holodick, 2017; Silosi и др., 2016; Poletaev, Boura, 2011]. В настоящий момент нельзя точно сказать, является ли повышение / понижение уровня ЕАТ причиной или следствием патологии. Однако исследования в данном направлении являются перспективными, т.к. помогут решить задачи

ранней диагностики и эффективной терапии. Кроме того, специфичность иммуноглобулинов и поиск их мишеней в организме, возможно, в будущем даст представление о механизмах развития того или иного патологического процесса и, в конечном итоге, приблизит к главной цели – предотвращению заболевания.

Помимо АГАТ, связанных с патологиями, описано две группы антител, которые составляют значительную часть всего пула ЕАТ: алло- и ксеноантитела. Несмотря на более чем вековую историю открытий, связанных с этими антителами, их происхождение и значение в организме остается предметом научных споров.

Группоспецифические антитела (или *алло-антитела*) направлены к антигенам, по которым организмы популяции или вида можно распределить на группы. Наиболее распространенная система групп крови – АВ0 (АВН) – основана на наличии или отсутствии двух антигенов-гликанов в составе гликопротеинов и гликолипидов на эритроцитах [Spalter, 1999; Milland, Sandrin, 2006; Arend, 2011]. При этом наличие в крови донора антител к антигенам А или В свидетельствует о том, что эти антигены в организме отсутствуют. При переливании несоответствующей группы крови наблюдается гемагглютинация, которая может выражаться в гемолитической анемии, почечной недостаточности, шоке и, в конечном итоге, в отсутствии должных мер, приводит к летальному исходу. В основе реакции гемагглютинации – связь антител, предсуществующих в крови реципиента, с антигеном, который был привнесен в результате переливания (Таблица 3) [Naikawa и др., 2018; Janatpour и др., 2008; Bacon, Young, 1989].

Таблица 3. Антитела и антигены в системе групп крови АВ0.

	Группа 0 (I)	Группа А (II)	Группа В (III)	Группа АВ (IV)
Тип эритроцитов				
Антитела в плазме	 α - и β -агглютинины	 β -агглютинины	 α -агглютинины	Нет
Антигены на эритроцитах	Нет	 А-агглютиноген	 В-агглютиноген	 А- и В- агглютиногены

Наследование групп крови изучено достаточно полно – известны хромосомы и генные локусы, тип наследования. В системе АВ0 продуктами генов являются гликозилтрансферазы, которые влияют на структуру гликопротеинов и гликолипидов эритроцитов и других клеток [Yamamoto и др., 1993; Yamamoto, Cid, Yamamoto, 2017; Bird и др., 1978]. Появление иммуноглобулинов к антигенам, которых в организме нет, пока не объяснено. Для чего организм вырабатывает группоспецифические антитела, также пока известно лишь отчасти. Имеются экспериментальные данные о том, что особи, имеющие разные группы крови, в различной степени устойчивы к некоторым инфекционным заболеваниям. Устойчивость может быть обусловлена как наличием предсуществующих иммуноглобулинов, так и тем, что углеводные фрагменты – потенциальные мишени для рецепторов бактерий и вирусов, в связи с отсутствием генетически детерминированных трансфераз, в организме не обнаруживаются [Skripal, 1996; Cooling, 2015; Harris, 1963; Ewald, Sumner,

2016]. Таким образом, можно сказать, что наличие нескольких форм антигенов и антител вносит в популяцию определенную долю разнообразия, которое может являться материалом для естественного отбора и механизмом выживания популяции при жестоким пандемиях.

Мишенями *ксеноантител* являются антигены, структурно чужеродные для данного организма. И если *алло*-антитела предположительно защищают организм от внутривидовой передачи инфекции, то ксеноантитела могут выполнять ту же защитную функцию, но между особями разных видов. Наиболее известны ксеноантитела, направленные к антигенами Галили ($\text{Gal}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc-}$), пентасахариду Форссмана ($\text{GalNAc}\alpha 1\text{-3GalNAc}\beta 1\text{-3Gal}\alpha 1\text{-4Gal}\beta 1\text{-4Glc-}$), а также N-гликолилнейраминовой кислоте (Neu5Gc) [Cramer, 2000; Galili, 2004; Ezzelarab, Ayares, Cooper, 2005; Cooper, 2007].

1.2 Онтогенез иммунной системы

Органы иммунной системы закладываются на ранних стадиях развития плода и к моменту рождения могут считаться морфологически сформированными. Функциональное созревание продолжается в течение длительного времени и зависит от множества факторов, важнейшими из которых считаются микробное окружение, питание, перенесенные заболевания и применение лекарственных препаратов системного действия [Simon, 2015; Kampmann, Jones, 2015; Basha, Surendran, Pichichero, 2014; Olin и др., 2018; MacGillivray, Kollman, 2014].

Принято выделять 6 этапов развития иммунной системы человека. Первый – период новорожденности, охватывающий первые 3-4 месяца после рождения. Организм, ранее не имевший прямого контакта с окружающей средой, сталкивается с большим количеством потенциальных антигенов, значительная часть которых происходит от агрессивных микроорганизмов. В этот небольшой промежуток времени происходит ряд событий, которые могут оказывать влияние на всю дальнейшую жизнь. К этим событиям можно отнести формирование относительно устойчивой микрофлоры,

стимулирующей развитие периферийных образований лимфатической системы [Dzidic и др., 2018; Toscano и др., 2017; Mueller и др., 2015]. Функцию защиты организма выполняют собственные компоненты врожденного иммунитета, а также переданные от матери антитела, антимикробные пептиды и др. [Michalski, Kan, Lavoie, 2017; Kelly, Coutts, 2000; Levy, 2007; Hanson, Winberg, 1972; Cacho, Lawrence, 2017; Levy, Wynn, 2014; Yoon, 2010; Oddy, 2001; Sarker, Gyr, 1992; Cabinian и др., 2016; Cuenca и др., 2013; Ellermann-Eriksen, 2005; Bliss, Wynn, 2017; Marodi, 2006; Rivera, 2016]. Вторым важнейшим из протекающих в это время процессов является выработка толерантного отношения к антигенам, источником которых является пища и нормальная микрофлора, а также к аутоантигенам. Доминирование пассивного иммунного ответа обеспечивает возможность новорожденному организму «знакомиться» с окружающей средой, продолжать программу развития, не тратя ресурсы на усиленную защиту [Hong, Bertoletti, 2017; Piccard и др., 2016; Maddux, Douglas, 2015; Kumar, Bhat, 2016; Calder, и др., 2006; Biagi и др., 2017; Zaura и др., 2014; Scharschmidt, 2017].

Второй этап – от 3 до 6 месяцев – характеризуется ослаблением участия защитных факторов материнского происхождения. К концу первого полугодия в большинстве случаев в рацион ребенка вводится прикорм. Основа будущего рациона питания стимулирует развитие ферментативной активности ЖКТ [Giannattasio и др., 2015; Niers и др., 2007; Prescott, 2016; Ben X-M, 2008; Moormann, 2009; Esteve-Sole, 2017; Niewiesk, 2014].

С 6 месяцев до 2 лет происходит окончательный переход к обычной пище взрослого человека; существенно расширяются контакты с окружающей средой, когда ребенок начинает самостоятельно передвигаться. Адаптивный иммунитет начинает полноценно функционировать: NK- и Т-клетки стимулируют продукцию полноценного профиля цитокинов, что и обеспечивает адекватную стимуляцию продуцирующих антитела В-лимфоцитов [Giulmont и др., 2011; Kollman и др., 2017; Georgeson и др., 2001].

Четвертый этап продолжается примерно до 6-летнего возраста и завершается практически окончательным формированием микрофлоры и местного иммунитета.

К пятому этапу, который наступает в подростковом возрасте и продолжается до преклонного, все звенья иммунитета завершают свое развитие. Повышение секреции половых гормонов приводит к подавлению клеточного иммунитета и стимуляции гуморального. Наблюдаются инволютивные изменения в лимфатической ткани: разрастается соединительная ткань, уменьшается количество мезентеральных лимфатических узелков с центрами размножения [Dowling и др., 2014; Chaplin, 2010; Thrane, Rognum, Brandtzaeg, 1991; Brodin, Davis, 2017; Montecino-Rodriguez, Berent-Maoz, Dorshkind, 2013; Razavi и др., 2015].

Шестой период соответствует пожилому и старческому возрасту и сопровождается ослаблением функциональной активности Т- и В-клеточного звена иммунитета [Georgountzou, Papadopoulos, 2017; Хаитов, 2013; Zasada и др., 2014; Castle и др., 2005; Li, Manwani, Leng, 2011].

На протяжении всей жизни заложенная в геноме информация реализуется под действием внешних факторов, важнейшими из которых являются микрофлора и компоненты питания. Особенно существенное влияние они оказывают на развитие иммунной системы в течение первых нескольких месяцев после рождения, когда организм представляет собой «открытую систему», восприимчивую к внешнему воздействию. Результатом адекватного стимулирования иммунитета становится устойчивое гомеостатическое равновесие [Yang и др., 2016; Melville, Moss, 2013; Inman и др., 2010; Saso, Kampmann, 2017; Sharma и др., 2012; Yu и др., 2018; Olin и др., 2018; Georgountzou, Papadopoulos, 2017].

1.2.1 Особенности иммунитета плода и новорожденного

Состояние развития иммунной системы новорожденного в литературе часто описывается как физиологический иммунодефицит [Horwitz, Kung, McGeady, 2010; Sandberg и др., 2000; Rai, Wu, Shen, 2015; Grether и др., 2016; Cohen, Norins, 1968; Ozdemir и др., 2016; Agarwal, Cunningham-Rundles, 2007; Conway, Dear, Smith, 1985; Iyengar, Selvaray, 1972; Sharma, Lal, Saigal, 1991]. Особенно четко он прослеживается при анализе концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови (Рисунок 5).

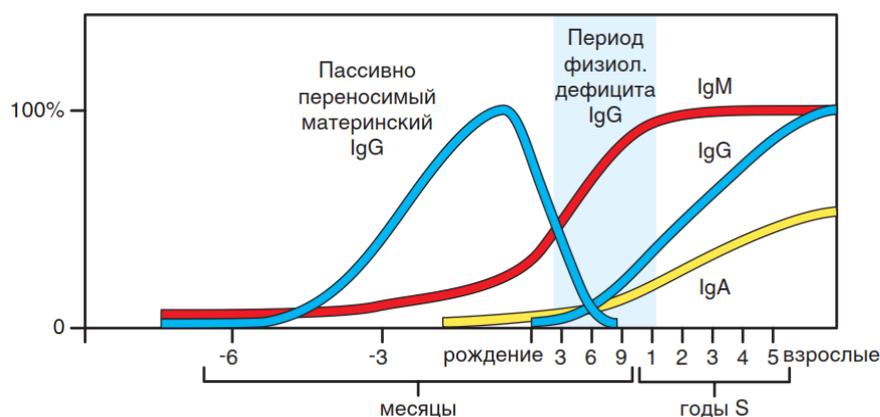


Рисунок 5. Изменение концентраций иммуноглобулинов основных классов в крови детей в онтогенезе [Ярилин, 2010].

Пик концентрации IgG, который наблюдается при рождении, а затем постепенно снижается, отражает внутриутробную передачу иммуноглобулинов этого класса из организма матери через плаценту [White и др., 2014; Narula и др., 2017; Nagendran, Emmanuel, Bansal, 2015; Ravivarma и др., 1979; Voersma, 1981; Palmeira и др., 2012]. Считается, что репертуар специфичности IgG у ребенка совпадает с материнским, что принципиально оправдано: с микроорганизмами, с которыми столкнулась в течение своей жизни мать и в ответ на которые выработались соответствующие IgG, с большой долей вероятности встретится и ребенок [Einarsdottir и др., 2013; Fouda и др., 2018; Koch и др., 2016; Gross и др., 2000]. IgM, в норме не

проникающий через плаценту, у детей обнаруживается в количестве, составляющем 5 – 10% от уровня взрослого человека. Синтез собственных иммуноглобулинов этого класса начинается еще до рождения и постепенно нарастает, достигая к концу первого года жизни 70 – 80% от взрослого уровня [Meyer, Malan, 1993; Haider, 1972; Cheng и др., 2012]. Собственных IgA у новорожденных почти нет – значительные количества секреторного IgA поступает с материнским молоком при грудном вскармливании. Содержание сывороточного IgA в крови годовалого ребенка не превышает 10 – 20% от взрослого уровня [Reen, Puri, 1983; Rogosch и др., 2012; Weemaes и др., 2003]. Таким образом, первые полгода гуморальная защита ребенка осуществляется в основном иммуноглобулинами материнского происхождения. Кроме того, отметим, что приведенные данные касаются общей фракции иммуноглобулинов – без разделения по их специфичности на антигликановые или направленные к пептидам. Можно лишь предполагать, что, если материнские иммуноглобулины могут распознавать антигены различной природы, то собственные иммуноглобулины ребенка скорее всего направлены в основном к гликанам – фрагментам бактериальных полисахаридов. Такое предположение может быть построено на двух фактах: во-первых, кооперация В- и Т-клеток, необходимая для выработки специфических иммуноглобулинов к фрагментам пептидной природы, еще не осуществляется в полной мере, а полисахариды могут распознаваться без участия Т-клеток; во-вторых, отсутствие сформированной биопленки в кишечнике позволяет значительному количеству бактерий тесно контактировать непосредственно с кишечным эпителием [Olin и др., 2018; Basha и др., 2014]. В любом случае, АГАТ должны составлять значительную часть пула ЕАТ новорожденных по крайней мере до того момента, когда достаточного развития достигнет тимус и Т-клеточное звено иммунитета.

1.2.2 Фактор питания в становлении иммунной системы новорожденного

Как уже было сказано выше, ведущую роль в защите иммунной системы плода и новорожденного играют иммуноглобулины и другие иммуноактивные молекулы, такие, как, например, антимикробные пептиды, переданные от матери внутриутробно и затем с грудным молоком [Oddy, 2001; Cacho, Lawrence, 2017; Hanson, Soderstrom, 1981; Jakatis, Denning, 2014]. В процессе вскармливания ребенку также передаются бактерии, входящие в состав нормальной микрофлоры матери. Источниками микроорганизмов являются в большей степени кожные покровы; в самом молоке также обнаруживается некоторое количество бактерий [Biagi и др., 2017; Mueller и др., 2015; Mandar, Mikelsaar, 1996; Pannaraj и др., 2017; Bhatia и др., 1989].

Большое значение имеет также углеводная фракция женского молока, состоящая из более чем 400 разнообразных гликанов и достигает 6 – 7% от общей массы сухих веществ. Состав и количество могут варьировать между индивидами, а также в течение периода лактации: от 20 – 25 г/л в молозиве до 5-20 г/л в зрелом молоке [Doherty и др., 2018; Ayechu-Muruzabal и др., 2018; Plaza-Diaz, Fontana, Gil, 2018; Bode, 2012; Jantscher-Krenn, Bode, 2012].

Практически все ОС человеческого молока содержат лактозу на восстанавливающем конце; этот дисахарид может быть удлинен β 1-3 или β 1-6 связанными лакто-N-гликанами, часто разветвленной структуры) (Рисунок 6) [Vandenplas и др., 2018; German и др., 2008; Smilowitz и др., 2014].

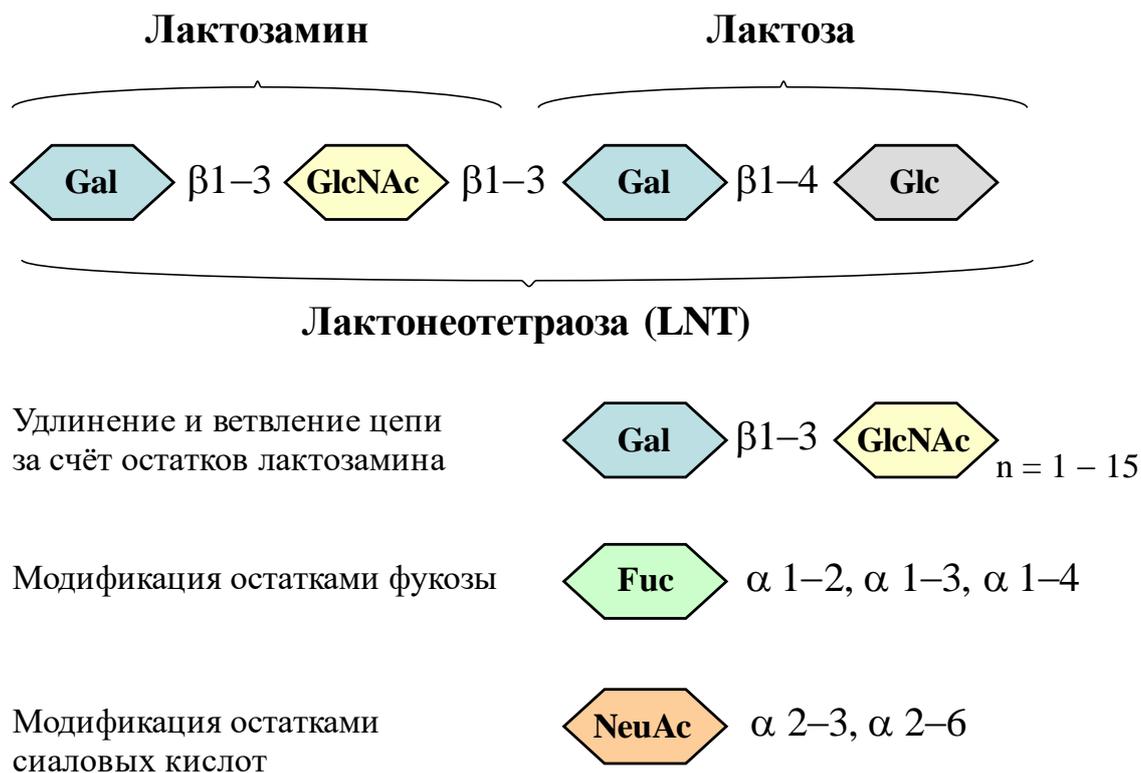


Рисунок 6.Обобщенная структура олигосахаридов грудного молока.

Основной функцией олигосахаридов молока является противомикробная защита, которая осуществляется благодаря тому, что гликаны выступают как ингибиторы связывания патогенных микроорганизмов с эпителиальными клетками ребенка, а также как вещества-пребиотики, необходимые для выживания микроорганизмов-комменсалов [Chen, 2015; Vode, 2015; Triantis, Vode, Neereven, 2018].

Олигосахариды как ингибиторы адгезии патогенных микроорганизмов на эпителиальных клетках. В физиологических условиях у взрослого человека слизистая кишечника покрыта биопленкой. Количество колоний микроорганизмов в толщине биопленки может достигать нескольких сотен и даже тысяч слоев. Закрепленные таким образом клетки бактерий имеют несомненное преимущество перед не иммобилизованными клетками и лучше выживают, не позволяя патогенным микроорганизмам транзитной микрофлоры проникать и закрепляться в этом слое [Cravioto и др., 1991; Craft,

Townsend, 2018; Liu, Newburg, 2013; Macrobal и др., 2010]. У новорожденного слой биопленки отсутствует, как неразвит и собственный слизистый иммунитет. В самом начале процесса активной колонизации полостей тела, эпителий экспонирует набор разнообразных структур пептидно-углеводной природы, которые могут распознаваться и патогенными микроорганизмами, т.к. конкуренция за сайты связывания еще недостаточно велика [Corra и др., 2006; Facinelli и др., 2018; Laucirica и др., 2017; Andreas и др., 2016]. В этот период особое значение приобретает тот набор олигосахаридов в составе грудного молока, который структурно схож с углеводами эпителиальных клеток. Наиболее подробно описано ингибирование связывания *Campylobacter jejuni* [Weichert и др., 2016; Yu, Nanthakumar, Newburg; 2016]: в опытах с мышами была показана способность к ингибированию связывания этих бактерий с клетками организма-хозяина при добавлении в среду Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc [Ruiz-Palacios и др., 2003; Castanys-Munoz, Martin, Prieto, 2013]. Аналогично Fuc α 1-2Gal оказывает защитный эффект от действия токсина кишечной палочки в организме новорожденных мышат [Pickard, Chervonsky, 2015; Hooper et al., 1999]. В человеческой популяции у 80% представителей европеоидной расы олигосахариды, содержащие Fuc α 1-2Gal-эпитоп, являются доминирующими в составе ОС фракции молока [Kobata, 2010; Leoz и др., 2012; McGuire и др., 2017]. Ингибирование связывания свойственно не только в отношении бактерий, но и вирусов и простейших. В частности, для некоторых представителей групп норовирусов и ротавирусов также отмечено углевод-опосредованное прикрепление к клеткам макроорганизма [Weichert и др., 2016; Morozov и др., 2018; Abrahamsson, Sherman, 2014].

Олигосахариды молока как пребиотики. ОС грудного молока имеют не только питательную ценность, но и служат субстратом для многочисленных микроорганизмов, активно заселяющих слизистые оболочки в организме новорожденного. При грудном вскармливании преимущество получают

бактерии комменсальной флоры, относящиеся в основном к *Bifidobacterium* и *Bacteroides spp.* Метаболизм этих микроорганизмов настроен на эффективное использование ОС молока в качестве субстрата. В отсутствие молочных ОС они проигрывают конкуренцию клостридиям, энтерококкам, разнообразным штаммам кишечной палочки, эубактериям, стафилококкам, стрептококкам и проч. [McVeagh, Miller, 1997; Sela, 2011; Macrobal, Sonnenburg, 2012; Wang и др., 2015; Gotoh и др., 2018; Ozcan, Sela, 2018; Li и др., 2012; Garrido и др., 2015]. Примечательно, что внутри группы бифидобактерий существует разделение: одна группа бактерий обладает набором гликозидаз для внеклеточного расщепления ОС, другая – использует их напрямую; таким образом достигается максимально полное использование субстрата [Thomson, Medina, Garrido, 2018; Asakuma и др., 2011; Kitaoka, 2012].

Приведенный пример – лишь один из многочисленных вариантов взаимосвязи между питанием и микроорганизмами формирующейся микрофлоры. В действительности функционирует целая сеть таких связей, которая дополняется действием антимикробных соединений, иммуноглобулинов и гормонов, передаваемых с материнским молоком. Отличия между человеческим и молоком сельскохозяйственных животных касаются практически всех составляющих, в том числе и углеводной фракции. У человека 50 – 80% ОС фукозилированы; у прочих животных на долю фукозилированных ОС приходится менее 1% ОС. Общее количество ОС в молоке с/х животных меньше на несколько порядков по сравнению с человеком, а соотношение сиалированных по отношению к остальным ОС – выше [Seppo и др., 2017; Urashima и др., 2013; Martin-Sosa и др., 2003; Zivkovic, Barile, 2011; Aldredge и др., 2013; Bienenstock и др., 2013; Sundekilde и др., 2012]. Кроме того, у коров, к примеру, обнаруживается N-гликолилнейраминная кислота, которую клетки человека не синтезируют. Еще одна структура, характерная для коровьего, но не человеческого молока:

Gal α 1-3Gal β 1-4Glc [Nakano, Sugawara, Kawakami, 2001; Kim и др., 2015; Sischo и др., 2017].

N-ацетилнейраминовая кислота – доминирующая или вообще единственная форма сиаловой кислоты, которая имеется в организме человека. Искусственные смеси чаще всего практически не содержат сиаловых кислот [Tram и др., 1997; Mudd и др.; 2016; Wang и др., 2001; Gege и др., 2017; Charbonneau и др., 2016]. Бета-глюканы, присутствующие в грудном молоке человека, имеют иммуномодулирующий эффект: могут переноситься через эпителий кишечника в системный кровоток, связываться с клетками GALT и изменять экспрессию паттерн-распознающих рецепторов, а также могут повышать уровни экспрессии интерлейкина-12, помогая противостоять инфекции золотистым стафилококком и *Candida albicans* [Triantis, Bode, Neereven, 2018; Kankkunen и др., 2010; Gonia и др., 2015; Akkerman, Faas, Vos, 2018].

Добавление в состав искусственных смесей пребиотиков углеводной природы (ФОС – фруктоолигосахаридов и ГОС - галактоолигосахаридов) повышает качество производимых смесей, но, тем не менее, не позволяет приблизиться к разнообразию олигосахаридов человеческого молока [Vandenplas, Greef, Veerman, 2014; Bakker-Zierikzee и др., 2005; Ven и др., 2008; Brady, 2012].

В последнее десятилетие активно развивается направление в разработке методов оптимизации состава специализированных молочных смесей. Это связано как с увеличением доли детей, проявляющих аллергическую реакцию на белки молока, так и с повышением выживаемости глубоко недоношенных детей, организм которых требует к себе повышенного внимания.

Специализированное питание для новорожденных может быть представлено несколькими основными видами: смеси, изготовленные на основе частично гидролизованного белка молока коров и других

сельскохозяйственных животных; смеси, представляющие собой результат глубокого гидролиза белков молока (смесь пептидов менее 1,5 кДа); смесь свободных аминокислот; соевые формулы, не содержащие белков животного происхождения [Rossen, Simon, Herrick, 2016; Hong, 2018; Martin, Ling, Blackburn, 2016]. Все эти виды находят применение в современной педиатрической практике, однако зачастую их состав плохо охарактеризован с точки зрения химии.

Более 20 белков коровьего молока способны вызвать аллергические реакции у человека, но основная роль принадлежит казеинам и сывороточным белкам – β -лактоглобулину, α -лактальбумину и бычьему сывороточному альбумину [Pina-Perez, Martinez, Rodrigo, 2017; Cesa и др., 2015; Lopez, Cauty, Guyomarc'h, 2015; Corkins, Shurley, 2016]. Высокая иммунореактивность этих белков обусловлена их устойчивостью к действию пищеварительных ферментов в ЖКТ человека [Vandenplas, 2017; Vandenplas, Greef, Devreker, 2014; Hochwallner и др., 2014; Guan hao и др., 2013; Cafarelli и др., 2010]. Расщепление белков позволяет в значительной степени снизить иммуногенность получаемых продуктов, и потому они находят широкое применение в питании детей, страдающих аллергией и непереносимостью пищевых компонентов различной природы. Более глубокий гидролиз еще более снижает иммуногенность белков, однако даже в этом случае аллергические реакции не исключены полностью [Szajewska, Horvath, 2017; Halken и др., 2000; Hochwallner и др., 2017].

Производство специализированного детского питания осуществляется методом ферментативного гидролиза с использованием ферментов – эндо- и экзопептидаз, чаще всего бактериального происхождения. В связи с тем, что сама по себе реакция гидролиза протекает стохастически, сведения о составе получаемой смеси пептидов ограничены. Затруднена и стандартизация, т.к. конечная форма таких продуктов зависит от исходного сырья и активности ферментов. Таким образом, организм новорожденного, для которого в норме

характерна повышенная восприимчивость к антигенному окружению, ежедневно и в значительных количествах получает в качестве питания смесь потенциально иммуногенных соединений. То, что ребенок хорошо воспринимает эту форму питания (нормальный и регулярный стул, отсутствие аллергических реакций), не гарантирует отсутствие отдаленных негативных последствий [Ryan, Nay, 2016; Wright, Waterston, 2006; Selvamuthukumar, Muthukumar, Shukla, 2016; Hirpara, Patel, Prajapati, 2015].

1.2.3 Микрофлора

К настоящему моменту принято считать, что к числу наиболее распространенных и постоянных участников микробного сообщества относится не менее 500 видов микроорганизмов, которые формируют стабильные колонии на слизистых оболочках. А количество минорных может достигать 1000 и более [Thursby, Juge, 2017; Lloyd-Price, Abu-Ali, Huttenhower, 2016; Fouhy и др., 2012; Fujimura и др., 2010; Tuddenham, Sears, 2015; Rodriguez и др., 2015]. Для нас наибольший интерес представляет микрофлора желудочно-кишечного тракта, как область контакта компонентов пищи, микроорганизмов и клеток иммунной системы.

Распределение бактерий на протяжении пищеварительной трубки неравномерно: минимальное количество отмечено для желудка, имеющего кислую реакцию среды, максимальное – для прямой кишки, количество микроорганизмов в которой достигает $10^{12} - 10^{14}$ КОЕ/мл [Thursby, Juge, 2017]. Несмотря на большое количество микроорганизмов, населяющих с различной плотностью организм человека, встречающиеся бактерии относятся, во-первых, в основном к анаэробам, а во-вторых, к *Bacteroidetes* и *Firmicutes* [Evaldson и др., 1982; Selber-Hnatiw и др., 2017; Shreiner, Kao, Young, 2015; Mariat и др., 2009; Ismail и др., 2011], т.е. к двум бактериальным типам из 50 известных науке, что свидетельствует о длительном эволюционном развитии взаимоотношений млекопитающих и

микроорганизмов [Foster и др., 2017; Davenport и др., 2017; Quercia и др., 2014].

На протяжении всей жизни и даже до рождения человека его микрофлора видоизменяется, отражая действие множества внешних факторов. Наибольшее значение имеют характер питания, генотип организма-хозяина и взаимодействия внутри микробного сообщества. Второстепенное значение отводится случайным событиям – таким, как перенесенные заболевания, применение некоторых лекарственных препаратов, – которые, тем не менее, также находят отражение в составе микрофлоры. Различия в видовом составе микрофлоры между индивидами велико; состав микрофлоры одного человека – относительно постоянен [Wen, Duffy, 2017; Conlon, Bird, 2015; Moeller, Ochman, 2013; Yatsunenکو и др., 2012; Lagier и др., 2012; Hall, Tolonen, Xavier, 2017].

В детском возрасте микрофлора претерпевает значительные изменения в течение первых 1–2 лет жизни. Формирование микрофлоры новорожденного можно условно разделить на 3 стадии. Первая – первичная колонизация – начинается с момента рождения и длится 1–2 недели. Организм ребенка впервые сталкивается с микроорганизмами, входящими в состав вагинальной микрофлоры матери при прохождении по ее родовым путям. В том случае, если ребенок появляется на свете путем Кесарева сечения, первым источником микроорганизмов является больничный персонал. Разница в составе микрофлоры новорожденных, которые родились при этих двух типах родоразрешения, подтверждается рядом исследований [Wampach и др., 2017; Laforest-Lapoint, Arrieta, 2017; Korpela, Vos, 2018; Milani и др., 2017; Walker, 2017; Neu, Rushing, 2011]. Срок гестации также оказывает влияние на процесс формирования микрофлоры новорожденных. Даже у доношенных детей слизистый эпителий не является полностью сформированным и по сравнению с взрослыми считается относительно проницаемым. У недоношенных детей степень проницаемости выше, и

зачастую именно это является основной причиной врожденных инфекций, а не внутриутробная («вертикальная») передача от матери [Grier и др., 2017; Chu и др., 2018; Choi, Song, 2017; Groer и др., 2014].

Вторая фаза колонизации микроорганизмами продолжается то время, пока ребенок питается грудным молоком, и в течение этого промежутка времени состав микрофлоры во многом зависит от компонентов молока, здоровья матери, а также тем, используются ли искусственные молочные смеси в дополнение к грудному молоку [Houghteling, Walker, 2015; Timmerman и др., 2017; Wang и др., 2017].

Третья фаза начинается с момента перевода ребенка на взрослую пищу, и по окончании её дети, независимо от того, чем их кормили ранее, становятся близки к взрослым по составу микрофлоры [Chen и др., 2017; Voreades, Kozil, Weir, 2014].

Является ли микрофлора непременным условием выживания макроорганизма? В принципе, ее полное отсутствие не фатально, и при сохранении стерильности подопытные животные доживают до старости [Hugenholtz, Vos, 2018; Umesaki, 2014; Phillips, 2009]. Введение в среду инфекционных агентов приводит к заражению с более интенсивным проявлением симптомов, чем у особей, обитавших в стандартных условиях, вплоть до летального исхода. Перевод к обычным условиям обитания под контролем, подразумевающим очищение воды, пищи и воздуха от потенциально опасных микроорганизмов, обогащение рациона пре- и пробиотиками инициирует развитие GALT и механизмов местной иммунной защиты, причем независимо от возраста животного [Сebra и др., 1998; Zhang и др., 2016; Rooks, Garrett, 2016]. Однако даже при удачном стечении обстоятельств животные, раннее постнатальное развитие которых проходило в стерильной среде, будут отличаться, т.к. контакт с микроорганизмами крайне важен именно в ранний период, когда формируется толерантность к

собственным антигенам и антигенам пищи, а также к представителям нормальной микрофлоры [Maranduba и др., 2015; Shi и др., 2017].

Взаимодействие микроорганизмов в рамках микробного сообщества в составе микрофлоры, а также с макроорганизмом, включает следующие аспекты:

- конкуренция микроорганизмов за питательные вещества и сайты адгезии;
- внутри- и межвидовое взаимодействие;
- прямой контакт между компонентами бактерий – такими, как липополисахариды и пептидогликаны;
- взаимодействие бактерий с рецепторами клеток макроорганизма;
- секреция бактериальных компонентов, способных взаимодействовать с кишечным эпителием и модулинами, которые, в свою очередь, напрямую могут влиять на функцию клеток макроорганизма (на иммунный ответ, гликозилирование и т.д.) [Jones, 2016; Munger и др., 2018].

Вопрос разнообразия микроорганизмов, для которых средой обитания является другой организм, очень интересен и имеет фундаментальное значение. Изучение взаимосвязи между микрофлорой и иммунной системой в раннем возрасте открывает перспективы более глубокого понимания механизмов иммунной защиты.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

Список используемых реактивов

Список использованных реактивов приведен в Таблице № 4.

Таблица 4. Использованные в работе реактивы

Реактив	Производитель	Этап эксперимента
Гидрофосфат натрия		Буфер для растворения лигандов и последующей печати на активированной подложке гликочипа
Фосфатный буфер	Sigma-Aldrich, США	Буфер для разведения сывороток, вторичных антител и препаратов ВВИГ
Флуоресцентно меченные иммуноглобулины козы, направленные против IgG и IgM человека, goat-anti-human-IgG-Alexa555, goat-anti-human-IgM-Alexa647	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific (США)	Детекция сывороточных антител, связавшихся с лигандами, иммобилизованными на поверхности гликочипа
Биотинилированные иммуноглобулины козы, направленные против иммуноглобулинов человека G, M, A. Biotinylatedgoat-anti-humanIgG, IgM, IgA	Thermo Fischer Scientific (США)	Детекция сывороточных антител, связавшихся с лигандами, иммобилизованными на поверхности гликочипа
Флуоресцентно меченный стрептавидин, Streptavidin-Alexa555, Streptavidin-Alexa647	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific (США)	Детекция вторичных биотинилированных антител, связавшихся с сывороточными антителами; положительный контроль при печати гликочипов
Этаноламин		Блокировка активной поверхности гликочипов после печати и иммобилизации лигандов
Борная кислота		Блокировка активной поверхности гликочипов после печати и иммобилизации лигандов
Детергент Tween 20	ICN (США)	Компонент всех видов использованных в работе буферов
БСА (бычий сывороточный альбумин)		Буфер для разведения сывороток крови, препаратов ВВИГ, вторичных меченных реагентов.
Азид натрия, NaN ₃	Serva (Германия)	Добавляется в качестве консерванта в буфер для разведения сывороток крови, препаратов ВВИГ, вторичных меченных реагентов, а также в буфер для разведения лигандов для последующей печати на гликочипах
КИП, комплексный иммуноглобулиновый препарат	Иммуногем (Россия)	Контроль качества печати партий гликочипов (с последующим расчетом корреляций).
Лектины растительного происхождения (набор ВК-1000: ConA, SBA, WGA, DBA, UEA I, RCA, PNA)	Vector Laboratories (США)	Контроль качества печати партий гликочипов (с последующим расчетом корреляций).
Лектины растительного происхождения (набор ВК-2000: GSL I, PSA, LCA, PNA-L, PNA-E, SJA, SucWGA)	Vector Laboratories (США)	Контроль качества печати партий гликочипов (с последующим расчетом корреляций).
Лектины растительного происхождения (набор ВК-3000: DSL, ECL, GSL II, Jacalin, LEL, STL, VVL)	Vector Laboratories (США)	Контроль качества печати партий гликочипов (с последующим расчетом корреляций).

Библиотека гликанов, использованных для изготовления гликочипов, включает (1) синтетические гликаны чистотой >95% (в основном синтезированы в лаборатории углеводов Института биоорганической химии РАН), бактериальные *O*-полисахариды и липополисахариды (выделенные и охарактеризованные в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН). Данные о структурах полисахаридов, спектры ЯМР и соответствующие ссылки содержатся в базе данных <http://csdb.glycoscience.ru/bacterial> (Институт Органической химии им. Н.Д. Зелинского, Москва, Россия). Полный список гликанов, использованных в работе, содержится в Приложении 1 (Таблица 1).

В число пластиков, использованных для изготовления гликочипов, вошли: Циклоолефин, циклоолефин-SiO₂, (Zeonor, Япония), полициклоолефин (Sumitomo Bakelite, Япония), поливинилхлорид (ПалРам, Россия), полиметилметакрилат (Асгума, Россия), поливинилхлорид (Vikupet, Россия), поликарбонат (Vekarplan, Германия), поликарбонат (QuinnPlastics, Германия), ударопрочный полистирол (Gebau, Германия), полиметилметакрилат (Evonik, Германия), полиметилметакрилат (Novattro, Россия), поливинилхлорид (Zenofol, Япония), полиметилметакрилат (Safplast, Россия), полистирол (Polylinx, США), полистирол (Hyundai, Корея).

Список использованных приборов

Список использованных приборов приведен в Таблице 5.

Таблица 5. Список приборов, использованных в работе.

Приборы	Производитель	Этап работы
Контактный принтер микрочипов MicroGrid	BioRobotics (Кембридж, Англия)	Печать гликочипов в Институте клеточной и молекулярной медицины (PanumInstitute, Копенгаген, Дания).
Бесконтактный принтер микрочипов sciFLEXARRAYERS5	ScienionAG (Берлин, Германия)	Печать гликочипов на базе ООО «Семиотик» и лаборатории углеводов ИБХ РАН
Контактный принтер микрочипов MicroGrid	BioRobotics (Кембридж, Англия)	Готовые гликочипы с предоставлением субстанций (углеводные лиганды, синтезированные в лаборатории углеводов ИБХ РАН)
Сканер микрочипов ScanArray	PerkinElmer (Уолтем, Массачусетс, США)	Получение флуоресцентных изображений
Сканер микрочипов Innoscan 1100 AL	Innopsys (Карбон, Франция).	Получение флуоресцентных изображений
MArS Ditabis	Ditabis (Пфорцхайм, Германия)	Получение флуоресцентных изображений
ScanArray Express V.4.0	PerkinElmer (Уолтем, Массачусетс, США)	Обработка флуоресцентных изображений (т.е. перевод в «цифровой» вариант)
Excel MS Office	Microsoft (Вашингтон, США)	Первичная статистическая обработка данных
Центрифуга Minispin	Eppendorf (Гамбург, Германия)	Подготовка лигандов для печати; предварительная подготовка растворов сывороток для анализа на гликочипе
Фильтр шприцевой	Millipore	Очистка буфера для печати гликочипов
pH-метр	Mettler Toledo (Грайфензее, Швейцария)	Все используемые в работе буферные растворы
Магнитная мешалка	Heidolf (Швабах, Германия)	Перемешивание растворов
Термошейкер Unimax 1010, Inkubator 1000	Heidolf (Швабах, Германия)	Анализ сывороток крови и КИПа на гликочипах

Сыворотки крови человека и животных

Список исследованных с помощью гликочипа сывороток крови человека и животных представлен в Таблице 6.

Таблица 6. Сыворотки человека и животных, проанализированные с помощью гликочипа

Группы доноров / животных	Подгруппы доноров / животных	Количество образцов	Раздел работы
Мыши-гнотобиоты ²	сохранение условий стерильности	4	Исследование репертуара антител 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 ³	SPF (specific pathogen free)	20	Исследование репертуара антител в сыворотках крови инбредных мышей
Новорожденные в возрасте 3 дней и...		9	Исследование репертуара антител в сыворотках крови детей первого года жизни.
их матери ⁴ ...		8	

²Сыворотки крови мышей-гнотобиотов были предоставлены Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, The Wallenberg Laboratory for Cardiovascular and Metabolic Research. Протокол содержания и использования животных в исследованиях был одобрен Университетом Гётеборга (University of Gothenburg Animal Studies Committee).

³ Сыворотки крови инбредных BALB/с мышей были предоставлены Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL). Протокол содержания и использования животных в исследованиях был одобрен «Этическим комитетом по содержанию и использованию животных с целью исследований» и Правительством Каталонии. Все процедуры манипуляции осуществлялись в соответствии с «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health» (НИН Публикация №85-23).

⁴ Сыворотки крови новорожденных и их матерей были предоставлены ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. ак. В.И. Кулакова» Министерства Здравоохранения РФ. Забор крови осуществлялся с информированного согласия пациентов и их законных представителей в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения РФ от 21 июля 2015 г. N474н "О порядке дачи информированного добровольного согласия..." с использованием стандартных методик.

Таблица 6. Продолжение

Группы доноров / животных	Подгруппы доноров / животных	Количество образцов	Раздел работы
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 антител 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 ⁵		20	
Здоровые взрослые доноры		10	
Женщины с нормально и патологично протекающей беременностью, либо здоровые небеременные женщины ⁶	нормально протекающая беременность	95	Исследование репертуара АГАТ в сыворотках крови пациенток, страдающих акушерскими патологиями, а также здоровых доноров.
	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		

⁵ Сыворотки крови детей в возрасте до 12 месяцев и их матерей были предоставлены Университетом Фронтеры, Темуко, Чили. Забор крови осуществлялся с информированного согласия пациентов и их представителей, с помощью стандартных методик.

⁶ Сыворотки крови женщин с нормальной и осложненной беременностью были предоставлены ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. ак. В.И. Кулакова» Министерства Здравоохранения РФ. Забор крови осуществлялся с информированного согласия пациентов и их законных представителей в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения РФ от 21 июля 2015 г. N474н "О порядке дачи информированного добровольного согласия..." с использованием стандартных методик.

2.2 Методы

2.2.1 Печать гликочипов

Печать гликочипов производилась путем контактной печати на приборе Microarrayer Microgrid II, а также бесконтактной – на приборе SciFLEXARRAYER S5 в условиях 50% влажности. В качестве подложки использовались стекла в формате предметных, покрытых активированным полимером, производства Schott Nexterion slide H (Schott Nexterion®, Майнц, Германия).

Лиганды – полисахариды и аминоспейсерированные или конъюгированные с полиакриламидом олигосахариды, в концентрациях 10 мг/мл и 50 μ M соответственно в фосфатном буфере, pH 8,5, вносили в лунки 384-луночных планшетов (Corning, Нью-Йорк, США), центрифугировали в режиме «ShortSpin» (центрифугирование в режиме «pulse») для сбрасывания капель и равномерного распределения жидкости в объеме лунки планшета.

Полный список гликанов, использованных для печати гликочипов, приведен в Таблице 1 Приложения 1.

Сразу после печати лигандов, слайды помещали во влажную камеру при комнатной температуре на 1 час, в течение которого продолжается и завершается реакция между активными группами поверхности слайда и активной частью олиго- и полисахаридов.

По окончании инкубации во влажной камере полученные таким образом гликочипы блокируются в течение полутора часов при комнатной температуре этаноламином, входящим в состав блокировочного буфера: 25 mM этаноламин, 100 mM борная кислота, 0.2% Tween 20, pH 8.5. В ходе данной процедуры все не прореагировавшие (т.е. не вступавшие в контакт с лигандами) активные группы поверхности блокируются во избежание дальнейшего связывания их с реагентами, которые будут использоваться в процессе анализа.

Контроль качества

Контроль наличия образца лиганда в заданной точке на поверхности слайда в случае печати контактными принтерами определялся путем последующего сканирования каждого из изготовленных гликочипов в режиме «Red reflect» (Red Reflect fluorophore-defined – сканирование в отраженном свете) на приборе ScanArray. Контроль наличия образца лиганда в заданной точке на поверхности стекла в случае печати бесконтактным принтером sciFLEXARRAYER S5 определялся автоматически за счет встроенной в прибор горизонтальной CCD камеры (charge-coupled device, прибор с зарядовой связью), позволяющей оценивать забор нужного объема образца капилляром и его перенос на поверхность.

В качестве положительных контролей для последующей оценки флуоресцентных сигналов использовался флуоресцентно-меченный Alexa555 и Alexa-647 стрептавидин в концентрации 20 мкмоль/л. В качестве отрицательных контролей – неспейсерированная трегалоза в концентрации 50 мМ и/или раствор, представляющий собой буфер для последующей блокировки активных групп на поверхности гликочипа (см. далее в разделе «Подготовка гликочипов для анализа»).

Анализ качества результатов гликочипа включает несколько пунктов:

- Визуальный контроль качества;
- Межслайдовый контроль качества;
- Внутрислайдовый контроль воспроизводимости.

Визуальный контроль качества результатов гликочипа.

Контроль проводится на этапе сканирования гликочипа. Полученные изображения просматриваются на предмет наличия видимых дефектов: неоднородность фона и его высокие значения, общая интенсивность сигналов слишком низкая, видны следы механического повреждения, споты неправильной формы (не круглые, с неравномерным распределением сигнала внутри спота, наличие смазанных спотов и т.д.) и т.п. Если проявленный слайд

окажется плохого качества – он либо исключается из рассмотрения, либо анализ проводится повторно. Плохое качество проявленных слайдов может обуславливаться загрязнением образцов сыворотки, ошибками при проведении анализа, а также скрытыми дефектами при печати.

Межслайдовый контроль качества результатов гликочипа

До того, как ставить серию анализов, каждая подготовленная партия гликочипов проходит межслайдовый контроль качества, который необходим для отбора партий слайдов, для которых количественные результаты анализа одного и того же образца на гликочипах полностью воспроизводимы от слайда к слайду и от партии к партии. Благодаря такому контролю результаты гликочипа от разных образцов можно будет корректно сравнивать между собой.

После проведения анализа на нескольких, случайным образом выбранных слайдах из нескольких партий гликочипов, сканирования и обработки изображений составляются таблицы со значениями медиан \tilde{x}_{ij} . По полученным данным высчитываются коэффициенты межслайдовой корреляции для каждой пары слайдов. В данной работе в качестве оптимального, согласно рекомендациям авторов [Vuskovic и др., 2011], было решено использовать согласованный коэффициент корреляции по Лину [Lin, 1989] (ССС), рассчитываемый для двух тестируемых слайдов по формуле:

$$CCC = \frac{\rho}{1 + \frac{(s_1^2 - s_2^2) + (m_1 - m_2)^2}{2s_1s_2}}, \quad (2)$$

где:

$$\rho = \frac{s_{12}}{s_1s_2},$$

$$m_k = \underset{k}{mean}(\tilde{x}_{kj}),$$

$$s_k^2 = \text{var}(\tilde{x}_{kj}),$$

$$s_{12} = \underset{j}{cov}(\tilde{x}_{1j}, \tilde{x}_{2j}),$$

ρ – коэффициент корреляции по Пирсону; m_k, s_k и s_{12} – среднее арифметическое, дисперсия и ковариация значений сигналов всех гликанов двух сравниваемых слайдов соответственно

Внутрислайдовый контроль воспроизводимости подразумевает проверку того, насколько одинаковы сигналы между повторами гликана на одном гликочипе. В качестве количественной оценки используется расширенный вариант ССС, позволяющий учесть более чем две сравниваемые выборки, так называемый суммарный согласованный коэффициент корреляции (ОССС):

$$OCCC = \frac{2 \sum_{r=1}^{R-1} \sum_{k=r+1}^R s_{rk}}{(R-1) \sum_r \sigma_r^2 + \sum_{r=1}^{R-1} \sum_{k=r+1}^R (\mu_r - \mu_k)^2}, \quad (3)$$

где μ_r, σ_r и s_{rk} – среднее арифметическое, стандартное отклонение и коварианта среди гликанов, рассчитанные для различных значений сигналов от повторов гликана на одном слайде.

Межслайдовый контроль подразумевает оценку результатов проявки стандартными образцами слайдов из различных партий.

Для оценки качества печати гликочипов, использованных в работе по изучению репертуара антител в сыворотках крови здоровых доноров, а также

пациенток с диагностированными акушерскими патологиями, использовали три варианта контроля.

На начальном этапе работы (после печати двух партий гликочипов) были использованы следующие контрольные образцы:

А. Смесь растительных лектинов (21 шт., коммерческие) в концентрации 10 мкг/мл каждого лектина.

Результаты внутрислайдовой корреляции (С1):

№слайда	печать	проявлено	С1
РА00022	20.07.2016	смесь коммерческих лектинов в конц. 10мкг/мл	0,946
РА00028	25.07.2016		0,972
РА00029			0,970

Результаты межслайдовой корреляции (С2):

№слайда	РА00022	РА00028	РА00029
РА00022		0,990	0,992
РА00028			0,996
РА00029			

Б.1. Образец сыворотки крови, имеющейся в лаборатории в достаточном объеме и хранящейся в стандартных условиях в виде аликвот. Проявка гликочипа осуществлялась с использованием тех же реагентов при соблюдении всех условий предстоящей работы с образцами сывороток крови доноров, участвующих в исследовании.

Результаты внутрислайдовой корреляции (С1):

№ слайда	печать	проявлено	С1 (IgG)	С1(IgM)
РА00014	20.07.2016	Сыворотка крови здорового донора	0,960	0,996
РА00049	25.07.2016		0,919	0,981
РА00050			0,964	0,920

Результаты межслайдовой корреляции (С2):

С2 (IgG)	РА00014	РА00049	РА00050
РА00014		0,992	0,986
РА00049			0,991
РА00050			

С2 (IgM)	РА00014	РА00049	РА00050
РА00014		0,962	0,970
РА00049			0,979
РА00050			

Б.2. Образец сыворотки крови, имеющейся в лаборатории в достаточном объеме и хранящейся в стандартных условиях в виде аликвот. Проявка гликоципа осуществлялась с использованием других реагентов (вторичных антител).

№ слайда	печать	проявлено	С1
РА00024	20.07.2016	Сыворотка крови здорового донора	0,980
РА00030	25.07.2016		0,930
РА00031			0,932

Результаты межслайдовой корреляции (С2):

С2 (IgG)	РА00024	РА00030	РА00031
РА00024		0,955	0,963
РА00030			0,986
РА00031			

В. Образец сыворотки крови донора, участвующего в исследовании.

Результаты внутрислайдовой корреляции (С1):

№ слайда	печать	проявлено	C1 (IgG)	C1(IgM)
РА00023	20.07.2016	Сыворотка крови здорового донора	0,950	0,914
РА00026	25.07.2016		0,977	0,944
РА00027			0,982	0,919

Результаты межслайдовой корреляции (С2):

C2 (IgG)	РА00023	РА00026	РА00027
РА00023		0,929	0,912
РА00026			0,977
РА00027			

C2 (IgM)	РА00023	РА00026	РА00027
РА00023		0,910	0,922
РА00026			0,940
РА00027			

По результатам предварительных экспериментов по оценке качества производимых гликочипов было принято решение в дальнейшем, при производстве каждой новой партии гликочипов, использовать вариант Б.1, как наиболее близкий к условиям предстоящей работы.

Всего для работы с образцами сывороток крови доноров было произведено 23 партии гликочипов, из которых гликочипы из двадцати двух партий были использованы в работе; одна партия была исключена как непрошедшая контроль качества.

2.2.2 Анализ сывороток крови с использованием гликочипа

Подготовка образцов сыворотки и препаратов внутривенного иммуноглобулина

Сыворотку крови человека и животных размораживали при комнатной температуре, разводили в объемном соотношении фосфатным буфером, содержащем 1% БСА, 0.01% NaN₃, 1% Tween 20. Разведенную сыворотку термостатировали при 37°C в течение 5 минут, затем центрифугировали в течение 3 минут при 12 000 об/мин.

1 стадия анализа – связывание антител из анализируемого образца с лигандами на поверхности гликочипа

Гликочип помещали во влажную затемненную непрозрачную камеру и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре в фосфатном буфере, содержащем 0,1% Tween 20, а затем промывали двукратно буфером того же состава. Затем на поверхность гликочипа наносили разведенную сыворотку крови или раствор препарата иммуноглобулина человека в объеме от 350 до 900 мкл в зависимости от размеров области печати на гликочипе. гликочип с нанесенной сывороткой или ИВИГ инкубировали 90 минут при 37°C, относительной влажности около 80% и непрерывном перемешивании 32-34 об/мин. В случае разведения сыворотки 1:100 гликочип инкубировали в течение ночи (16 часов).

2 стадия анализа – связывание вторичных антител с антителами анализируемого образца

По истечении 90 минут 1 стадии гликочипы были двукратно промыты фосфатным буфером, содержащим 0,1 % Tween-20. Затем наносилась смесь вторичных антител. Разведение вторичных антител:

- для меченных напрямую вторичных антител (goat-anti-humanIgG-Alexa 555 и goat-anti-human IgM-Alexa 647) использовалась концентрация 8 мкг/мл;

- для биотинилированных вторичных антител, направленных против человеческих иммуноглобулинов, использовалась концентрация 12 мкг/мл;
- для биотинилированных вторичных антител, направленных против иммуноглобулинов мыши, использовалась концентрация 10 мкг/мл.

Все вторичные антитела разводились фосфатным буфером, содержащим 1% БСА, 0.01% NaN₃, 0.1% Tween.

Длительность инкубации гликочипов с раствором вторичных антител составляла 60 минут при 37°C, относительной влажности около 80% и непрерывном перемешивании 32 – 34 об/мин.

По окончании стадии 2 в случае использования напрямую меченных вторичных антител гликочипы промывались двукратно фосфатным буфером, содержащим 0,1% Tween-20, а затем дистиллированной водой, и высушивались воздухом при комнатной температуре.

3 стадия анализа – детектирование вторичных биотинилированных антител

В случае использования биотинилированных вторичных антител по окончании 2 стадии гликочипы двукратно промывали буфером, содержащим 0,1 % Tween-20, а затем наносили раствор флуоресцентно-меченного стрептавидина-Alexa 555 с концентрацией 2 мкг/мл. По окончании стадии 3 гликочипы промывались двукратно фосфатным буфером, содержащим 0,1% Tween-20, а затем дистиллированной водой, и высушивались воздухом при комнатной температуре.

2.2.3 Получение и анализ флуоресцентных изображений гликочипов

Интенсивность флуоресценции, выраженную в относительных единицах (RFU – relative fluorescence units) измеряли с помощью конфокальных флуоресцентных сканеров. В работе были использованы

ProScanArray Gx, Innoscan 1100 AL и MArS. Сканирование изображений производилось с разрешением 5 – 10 мкм. Подбор параметров сканирования производился эмпирическим путем для гликочипов, использованных в определенном эксперименте, с учетом основного требования – более 95% сигналов должны попадать в область шкалы измерения прибора, т.е. не превышать значения RFU 65535.

Анализ изображений гликочипов и статистическая обработка данных

Полученные изображения обрабатывали с помощью ScanArrayExpress 4.0, используя метод фиксированных колец диаметром 70 – 80 мкм, а также Microsoft Excel. Значимыми считались сигналы, интенсивность флуоресценции которых превышала фоновое значение более чем в 5 раз. В качестве фона рассматривались точки, либо не содержащие гликанов, либо те, в которые была нанесена неспейсерированная трегалоза.

Первичные данные, полученные после преобразования изображений в числовые значения, нуждаются в предварительной математической обработке или преобразовании, поскольку содержат много лишней и ненужной информации. Источником ненадежной информации может быть несовершенство количественных характеристик гликочипа, трудно отслеживаемые различия условий проведения анализов образцов или сканирования сигналов с готовых слайдов. Гликаны с бессмысленными значениями сигналов (или «шумящие» гликаны) должны быть отбракованы, тогда значения сигналов оставшихся гликанов можно будет использовать для приведения общей интенсивности всех слайдов к сравнимым значениям (с помощью процедуры нормализации), а также для отсека заведомо выпадающих значений сигналов в пределах всей изучаемой выборки и приближение их распределения к нормальному (с помощью процедуры нормализующего преобразования (NT)). Основной целью этих процедур является представление данных в таком виде, чтобы они могли быть использованы наиболее эффективно. Основные манипуляции с «сырыми»

данными проводились на данной выборке в соответствии с рекомендациями авторов [Vuskovici др., 2011].

Для первичной обработки данных переведенные в числовые значения флуоресцентные сигналы формируют общую таблицу (матрицу), содержащую интенсивности флуоресценции (сигналы) \tilde{x}_{ij} каждого из репликатов $r = 1, 2, \dots, R$ ($R = 4$) гликана $j = 1, 2, \dots, d$ ($d = 200$) каждого из пациентов $i = 1, 2, \dots, n$ ($n = 80$). Значения сигналов берутся непосредственно из соответствующих «сырых» файлов, а знак тильды (\sim) обозначает принадлежность этой величины к матрице «сырых» данных, а не обработанных, как это будет приведено ниже. Далее высчитываются медианы сигналов \tilde{x}_{ij} для каждого гликана j каждого из пациентов i :

$$\tilde{x}_{ij} = \text{median}(\tilde{x}_{ij}^{(r)}) \quad (1)$$

и формируется сводная таблица, содержащая значения медиан \tilde{x}_{ij}

На следующей стадии обработки оба варианта таблицы – с общими данными и с медианами – служат отправными точками для оценки качества полученных результатов, поиска шумящих гликанов и формирования таблиц с нормализованными и преобразованными сигналами.

Выявление «шумящих» гликанов

Данная стадия необходима для подготовки «сырых» данных для нормализации и нормализующего преобразования. Выявление «шумящих» гликанов (т.е. гликанов, сигналы от которых имеют бессмысленные значения) включает в себя три различных этапа отбора. Первый этап основан на алгоритме сравнения медианы по повторам одного гликана на чипе с её отклонением, при условии, что отклонение медианы не может быть выше, чем сама медиана. На втором этапе отбраковываются гликаны с высоким коэффициентом вариации. Третий этап отсеивает гликаны с низкой внутри-групповой корреляцией.

В качестве программного обеспечения для проведения всех манипуляций с данными, анализа и графических построений было

использовано программное обеспечение для статистической обработки данных – R (разработчик – The R Foundation for Statistical Computing). Данная программа распространяется свободно и доступна под лицензией GNU GPL.

Первый этап

Для поиска «шумящих» гликанов используется алгоритм, в котором происходит отсев гликанов, медиана интенсивностей флуоресценции которых практически у всех пациентов ниже, чем уровень шума для всех гликанов. То есть: гликан j бракуется, если у 108 пациентов (из 110) медианы между повторами этого гликана меньше, чем 95 перцентиль абсолютного отклонения $s_{0.05}$ этих медиан (MAD); или: забраковать гликан j , для которого:

$$\sum_{i=1}^n I(\tilde{x}_{ij} \leq s_{\alpha}) \geq n - k \quad (4)$$

где, \tilde{x}_{ij} – медиана интенсивностей флуоресценции для пациента i и гликана j , n – объём выборки (общее количество пациентов), k – параметр жёсткости отбора.

Параметры k и α приняты равными 2 и 0.05 согласно рекомендациям, данным в работе [Vuskovic и др., 2011].

Второй этап

«Шумящими» признаются гликаны с высоким коэффициентом вариации, который вычисляется как отношение MAD к медиане для гликанов, успешно прошедших первый этап:

$$CV_{ij} = \begin{cases} 0 & \text{if } MAD_r(\tilde{x}_{ij}^{(r)}) = 0 \\ 1 & \text{if } \tilde{x}_{ij} < MAD_r(\tilde{x}_{ij}^{(r)}) \\ MAD_r(\tilde{x}_{ij}^{(r)}) / \tilde{x}_{ij} & \text{if } \tilde{x}_{ij} > MAD_r(\tilde{x}_{ij}^{(r)}) \end{cases}, \quad (5)$$

где CV_{ij} – это коэффициент вариации, а $MAD(\tilde{x}_{ij}^{(r)}) = median | \tilde{x}_{ij}^{(r)} - median(\tilde{x}_{ij}^{(r)}) |$ – это абсолютное отклонение медианы всех повторов r для образца i и гликана j .

Третий этап

Производится выбраковка «шумящих» гликанов, для которых по коэффициенту внутри-групповой корреляции снижен ($ICC < 0.9$), т.е. учитывается только вариация повторов сигналов у каждого из пациентов. ICC представляет собой отношение дисперсии медиан сигналов отдельного гликана (у всех пациентов) к сумме этой дисперсии с суммой всех дисперсий между повторами, деленной на количество повторов:

$$ICC = \frac{\text{var}_i(\tilde{x}_{ij})}{\text{var}_i(\tilde{x}_{ij}) + \frac{\sum_{i=1}^n \sigma_{ij}^2}{nR}} \quad (7)$$

где σ_{ij} – стандартное отклонение повторов ($nR = 8$) для гликана j и пациента i .

Выявление сильно коррелирующих гликанов

В дополнение к вышеперечисленным критериям качества результатов следует отнести выявление гликанов, имеющих слишком высокую корреляцию сигналов между рассматриваемыми группами здоровых доноров и пациентов с диагностированными патологиями. Для этого применяли расчет коэффициента кросс-корреляции по Пирсону с использованием программного обеспечения R. Гликаны, имеющие попарный коэффициент корреляции больше, чем 0.95 отсеивались. На практике, к таким парам относятся гликаны, отличающиеся одной CH_2 группой в составе спейсера.

Нормализация данных

После проведения отбора «шумящих» гликанов, оставшиеся гликаны с надежными сигналами, используются для проведения нормализации данных. Процедура нормализации проводится в целях уменьшения междислайдовой систематической ошибки, поскольку она помогает исправлять возможную разницу в общей интенсивности сигналов между слайдами, исходя из

предположения, что значения сигналов большинства гликанов не различается во всех изучаемых группах (т.е. являются инвариантными).

На этой стадии используется общая внутри-слайдовая линейная нормализация, позволяющая убрать линейное межслайдовое смещение с незначительными потерями данных:

$$x_{ij} = \frac{\tilde{x}_{ij} - l_i}{s_i} \quad (8)$$

где \tilde{x}_{ij} и x_{ij} -- необработанные и нормализованные значения интенсивностей сигнала для пациента i и гликана j , а l_i и s_i – параметры положения и масштабирования.

Параметры l_i и s_i определяются для каждого пациента (слайда) независимо:

$$l_i = \text{median}_{j \in J}(\tilde{x}_{ij}) \quad (9)$$

$$s_i = \text{MAD}_{j \in J}(\tilde{x}_{ij}) \quad (10)$$

где J – набор индексов колонок, которые соответствуют гликанам, признанным «не шумящими», а также контрольным соединениям.

Следует иметь в виду, что в процессе нормализации могут появляться сигналы, имеющие отрицательные величины. Это, согласно равенству (8), указывает на то, что сигнал к данному гликану оказался ниже медианы сигналов всех гликанов на слайде.

После проведения нормализации данные готовы к нормализующему преобразованию.

Нормализующее преобразование

Следующая стадия переработки «сырых» данных гликочипа – это нормализующее преобразование, в результате которого получается переменная, чье распределение более похоже на нормальное (симметричное), чем исходное. Данная процедура необходима для улучшения интерпретируемости данных.

Для имеющейся выборки было решено использовать преобразование Бокса-Кокса [Box, Cox, 1964], которое можно использовать при неизвестном типе распределения, что делает его практически универсальным. Поскольку изначально преобразование Бокса-Кокса было ориентировано только на положительные величины, проблему учета отрицательных значений данных снимают согласно рекомендациям авторов [John, Draper, 1980], чтобы появилась возможность использования нормализованных данных:

$$f(x, \lambda) = \begin{cases} \frac{\text{sign}(x)(|x|+1)^\lambda - 1}{\lambda}, \lambda \neq 0 \\ \text{sign}(x) \log(|x|+1), \lambda = 0 \end{cases} \quad (11)$$

где λ – степень параметра преобразования.

Для упрощения процедуры преобразования степень параметра преобразования выбрана одинаковой для всех гликанов и равной $\lambda = 0.2$, что соответствует ее оптимальному значению, подобранному эмпирическим путем в работе [Vuskovich и др., 2011].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Формирование репертуара антител у мышей-гнотобиотов

Примером современного взгляда на роль флоры кишечника служит представление о ее главенствующей роли среди прочих экзогенных факторов для созревания иммунной системы в постнатальном периоде. Микрофлора ЖКТ формирует местный иммунитет и играет огромную роль в становлении и развитии иммунной системы ребенка, поддержании ее функциональной активности. Колонизация кишечника, которая начинается с первых минут жизни, является иммунным процессом. Резидентная флора обладает высокими иммуногенными свойствами, которые реализуются в стимулировании развития лимфоидного аппарата кишечника и местного иммунитета, а также приводит к системному повышению тонуса иммунной системы с активацией клеточного и гуморального звеньев. Значительная часть открытий, проливающие свет на различные аспекты взаимодействия организма-хозяина и микробов, была сделана благодаря возможности проводить исследования на животных-гнотобиотах.

В нашей работе были проанализированы сыворотки крови мышей, полученных и выращенных в стерильных условиях. По достижении определенного возраста мыши были разделены на группы и были подвергнуты определенному роду воздействия – контакту с одиночными или группой микроорганизмов, переводу на нестерильную пищу, однократному гаважу переваренной пищей нестерильных мышей. Две группы животных были использованы как контрольные: для одной группы условия стерильности были сохранены, другая группа содержалась в стандартных лабораторных без соблюдения специальных мер по поддержанию стерильности. Еще одна группа – инбредных BALB/c мышей, выращенных в SPF-условиях – была

взята для того, чтобы, проанализировав репертуар АГАТ, оценить, насколько он индивидуален в группе генетически близкородственных особей.

Мыши, контактировавшие с бактериями одного или нескольких видов.

Четыре группы мышей подверглись контакту с одним штаммом бактерий, а именно *E.coli* W3110, *B.longum* NCC2705, *B.thetaiotaomicron* VPI-5482 (ATCC 29148) или *L.reuteri* SD2112 (ATCC 55730); пятую группу подвергли контакту одновременно с четырьмя указанными выше штаммами разных видов бактерий. 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 (Таблица 7).

Таблица 7. Антигликановые антитела (АГАТ), обнаруженные у мышей, контактировавших с одним или четырьмя видами бактерий.

Гликаны	Число мышей (1 – 4), у которых отмечалось достоверное связывание антител с гликаном
Мыши, контактировавшие с <i>E.coli</i>W3110	
Gal α 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β	1
Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β	1
ПС из <i>P.mirabilis</i> O31: [-3LQuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-6(S-Lac-1-3)GlcNAc α 1] _n ⁷	1
Мыши, контактировавшие с <i>B.longum</i>NCC 2705	
GlcA β 1-6Gal β	1
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α	1
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β	1
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α	1
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)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

⁷Информация о структурах полисахаридов содержится в базе данных Carbohydrate Structure Database (CSDB) <http://csdb.glycoscience.ru/bacterial/>

Таблица 7. Продолжение

Гликаны	Число мышей (1 – 4), у которых отмечалось достоверное связывание антител с гликаном
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(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α	1
(GlcNAc β 1)3-3,4,6-GalNAc α	1
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)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(Fuc α 1-6)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-Lac-1-3)GlcNAc α 1-] _n	3
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

Мыши-гнотобиоты, переведенные на стандартное питание.

В группе мышей, которых перевели на стандартное питание нестерилизованным кормом, также не было отмечено (Таблица 8) значительного расширения репертуара АГАТ.

Таблица 8. АГАТ, обнаруженные у мышей, переведенных на стандартное нестерильное питание.

Гликан	Число мышей (1 – 4), у которых отмечалось достоверное связывание антител с гликаном
3,4-O-Su ₂ -Galβ1-4GlcNAcβ	1
3-O-Su-GalNAcβ1-4GlcNAcβ	1
3,6-O-Su ₂ -GalNAcβ1-4GlcNAcβ	2
ПС из <i>E. coli</i> O58: -[4(R-Lac2-3Rhap2Acα1-3)Manβ1-4Manα1-3GalNAcβ1-] _n -	1
ПС из <i>E. coli</i> O127: -[2Fuc3(65%)Ac4(35%)Acα1-2Galβ1-3GalNAcα1-3GalNAcα1-] _n	1
ПС из <i>P. aeruginosa</i> O4ac: -[2Rhaα1-3FucNAcα1-3FucNAcα1-3D-FucNAcα1-] _n	1

Мыши с однократно произведенным гаважем переваренной пищей нестерильных мышей.

Данная группа принципиально отличалась от описанных выше: антитела этих мышей связывались с 27 олиго- и 27 полисахаридами. В Таблице 9 приведен список гликанов, которые связывали антитела минимум у 2 мышей из 4 в данной группе (полный список приведен в Приложении 2, Таблицы 1 и 2).

Таблица 9. АГАТ, обнаруженные у мышей, которых однократно подвергли гаважу остатками непереваренной пищи нестерильных лабораторных мышей.

Гликан	Число мышей (1-4), у которых отмечалось достоверное связывание антител с гликаном
GlcNAc β 1-4GlcNAc β	3
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α	2
Gal α 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β	2
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α	2
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β	3
(GlcNAc β 1-4) ₆	3
ПС из <i>S.enterica</i> O13: [-2Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-3GlcNAc α 1] _n	2
ПС из <i>S.enterica</i> O67: [-3Gal β 2(30%)Ac β 1-3Gal α 1] _n	3
ПС из <i>S.enterica</i> O41: [-2Man β 1-4Glc α 1-3QuiNAc α 1-3GlcNAc α 1] _n	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	4
ПС из <i>E.coli</i> O127: [-2Fuc3(65%)Ac4(35%)Ac α 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-3GalNAc α 1] _n	4
ПС из <i>E.coli</i> O148: [-3Rha α 1-3Rha α 1-2Glc α 1-3GlcNAc α 1] _n	3
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/	2
ПС из <i>E.coli</i> O19ab: [-2Rha α 1-2Rha α 1-2Rha α 1-2Glc α 1-3GlcNAc6Ac α 1] _n	2
ПС из <i>Ps.aeruginosa</i> O9ab: [-3R-3НОBut1-7Pse4Ac5Ac β 2-4DFucNAc α 1-3QuiNAc β 1-] _n	2
ПС из <i>Sh.dysenteriae</i> type 1: [-3Rha α 1-3Rha α 1-2Gal α 1-3GlcNAc α 1] _n	3
ПС из <i>Sh.flexneri</i> type 6: [-2Rha3(%)Ac4(%)Ac α 1-2Rha α 1-4GalA β 1-3GalNAc β 1] _n	2

Мыши с сохранением условий стерильности.

Данная группа животных была использована в качестве контрольной. Антитела в сыворотка крови практически не детектировались.

Нестерильные лабораторные мыши.

В сыворотках крови животных, выращенных в стандартных лабораторных условиях, содержащихся в общих клетках и признанных здоровыми, были обнаружены антитела, направленные к >100 гликанам из \approx 480. В Таблице 10 приведен список гликанов, которые связывали антитела минимум у 2 мышей из 4 в данной группе (полный список приведен в Приложении 2, Таблица 2).

Таблица 10. АГАТ, обнаруженные в сыворотках крови нестерильных лаб. мышей.

Гликан	Число мышей (1 – 4), у которых отмечалось достоверное связывание антител с гликаном
Fuc α -	2
3-O-Su-GlcNAc β -	4
Gal β 1-4GlcNAc β -	2
GlcNAc β 1-4GlcNAc β -	2
6-Bn-Gal β 1-4GlcNAc β -	4
Gal β 1-4Glc β -sp4-Trp	2
(6-O-Bn-Gal β 1)-3(6-O-Bn)GlcNAc β -	3
3-O-Su-Gal β 1-3GlcNAc β -	2
Neu5Ac α 2-3Gal β -	2
3-O-Su-Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -	2
Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α -	4
Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -	2
GlcNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -	2
GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -	3
GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -	3
GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -	2
Gal β 1-4(Fuc β 1-3)GlcNAc β -	2
Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -	3
4-O-Su-Neu5Ac α 2-3(6-O-Su)Gal β 1-4GlcNAc β -	2
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Trp	2
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α -	3
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β -	2
Gal α 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -	2
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -	2
Gal β 1-3GlcNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -	3
Gal β 1-3GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -	3
Gal β 1-4GlcNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -	4
Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -	3
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α -	4
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β -	4
Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -	3
ПС из <i>S. enterica</i> O13: [-2Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-3GlcNAc α 1-] _n	4
ПС из <i>S. enterica</i> O38: [-3(Gal β 1-4)Gal β 1-4(GlcNAc β 1-2)Glc β 1-3GalNAc β 1-] _n	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	4
ПС из <i>E. coli</i> O127: [-2Fuc3(65%)Ac4(35%)Ac α 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-3GalNAc α 1-] _n	4
ПС из <i>E. coli</i> O148: [-3Rha α 1-3Rha α 1-2Glc α 1-3GlcNAc α 1-] _n	2
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/	3
ПС из <i>Prot. mirabilis</i> O31: [-3LQuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-6(S-Lac-1-3)GlcNAc α 1-] _n	2
ПС из <i>Sh. boidii</i> type14: [-6Gal α 1-4GlcA β 1-6Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1-] _n	2
ПС из <i>Sh. boidii</i> type17: [-6(R-Lac2-4)Glc β 1-4GalNAc α 1-3GalNAc β 1-] _n	2
ПС из <i>Sh. dysenteriae</i> : [-3Rha α 1-3Rha α 1-2Gal α 1-3GlcNAc α 1-] _n	3

Таким образом, по разнообразию АГАТ, мыши с однократно произведенным гаважем оказались сопоставимыми с данной группой. Более четверти этих гликанов являются общими у двух групп (Таблица 11).

Таблица 11. Гликаны, связывающие антитела в сыворотках крови мышей двух групп: после однократно произведенного гаважа переваренным материалом, взятым от нестерильных лабораторных особей, а также мышей, выращенных в стандартных лабораторных условиях без поддержания специальных условий стерильности.

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(Fuc α 1-3)GlcNAc β
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α (blood group B)
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α (blood group A)
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β (blood group A)
ПС 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: [-3Fuc α 1-3Xluf 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: [-3Rha α 1-3Rha α 1-2Glc α 1-3GlcNAc α 1-] _n
ПС из <i>P. mirabilis</i> O13: [-4(Lys2-6)GalA 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: [-2Fuc α 1-2Gal 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

Инбредные мыши BALB/C, выращенные в SPF условиях.

Исследование АГАТ в данной группе животных позволило определить, что генетически близкие особи, содержащиеся в одинаковых условиях, обладают различными репертуарами антител (Рисунок 7).

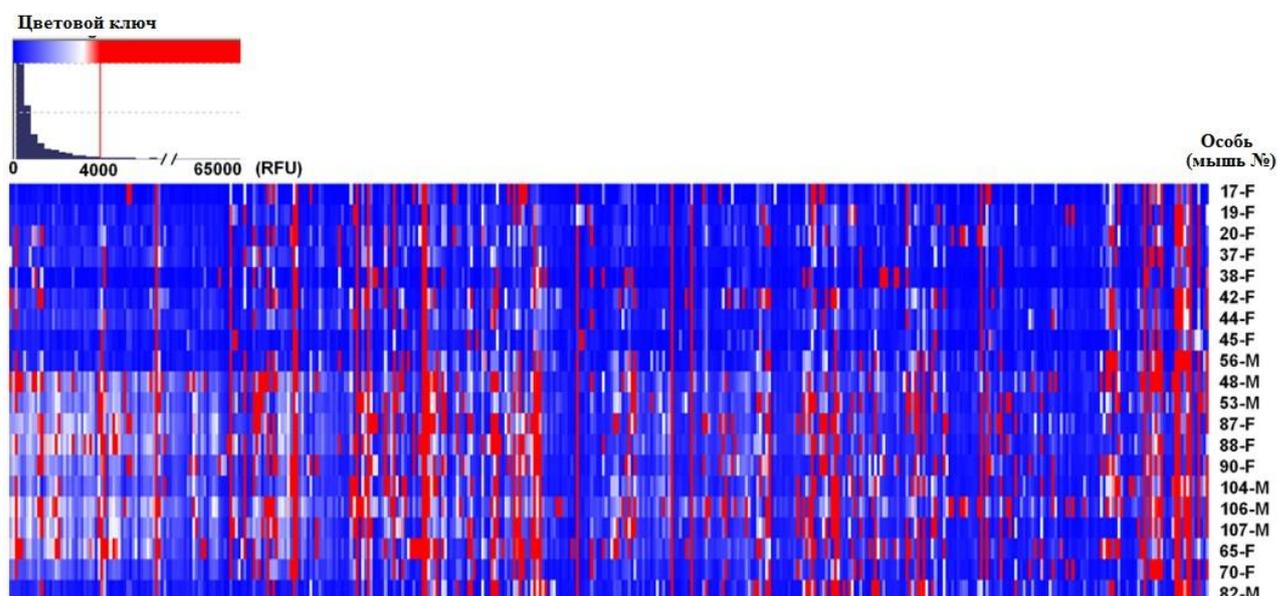


Рисунок 7. Тепловая карта, представляющая репертуары АГАТ в сыворотках крови BALB/C мышей, выращенных в SPF условиях. Значимые сигналы (значения, выше 4000 RFU) отмечены красным цветом.

Из 419 гликанов гликоципа иммуноглобулины мышей данной группы связывались с 71 гликаном, из которых только 7 были общими для всех 20 особей (Таблица 12).

Таблица 12. Гликаны, с которыми обнаруживается связывание антител в сыворотках крови 20 SPF-мышей.

6-O-Su-Gal β
Gal β 1-6Gal β 1-4Glc β
Gal β 1-3GalNAc(fur) β
3-O-Su-Gal β 1-4(6-O-Su)Glc β
3-O-Su-Gal β 1-3GalNAc α
3-O-Su-Gal β 1-3GlcNAc β
3-O-Su-Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β

Заключение и выводы

Гнотобиоты являются уникальными объектами и моделями медико-биологического эксперимента. Именно благодаря работам с использованием животных-гнотобиотов удалось исследовать популяции В-клеток, производящие иммуноглобулины в ответ на стимуляцию антигенами, которые выбирает исследователь. В настоящее время изучение реакции иммунной системы на ограниченное количество антигенов продолжается, предоставляя ценную информацию о роли внешних стимулов в развитии иммунитета. Контролируемый контакт с окружающей средой, например, добавление в пищу или воду выбранного исследователем микроорганизма, или соединения, позволяют наблюдать реакцию иммунитета, изучать механизмы инфицирования или стимулирующего действия выбранного агента.

Следует учитывать, что экстраполировать напрямую данные, полученные на экспериментальных животных, на человеческий организм нельзя ввиду очевидных физиологических отличий. Кроме того, существенны и индивидуальные особенности иммунного ответа: даже у инбредных, т.е. генетически близких, особей подопытных животных, содержащихся в одинаковых условиях, репертуары АГАТ различны.

Тем не менее, эксперименты, в ходе которых стерильные животные подвергаются воздействию какого-либо фактора (микроб, пища, физическое или химическое воздействие и др.) под контролем исследователя, могут предоставить ценные данные, касающиеся иммунной системы млекопитающих, в том числе и человека.

Результаты нашего исследования репертуара АГАТ показали, что у нестерильных лабораторных мышей количество лигандов, которые связывают антитела крови, достигает 100 из более чем шести сотен, представленных на чипе. В группах, где контакт животных ограничивался единственным штаммом микроорганизма, количество гликанов, с которыми связывались

иммуноглобулины из сывороток крови, не превышало десяти. Сочетание четырех бактерий также не приводило к существенному расширению репертуара, как и перевод мышей на нестерильную пищу. Наибольшее разнообразие, сопоставимое с репертуаром антигликановых иммуноглобулинов у обычных лабораторных мышей, наблюдалось только в группе животных, которые однократно были подвергнуты гаважу остатками непереваренной пищи нестерильных мышей.

Обращает внимание несовпадение химической структуры антигенов-стимулов (бактериальных полисахаридов) с одной стороны, и позитивно реагирующих антигенов гликоципа – с другой. Действительно, 1) бактерии, использованные для стимуляции, (*Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bacteroides thetaiotaomicron* и *Escherichia coli* – типичные из представителей нормальной микрофлоры), безусловно, не содержат позитивно реагировавших иммобилизованных нагликочипеуглеводных цепей, характерных для гликопротеинов и гликолипидов млекопитающих, таких как антигены групп крови АВН или сульфаты LacdINAc; 2) полисахариды эррея, с которыми связывается сыворотка крови мышей, также почти не совпадают с теми, которые входят в состав О-антигенов и LPS бактерий-стимуляторов; 3) общее число антигенных детерминант пептидной природы (в составе мембранных, внутренних, и «переваренных» бактериальных белков) по-видимому значительно выше, чем полисахаридных, то есть, скорее всего, формирование полноценного репертуара АГАТ проходит при активном участии неуглеводных антигенов-стимулов. Таким образом, мы можем предположить, что имеет место пептид-гликановая мимикрия. Это явление описано для адаптивного иммунного ответа с участием В2-лимфоцитов [Carlin и др., 2009; Agadjanyan и др., 1997]. Для В1-клеток, производящих менее аффинные и специфичные ЕАТ, явление антигенной мимикрии должно «разрешаться» легче и значит чаще, и поэтому мимикрия предполагается скорее как типичный, чем исключительный природный механизм производства

иммунной системой нужных ей иммуноглобулинов. Оценочное количество числа антигликановых ЕАТ у человека приближается к 10^3 ; известная из литературы оценка числа белков, к которым найдены ЕАТ, дает тот же порядок величины, т.е. не так много [Chen, Naab, 2009; Bovin, 2013]. С другой стороны, количество мажорных бактерий микробиоты человека – около 500 видов [Thursby, Juge, 2017; Lloyd-Price, Abu-Ali, Huttenhower, 2016; Fouhy и др., 2012; Fujimura и др., 2010; Tuddenham, Sears, 2015; Rodriguez и др., 2015] – предполагает в десятки и сотни раз большее число потенциальных антигенных классических детерминант. Кроме того, нужно учитывать антигенные детерминанты МАР-типа (microbe associated molecular patterns), полисахаридной и смешанной природы, число которых может быть еще больше. Получается, что число антигенных детерминант, с которыми рутинно контактирует иммунная система, на несколько порядков выше числа В1-лимфоцитов, подлежащих стимулированию. То есть, микробиота является неисчерпаемым резервуаром для стимуляции В-клеток. Суммируя, мы можем сделать следующие выводы:

- ограниченный контакт мишей-гнотобиотов не достигает достаточного эффекта в стимуляции иммунной системы для продукции широкого репертуара антигликановых антител. Об этом свидетельствует ограниченное количество лигандов, с которыми связываются антитела из сывороток крови мышей, контактировавших как с одним, так и с несколькими микроорганизмами;
- нестерильная пища, содержащая также лишь незначительное количество и разнообразие микроорганизмов, также не является достаточным стимулирующим фактором;
- реакция иммунной системы мышей-гнотобиотов в ответ на контакт с отдельно взятыми видами бактерий носит неспецифичный характер, т.к. тот ограниченный набор антител,

который мы наблюдали, у групп, контактировавших с различными индивидуальными бактериями, был не одинаков.

- наибольшее разнообразие лигандов, связывающих антигликановые антитела, мы наблюдали у мышей, однократно подвергнутых гаважу остатками непереваренной пищи нестерильных мышей. Такой эффект может объясняться тем, что в субстанции, использованной для гаважу, антигены (фрагменты микроорганизмов и компоненты пищи) могут находиться в более доступной для восприятия иммунной системой форме, а также и в значительно большем разнообразии, чем во всех остальных случаях в рамках данного исследования.
- корреляций между иммуноглобулинами к олиго- и полисахаридным структурам: явно она не прослеживается, что, впрочем, можно объяснить тем, что полисахариды именно тех бактерий, которыми были колонизированы мыши, нет на гликоципе. Однако, следует отметить, что в большинстве случаев у мышей почти всех групп имеются антитела к полисахаридам с терминальными фукозой и рамнозой; к олигосахаридам того же строения антител мы не обнаружили. В то же время у обычных нестерильных мышей различных линий антитела к рамнозе и фукозе встречаются наиболее часто и с высокими сигналами.

3.2 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.

3.2.1 АГАТ детей в возрасте 3 дней и их матерей.

Известно, что IgG, которые обнаруживаются в крови новорожденных, имеют материнское происхождение. Их передача от матери происходит еще на внутриутробной стадии развития плода. После рождения незначительные количества IgG могут поступать с молоком при грудном вскармливании. IgM внутриутробно в норме не передаются и после рождения в грудном молоке практически отсутствуют; обнаружение значительных количеств антител этого класса в крови новорожденного свидетельствует о наличии у него инфекции [White и др., 2014; Narula и др., 2017; Nagendran, Emmanuel, Bansal, 2015; Ravivarma и др., 1979; Voersma, 1981; Palmeira и др., 2012]. Имеющиеся в настоящее время данные о специфичности антител у новорожденных ограничены; часто исследования проводятся с целью изучения какой-либо патологии и касаются иммуноглобулинов, направленных к антигенам пептидной природы. В то же время, микроорганизмы, активно колонизирующие полости тела новорожденного, являются неисчерпаемым резервуаром углеводных антигенов, и с уверенностью можно утверждать, что иммунная система на них реагирует [Yatsunenکو и др., 2012; Lagier и др., 2012].

В нашей работе были проанализированы репертуары АГАТ IgG и IgM в сыворотках крови новорожденных в возрасте 3 дней и их матерей. Выявлено почти полное отсутствие значимых сигналов связывания IgM с гликанами микрочипа в сыворотках крови новорожденных и в пуповинной крови, что согласуется с литературными данными. При сравнении пар «ребенок и его мать» было показано, что по репертуару IgG они полностью не совпадают. Детский репертуар IgG составляет 16 – 50% от материнского, т.е. минимум половина антител матери ребенку не передается (Таблица 13).

Таблица 13. Количество лигандов, связывающих антитела в сыворотках крови новорожденных детей и их матерей.

Семья	Материнские IgG	IgG ребенка (всего значимых сигналов)	IgG ребенка (среднее и сильное связывание)	Материнские IgM	IgM ребенка
#1	85	33	9	111	0
#2	134	29	10	187	1
#3	114	24	10	129	1
#4	135	35	13	182	0
#5	108	40	20	130	0
#6	109	18	7	141	0
#7 (двойня)	66	18/15	17/14	91	0 / 0

Оценивать качественные различия при небольшом количестве доноров трудно, однако для пяти гликанов (Таблица 14) справедливо то, что при высоком титре у матери, эти антитела не передаются детям. На основе вышесказанного, можно говорить об избирательном характере внутриутробной передачи IgG.

Таблица 14. Гликаны, антитела 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

Репертуар IgG ребенка, уступая по разнообразию материнскому, во многом повторяет его и не содержит уникальных гликанов, с которыми связывались бы только антитела из сыворотки крови детей. На тепловой карте (Рисунок 8) сопоставлены флуоресцентные сигналы «в семьях» по тем лигандам, с которыми мы обнаружили связывание в детской сыворотке. Примечательно, что в случае с некоторыми гликанами сигналы связывания

оказывались даже выше в сыворотке крови новорожденного по сравнению с материнской кровью.

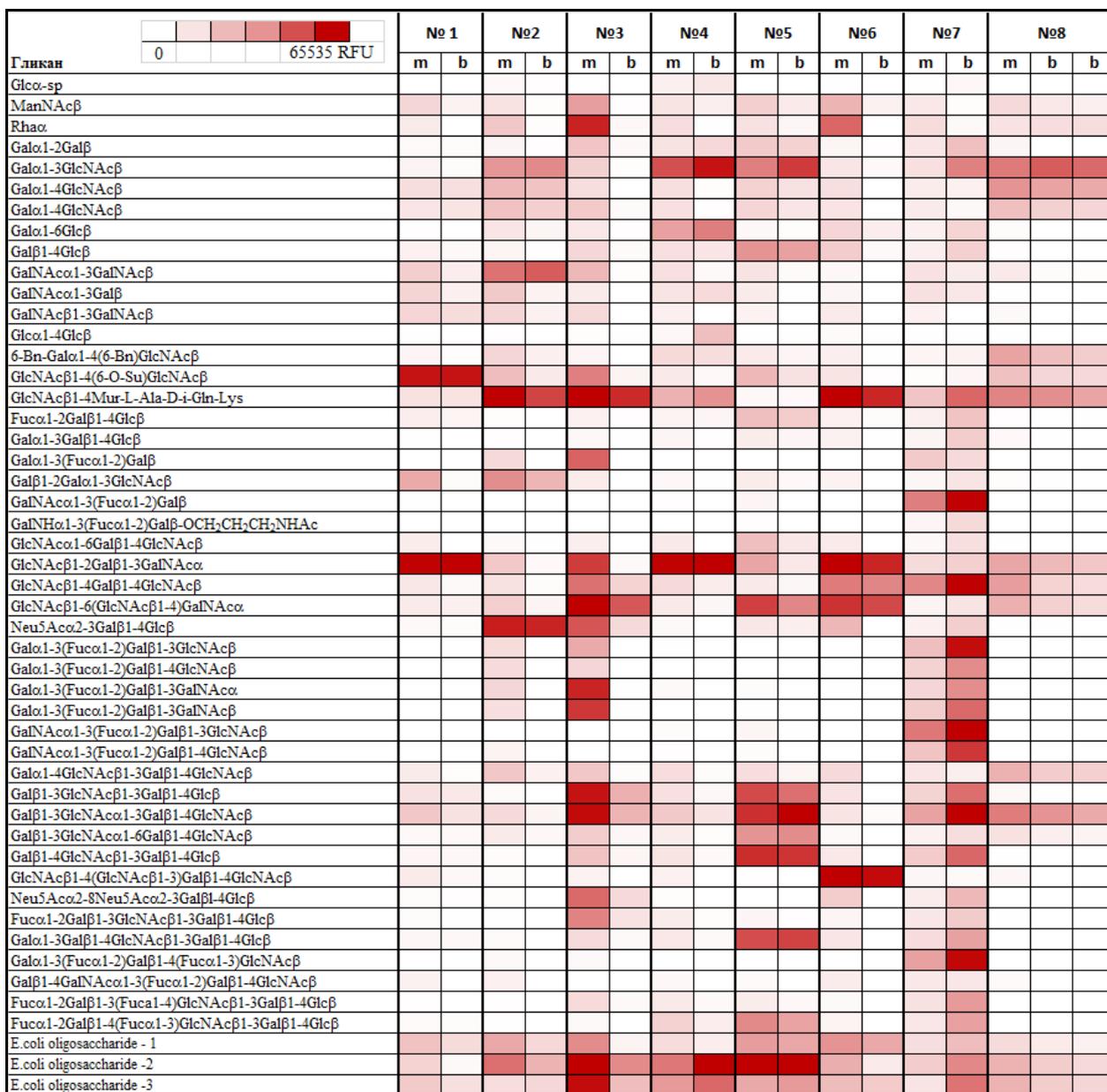


Рисунок 8. Тепловая карта распределения сигналов связывания лигандов и антител из сывороток крови новорожденных и их матерей. Сигнал на тепловой карт возрастает от светлого к темному. Номер в верхней части карты обозначает «семью» – ребенка (b) и его мать (m).

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

В течение первого года жизни иммунная система ребенка активно развивается под влиянием различных факторов, в числе которых первостепенное значение имеют компоненты пищи. Полноценное питание новорожденных подразумевает не только наличие достаточного количества макронутриентов – белков, жиров и углеводов, микроэлементов, но также сочетания витаминов, а также целого ряда молекул, напрямую влияющих на функции иммунной системы ребенка. К таким молекулам относятся, прежде всего, иммуноглобулины [Gross и др., 2000; Hurley, Theil, 2011; Falth-Magnusson, Kjellman, Magnusson, 1988]. Собственная недостаточность антител у новорожденного в виду незрелости его иммунитета восполняется за счет материнского организма при грудном вскармливании [Perre, 2003; Cavinian и др., 2012]. Кроме того, потребляемая пища является также и субстратом для формирования микрофлоры, которая уже с момента рождения ребенка играет важную роль в его дальнейшем развитии и, прежде всего, в обеспечении способности противостоять инфекции патогенными микроорганизмами [McVeagh, Miller, 1997; Sela, 2011; Macrobal, Sonnenburg, 2012; Wang и др., 2015; Gotoh и др., 2018; Ozcan, Sela, 2018; Li и др., 2012; Garrido и др., 2015].

Нетрудно предположить, что искусственные смеси, даже подобранные с учетом индивидуального подхода к ребенку, не могут повторить в своем составе материнское молоко. Следовательно, и влияние компонентов искусственного питания на развитие иммунной системы ребенка может быть иным.

Динамика изменения титров IgG и IgM в течение первого года жизни

Для всех детей, независимо от типа питания, была отмечена тенденция уменьшения разнообразия IgG, направленных как к олиго-, так и к полисахаридам (Рисунок 9).

20 детей в возрасте 3, 6 и 12 месяцев										Их матери (20)	
IgG										IgG	
ОС			ПС					ОС	ПС		
3м	6м	12м	3м	6м	12м						
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		82	
40	16	9	63	23	17			27		44	
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	
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	
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						
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	
13	6	90	2	14	94			115		90	
2	1	31	3	6	26			184		111	
2	3	2	3	5	4			72		56	
6	2	2	2	3	1			134		63	
3	16	199	2	20	41			175		120	
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	
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	197	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	203	26								

Обозначения на рисунке:
ГМ - грудное молоко; СС - стандартная молочная смесь; ГТС - смесь на основе глубоко гидролизованного белка; ЧТС - смесь на основе частично гидролизованного белка; 3м, 6м, 12м - 3, 6 и 12 месяцев соответственно (возраст детей)

Рисунок 9. Динамика антигликановых антител IgG и IgM в сыворотках крови детей 3, 6 и 12 месяцев, получавших различное питание, а также в сыворотках крови их матерей и 10 здоровых неродственных доноров. Цифрами показано абсолютное количество гликанов (олиго- и полисахаридов), которые связывают антитела из сыворотки крови.

АГАТ IgM, направленных к олиго- и полисахаридам, в сыворотке крови детей в возрасте 3 и 6 месяцев практически не обнаруживаются, но в 12 месяцев репертуар антител этого класса становится разнообразным (Рисунок 9).

Разнонаправленные тенденции в динамике IgG и IgM объясняются физиологическими особенностями «поведения» антител этих двух классов. IgG преодолевают фетоплацентарный барьер, а то время как IgM в норме не обладают такой способностью, и полученные нами данные по АГАТ в общем согласуются с литературными, которые касаются антител в целом, безотносительно к их специфичности. В то же время, обнаруживается и противоречие: независимо от типа питания, у всех детей в возрасте 3 месяцев наблюдается широкое разнообразие IgG, которое затем существенно снижается. Если эти антитела были переданы внутриутробно, то их период полу-жизни согласно нашим данным существенно превышает конвенционные 21 – 22 дней.

Репертуар АГАТ IgG

Репертуары иммуноглобулинов класса G в парах ребенок-мать существенно не отличаются: сыворотка крови ребенка не содержит уникальных иммуноглобулинов, которых не было бы у его матери. Как уже было сказано выше, к возрасту 12 месяцев репертуар АГАТ IgG ребенка становится менее разнообразным при сравнении с данными, полученными при анализе сывороток ребенка в возрасте 3 и 6 месяцев. Исчезновение иммуноглобулинов из системного кровотока может объясняться естественными причинами - молекулы либо связываются с мишенью, либо элиминируются в ее отсутствие. Однако в изученных образцах можно выделить группу иммуноглобулинов, которые не только сохраняются в течение всего первого года, но обнаруживаются у всех детей, независимо от типа питания (Таблица 15).

Таблица 15. Гликаны, связывающие антитела, которые обнаруживаются у всех 20 детей в образцах сывороток крови, взятых у них в возрасте 3, 6 и 12 месяцев

ManNAc β -Gly
Gal α 1-3GlcNAc β
GalNAc α 1-3GalNAc β
GlcNAc β 1-4Mur-L-Ala-D-i-Gln-Lys
Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β
<i>P. mirabilis</i> 3B-m: [-2Glc β 1-3L6dTal2(85%)Ac α 1-3GlcNAc β 1-] _n
<i>E. coli</i> O19ab: [-2Rha α 1-2Rha α 1-2Rha α 1-2Glc α 1-3GlcNAc6Ac α 1-] _n
<i>Sh. dysenteriae</i> type 3: [-3(R-Lac2-4Glc β 1-6Glc α 1-4)Gal β 1-6Gal(f) β 1-3GalNAc β 1-] _n
<i>S. enterica</i> O57: [-3(GlcNAc β 1-2)Rha α 1-2Rha α 1-4Glc α 1-3GalNAc β 1-] _n
<i>E. coli</i> O51: [-3(GlcNAc β 1-2)Rha α 1-2Rha α 1-4Glc α 1-3GalNAc β 1-] _n
<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/

Если сравнивать детей и здоровых взрослых доноров, то у последних мы также обнаруживаем антитела, которые связываются с этими гликанами: GMDP-Lys, Gal α 1-3GlcNAc β -, Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -, а также полисахариды *P. mirabilis* 3B-m, *E.coli* O19ab, *Sh. dysenteriae* type 3, *S.enterica* O57 – занимают топовое положение у большинства взрослых людей; два лиганда – ManNAc β - и GalNAc α 1-3GalNAc β - и полисахариды *E.coli* O51 и O14 занимают среднее положение.

Репертуар АГАТ IgM

Различия в репертуарах IgM в группах детей, получавших различное питание, рассмотрены для 12-месячных детей (Рисунок 10), т.к. в 3 и 6 месяцев антитела практически не обнаруживаются.

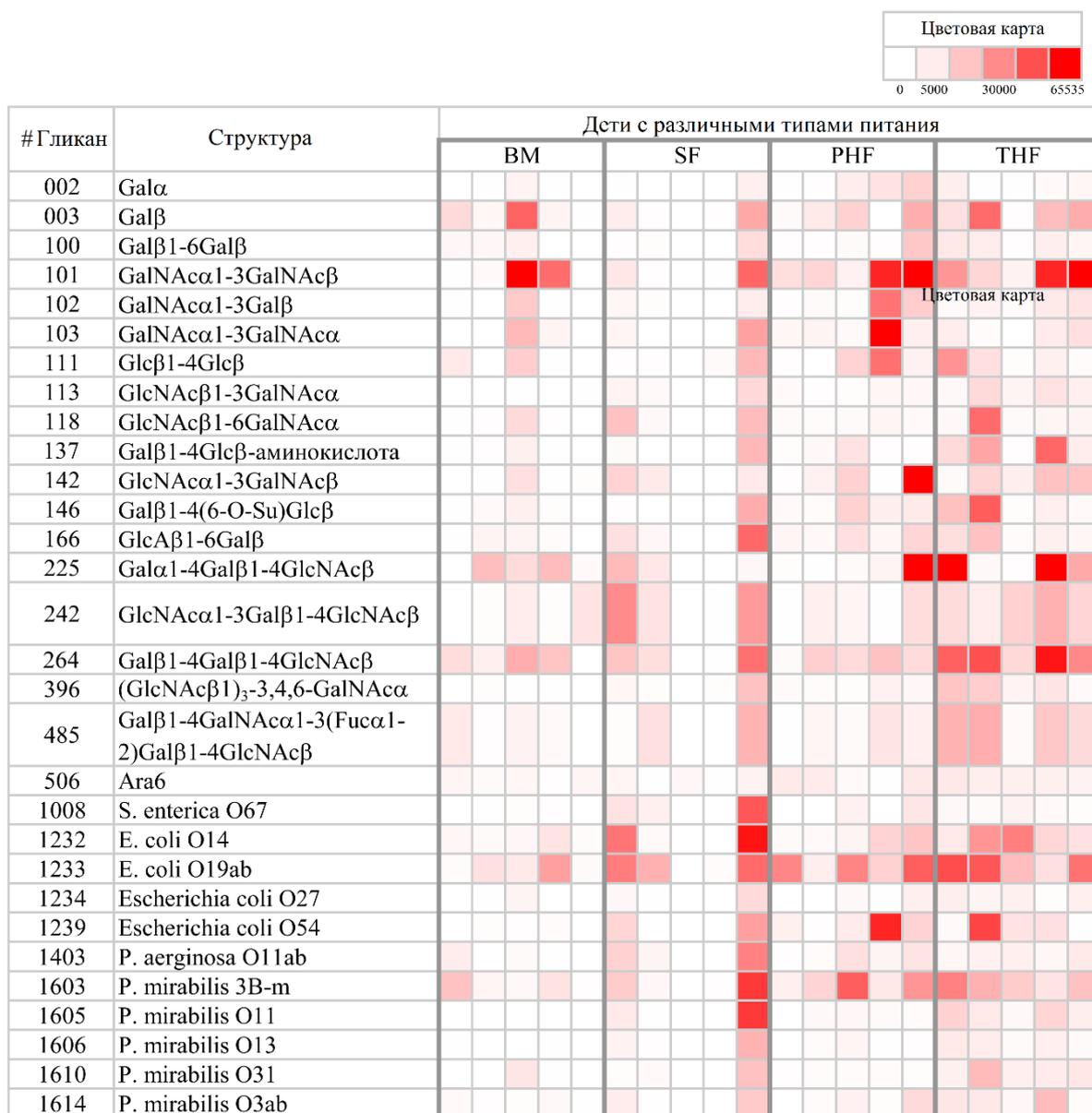


Рисунок 10. Гликаны, с которыми связываются IgM детей в возрасте 12 месяцев, в группах, получавших различные варианты питания.

Максимальное разнообразие АГАТ IgM было выявлено в группе детей, получавших смеси, изготовленные на основе частично гидролизованного белка. Самый узкий репертуар был характерен питавшихся грудным молоком. Две другие группы занимают промежуточное положение. Сходная картина наблюдается и при сравнении детей с взрослыми неродственными донорами (Таблица 16).

Таблица 16. Олигосахариды, связывающие IgM взрослых здоровых доноров с высокой частотой (самое высокое значение сигнала достигает почти 23 000 RFU), 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, которые есть у взрослых и практически отсутствуют у детей.

Структура гликана	Медиана сигналов у здоровых доноров	Грудное молоко	Смесь на основе коровьего молока	Смеси на основе глубоко гидролизованного белка	Смеси на основе частично гидролизованного белка
Rha α	22815	+	++	++	+++
Gal α 1-3GlcNAc β	17247	++	+++	+	++++
GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	16547	++	+++	++	+++++
Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β	16520	+	+	+++	++
GalNAc α 1-3GalNAc α	15319	++	++	+++++	++++
GalNAc α 1-3Gal β	15275	+	++	+++	+++++
GlcNAc α 1-3GalNAc β	14866	+	+++	+++	+++++
GalNAc α 1-3GalNAc β	13938	+++	++	+++++	+++++
GlcNAc β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β	13656	++	+++	+++	+++
Fuc β 1-3GlcNAc β	13624	+	+	-	-
Gal α 1-3GalNAc(fur) β	13480	-	-	+	-
Gal β 1-3GlcN(Fm) β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β	13415	+	+	+	++
GlcNAc β 1-6GalNAc α	13410	+	+++		+++++
Neu5Gc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β	13401	+	+	-	-
KDN α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β	13223	+	-	-	-
3-O-Su-GlcNAc β	12820	+	+	-	++
GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-4)GalNAc α	12535	++	++	+++	+++
GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β	12500	+	+++	-	-
Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β	12291	++++	+++	+++++	+++++
Gal β 1-3GlcNAc β	12049	+	-	-	-
GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α	11675	-	++	-	-
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β	11553	+	-	-	-
Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	11405	+	+	+++	+++
Gal β 1-3GlcN(Fm) β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	11323	+	+	-	-
Gal α 1-4GlcNAc β	11271	-	++	+	+++
Gal α 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	11183	+	++	+++	++++
Gal α 1-4GlcNAc β	11047	-	+	+	-
Fuc α 1-3GlcNAc β	10471	-	++	-	-
ManNAc β -Gly	10407	++	++	++	+++++
GlcNAc β 1-3GalNAc α	10242	-	+++	+++	+++++
GlcNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β	10193	++	++	+	++
GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Gly	10114	+	++	-	++++
Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β	10113		-	+++	-
GlcA β 1-3GlcNAc β	9919	-	++	-	-
Gal β 1-3GlcNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β	9716	-	-	-	-
6-O-Su-Gal β 1-3GlcNAc β	9554	+	-	-	-
Fuc α 1-4GlcNAc β	9548	-	++	-	-
(GalNAc β -PEG ₂) ₃ - β -Lys-Lys	9327	++	++	++	++++
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β	9316	+	-	-	-
GlcNAc β	9145	-	+	-	-

Незначительное разнообразие АГАТ IgM у детей, получавших самый естественный и адекватный вид питания – молоко матери, уже само по себе примечательно, ведь именно эти дети связаны с материнским организмом наиболее тесно. Подобная ситуация в полной мере может объясняться тесной взаимосвязью матери и ребенка в течение всего периода вскармливания грудным молоком. В грудном молоке содержится множество различных соединений (пептидов, олигосахаридов, гликопротеинов [Martin, Ling, Blackburn, 2016; Ballard, Morrow, 2013]), обладающих противомикробной активностью и способных частично брать на себя функцию защиты и элиминации патогенов. В таком случае, наличие широкого разнообразия антител может быть преждевременным.

Три группы детей, питавшиеся искусственными смесями, напротив, к взрослым гораздо ближе, репертуары их антигликановых IgM сопоставимы. Максимальное разнообразие антител мы отметили в группе детей, питавшихся смесью, изготовленной на основе частично гидролизованного коровьего белка. Учитывая, что всемирным золотым стандартом детского питания считается грудное молоко, этот вариант искусственного питания оказывается наиболее удаленным от естественного. Повышенная способность производить IgM, которую мы видим здесь, объясняется тем, что эта смесь содержит богатое разнообразие пептидов небольшого размера (до 1,5 кДа), и, соответственно, значительно больше антигенных детерминант, чем в исходном негидролизованном белке. По результатам многочисленных экспериментов установлен факт, что некоторые пептиды могут служить углеводными миметиками, ингибиторами взаимодействия белков и углеводов, а также – иммуногенами [Carlin и др., 2009; Agadjanyan и др., 1997].

Важной особенностью репертуаров IgM у детей является практически полное отсутствие ряда иммуноглобулинов, которые у взрослых занимают значительное место в общем репертуаре. К ним относятся иммуноглобулины, направленные к Le^c, опухолеспецифичным гликанам, а также к большинству

α -Gal-терминальных гликанов. Можно говорить также о том, что группоспецифические антитела также представлены довольно слабо. По всей вероятности, относительно низкие титры или полное отсутствие вышеупомянутых иммуноглобулинов у детей не случайно, и значение возрастает только по мере взросления, т.к. у взрослых людей сигналы связывания иммуноглобулинов с этими лигандами детектируются. Точная причина нам не известна, однако мы можем предполагать в данном случае развитие событий, сходное с антителами к т.н. онкоэмбриональными антигенами. Предполагается, что в период внутриутробного развития плода имеются «нестандартные», эмбриональные антигены, антитела к которым необходимы впоследствии – уже после рождения, но в период внутриутробного развития могут быть опасными для плода. В частности, существуют так называемые онкоэмбриональные глико-антигены, которые экспрессированы на клетках организма на эмбриональной стадии развития, – они вновь появляются в эпителиальных опухолях, хотя полностью отсутствуют в тканях взрослого человека; в то же время, у взрослого человека обнаруживаются ЕАТ к онкоэмбриональным гликанам. Таким образом, ЕАТ, необходимые для онконадзора, целесообразно активировать только после рождения. Два косвенных факта свидетельствуют в пользу такого предположения, а именно, что при беременности количество антител падает, и что иммуноглобулины класса М (напомним, что ЕАТ принадлежат преимущественно к IgM) не проходят через плацентарный барьер.

Заключение и выводы

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 антигликановых иммуноглобулинов 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 антител, несоответствующего запрограммированному природой для этого возраста. Физиологическая иммуносупрессия, свойственная здоровому детскому организму, необходима для предотвращения чрезмерной реакции на обилие антигенов окружающей среды [Perre, 2003; Cabinian и др., 2012]. Наблюдаемая при искусственном вскармливании избыточность антител 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 антитела 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 антител, 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 – 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 кровотоки плода, репертуары антител 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 тоже, но по-другому: при преэклампсии, гипертензивных расстройствах и синдроме задержки развития плода выявляется набор антител, которые могут быть маркерами данных патологий.

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

1. Продолжительность циркуляции материнских IgG в крови ребенка оказалась существенно выше, чем описано в литературе; синтез собственных IgG начинается в более позднем возрасте, начиная с 1 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 антител класса IgM, то есть, большее время жизни IgG сокращает «мертвую» зону до появления IgM.

2. Репертуар IgG матери и ребенка, еще не способного синтезировать собственный IgG, совпадают неполностью. 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.

3.3 Исследование репертуара АГАТ пациенток, страдающих акушерскими патологиями.

Данные Таблицы 16 свидетельствуют об отсутствии у детей некоторых антител, широко представленных у всех здоровых взрослых. Вероятно, и при беременности, которая характеризуется физиологической иммуносупрессией, репертуар антител претерпевает изменения. Иммуносупрессия, которая наблюдается при нормально протекающей беременности, равно как и иммуносупрессия новорожденных, называется физиологической, т.к. обеспечивает адекватную реакцию на изменившиеся условия жизни [WellG.T.J. и др., 2017]. Детскому организму период сниженной активности иммунитета необходим для поэтапной выработки толерантного отношения к аутоантигенам, компонентам пищи и микроорганизмов собственной нормальной микрофлоры [Perre, 2003; Cabinian и др., 2012]. В организме беременной женщины физиологическая иммуносупрессия необходима для выработки толерантного отношения к полу-аллогенному плоду [Chen, Liu, Sytwu, 2012]. Отклонения в естественном состоянии временной «пассивности» иммунной системы приводит к различным патологиям, относящимся к разным этапам репродукции – от невозможности зачатия до невынашивания беременности, антенатальной гибели плода или серьезных нарушений развития. Сложность постановки диагноза и выбора стратегии лечения связана с отсутствием четких представлений об этиологии [Bonney, 2017].

Согласно литературным данным, в основе патогенеза различных акушерских патологий лежат изменения морфофункциональных характеристик эндотелия, покрытого гликокаликсом, вовлеченным в межклеточные взаимодействия и первым реагирующим на стимулирование со стороны гормонов, факторов роста и др. [Willhauck-Fleckenstein и др.]. Изменение профиля АГАТ может служить признаком патологии и, следовательно, иметь диагностическое значение.

В работе было проведено исследование репертуара иммуноглобулинов 350 пациенток, выбранных и разделенных на группы по их акушерскому диагнозу и сопутствующим патологиям. В частности, в исследование была включена группа пациенток – беременных женщин, страдающих гипертензивными расстройствами.

В результате, были выявлены антительные сигнатуры (сигнатура – это сочетание нескольких антител, совокупность которых диагностически значима, их количество в сигнатуре составляет от двух до семи) (Таблица 17).

Таблица 17. Диагностические сигнатуры антител, выявляемые в крови пациенток с нормальной и осложненной беременностью.

Группы	Диагностические сигнатуры	AUC	Чувствительность / специфичность
Умеренная поздняя ПЭ – Здоровые беременные	2 гликана, связывающих IgG	0.75	0.59/0.72
Ранняя ПЭ – здоровые беременные	1 гликан, связывающий IgG, и 1 – IgM	0.9	0.67/0.86
Умеренная поздняя ПЭ – Гипертензивные расстройства	4 гликана, связывающих IgM и 3 – IgG	0.74	0.58/0.75
СЗРП – Здоровые беременные	4 гликана, связывающих IgM и 1 – IgG	0.87	0.86/0.67

Таким образом, определение АГАТ имеет диагностическую ценность; при сопоставлении с применяемыми в клинике методами, данный подход оказывается по крайней мере на одном с ними уровне. Преимущество работы с данными, полученными с помощью микрочипа, заключается в том, что выявленные антитела могут помочь в выявлении клеточных мишеней и, следовательно, определить этиологические факторы развития болезни.

3.4 Усовершенствования гликочипа как инструмента изучения антител.

Большая часть исследований, описанных в настоящей работе, проводилась с помощью микроэррея, напечатанного на слайде фирмы Schott Nexterion (Германия), представляющего собой стекло размером 1 × 3 дюйма, покрытого полимером, имеющим активированные карбоксильные группы; ковалентное присоединение гликанов осуществлялось благодаря образованию амидной связи между аминокислотным остатком гликана (или аминокислотной группы аминокислотного фрагмента бактериального полисахарида) и активированным карбоксилем. В процессе данной работы выяснилось несколько серьезных недостатков слайда Schott, в первую очередь, низкая воспроизводимость качества между разными партиями, и даже внутри одной. Это мотивировало нас изменить химию присоединения лигандов к слайду, а также разработать совсем другой слайд. В числе основных недостатков, которые сказываются на качестве микрочипов, можно указать морфологию напечатанных точек лигандов и невысокую степень иммобилизации (Рисунок 11).

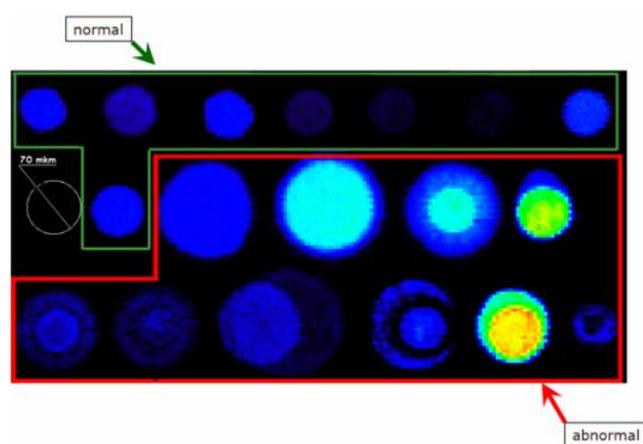


Рисунок 11. Сравнение морфологии спотов гликанов на стеклянных слайдах. Споты одинакового размера являются нормальными; слишком крупные или мелкие, а также имеющие неравномерность распределения флуоресцентного сигнала в виде затемнений или ореола, затрудняют анализ.

Решение задачи по улучшению морфологии точек при печати осуществлялось за счет модифицирования самой методики производства микрочипов: был выбран другой вариант химической связи с активированной поверхностью слайда, а также прибор с иным принципом печати.

3.4.1 Печать гликанов в виде полиакриламидных конъюгатов.

Гликаны, входящие в используемый нами эррей, сильно различаются по размерам (от моно до 11-олигосахарида), гидрофобности и заряду (есть такие, в состав которых входит три и более анионных групп), это сказывается на морфологии точек, формирующихся при печати, а форма и размер точек влияют на количественный подсчет их интенсивности.

Чтобы преодолеть влияние природы гликана, мы использовали двухстадийный метод печати: сначала синтезировали полиакриламидные (РАА) конъюгаты гликанов, а затем печатали Glyc-РАА на слайде Schott. Химия иммобилизации в этом случае иная, ковалентная связь (сложноэфирная) образуется между первичными гидроксильными группами полимера (РАА – это полимер с боковыми заместителями $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$). Благодаря этому, удалось добиться значительного улучшения морфологии точек (Рисунок 12). Более воспроизводимые результаты и улучшенную морфологию удалось также получить за счет перехода с 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).

Флуоресцентный сигнал оказывается равномерно распределенным по всей площади спота, а достоверность флуоресцентного сигнала тем выше, чем более равномерно распределена интенсивность флуоресценции.

Этот метод печати имеет два дополнительных преимущества. Во-первых, эффективность использования гликанов повышается, так как выход на

стадии синтеза Глус-РАА количественный, а на стадии иммобилизации близок к этому, в то время как в случае иммобилизации Глус-sp-NH₂ выход в среднем составляет 15%, и зависит от природы гликана. Во-вторых, введение в состав полимера небольшого количества флуоресцентной метки (1 мольный %) позволяет делать тотальный контроль (как качественный, так и количественный) качества печати, иными словами, появляется возможность контролировать каждый из ~3500 спотов на чипе.

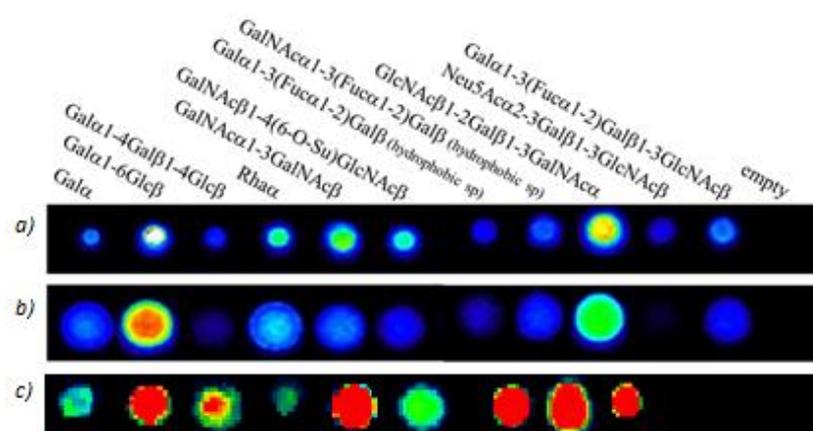


Рисунок 12. Морфология напечатанных на стекле спотов гликанов в аминокпейсерированной форме (a) и в виде РАА-конъюгатов (b), а также на пластиковых слайдах в виде РАА-конъюгатов (c). В случаях (b) и (c) отмечены увеличение размера спота и однородность в распределении флуоресцентного сигнала.

3.4.2. Пластиковый слайд.

Вторая из проблем, влияющих на качество производимых чипов, о которой говорилось выше, это невысокая степень иммобилизации гликанов на поверхности. Проблему эту решить крайне трудно, т.к. стеклянный слайд (слайдом мы называем то, на чем печатаются гликаны, в результате чего получается чип) является коммерческим продуктом и покупается у производителя в готовом виде.

Для того, чтобы иметь возможность модифицировать и совершенствовать поверхность, была предпринята попытка разработать активированный слайд собственного производства. На пластиковой (черный полистирол) подложке, которую методом спин-коатинга покрывали полимером, содержащим эпоксидные группы, печатали Glyc-sp-NH₂, Glyc-РАА и (или) полисахариды. Качество печати гликанов при использовании такой иммобилизации показано на Рисунке 12(с).

Часть настоящей работы по исследованию АГАТ человека проводилась уже с помощью таких пластиковых чипов. В результате, процесс печати гликочипов стал воспроизводимым (корреляции между гликанами внутри одного микрочипа и между чипами разных партий были выше 90%) и перестал быть зависимым от возможных нарушений технологии фирмой-производителем слайдов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Литература описывает ЕАТ как группу антител, появление которых не связано с предварительной иммунизацией. Они выполняют важные функции – защитную, надзорную и регуляторную, обеспечивая постоянство внутренней среды организма. ЕАТ, обладая особыми характеристиками – полиреактивностью и низкой аффинностью – являются частью системы врожденного иммунитета. Не смотря на появление множества экспериментальных работ, затрагивающих различные аспекты функционирования репертуара ЕАТ, вопрос происхождения этой группы антител остается открытым.

Чтобы ответить на него, необходимо детально и всесторонне изучить динамику появления антител в онтогенезе, оценить роль факторов, способных оказать влияние на процесс формирования репертуара антител. В качестве объекта исследования были выбраны животные-гнотобиоты и дети в возрасте до 1 года. Работа с животными предоставляет исследователю более широкие возможности варьирования условий их жизни и контролируемого воздействия выбранного фактора. В нашей работе мы изучили воздействие микроорганизмов и других потенциальных источников антигенов на формирование репертуара антител. Влияние другого важного фактора – питания – было изучено на образцах сывороток крови детей в возрасте 3 дней, а также 3, 6 и 12 месяцев.

Во всех образцах изучался репертуар АГАТ, которые были выбраны по нескольким причинам:

– гликаны в основной массе являются тимуснезависимыми антигенами, что подразумевает более «упрощенный» вариант иммунного ответа на них; это особенно важно в связи с тем, что В1-лимфоциты и В-клетки маргинальной зоны селезенки как основные продуценты ЕАТ, отвечают на антигены, не привлекая к участию Т-лимфоциты.

- гликаны в составе гликокаликса клеток чрезвычайно широко представлены в организме, т.е. представляют собой резервуар потенциальных аутоантигенов;
- разнообразные гликаны являются основным компонентом клеточной стенки бактерий; еще до поглощения и расщепления микробной единицы именно полисахарид подлежит распознаванию в первую очередь;
- разнообразные гликаны входят в состав питания для новорожденных и, в связи с повышенной проницаемостью кишечной стенки в раннем возрасте, могут напрямую распознаваться клетками иммунной системы; опосредованное влияние гликанов пищи выражается в том, что они, являясь субстратом для микроорганизмов, влияют на формирование микрофлоры;
- гликаны, в отличие от белков с их сложной трехмерной структурой, являются подходящими молекулами для проведения твердофазного анализа, одним из вариантов которого является гликочип, использованный в работе.

Исследование сывороток крови мышей-гнотобиотов показало, что у нестерильных лабораторных мышей репертуар АГАТ достаточно широк: количество гликанов, которые связывают антитела, достигает 100 из более чем шести сотен, представленных на микрочипе. В группах, где контакт животных ограничивался одним или несколькими выбранными микроорганизмами, антител было значительно меньше. Перевод на нестерильную пищу также не приводил к существенному расширению репертуара АГАТ. Наибольшее разнообразие, сопоставимое с репертуаром антител у обычных лабораторных мышей, наблюдалось только в группе животных, которые однократно были подвергнуты гаважу остатками непереваренной пищи нестерильных мышей. Таким образом, для формирования полноценного репертуара АГАТ необходимо широкое разнообразие антигенов в различных формах и из различных источников. При этом, в виду отсутствия соответствия структур антигенов и производимых АГАТ, мы можем говорить о продукции антител в

результате стимуляции, или «примирения» В-лимфоцитов, а не об иммунизации в классическом представлении.

Важно отметить, что в каждой из групп отмечались существенные индивидуальные различия. Исследование АГАТ инбредных SPF-мышей подтвердило, что индивидуальная реакция на введение одних и тех же антигенов является скорее закономерностью, чем случайностью. Это наблюдение также свидетельствует в пользу предположение о том, что микробное окружение оказывает стимулирующее действие на иммунную систему, не приводя к иммунизации, но активируя клетки-продуценты антител.

Совершенно очевидно, что при отсутствии каких-либо ограничений в контакте с окружающей средой иммунная система постепенно накапливает информацию об антигенах. У человека в течение первого года жизни происходят наиболее существенные изменения, которые соответствуют двум важнейшим процессам: формированию устойчивой микрофлоры и переходу к «взрослому» рациону питания. Антитела классов *G* и *M* появляются в разное время, т.к. выполняют в организме различные функции. У новорожденных количество IgG сопоставимо с уровнем взрослого человека, и иммуноглобулины этого класса имеют преимущественно материнское происхождение, т.к. передаются внутриутробно. IgM, молекулы которого не могут преодолевать плацентарный барьер, обнаруживаются в незначительных количествах; их содержание в крови нарастает постепенно и достигает нормального уровня только к концу второго года жизни. Проведённое исследование репертуаров АГАТ у детей первого года жизни в целом подтверждает литературные данные, касающиеся иммуноглобулинов безотносительно их специфичности. В то же время были обнаружены некоторые особенности, которые не укладываются в общую картину клинических данных. Широкий репертуар АГАТ IgG у детей в возрасте 3 месяцев действительно может иметь материнское происхождение, т.к. во

многом набор антител матери и ее ребенка совпадают. Однако то, что материнские IgG обнаруживаются у ребенка в 3 месяца, позволяет нам предполагать, что для этих антител характерны такие особенности строения молекулы, которые позволяют им существовать в системном кровотоке ребенка длительное время, намного превышающее 21 – 23 дня – именно столько составляет срок жизни IgG. В случае IgM отмечается некоторое «отставание» АГАТ этого класса от общего IgM, данные о котором были взяты из литературы. IgM, распознающие гликаны микрочипа, обнаруживались только у годовалых детей, в то время как общее количество IgM в 3 месяца соответствует 10 – 15% уровня взрослого человека, а в 6 месяцев может достигать 40 – 50%.

Примечательно, что все вышеописанные особенности были выявлены у всех детей, независимо от того, продолжали ли они тесно контактировать с матерью, питаясь грудным молоком, или получали в пищу искусственные смеси. Иными словами, рацион питания не оказывает существенного влияния на «онтогенетическую программу» продукции антител. В то же время, при рассмотрении специфичностей антител в репертуаре, различия оказываются весьма существенными. Наименьшее разнообразие АГАТ IgM было выявлено в группе детей, получавших самый естественный и адекватный вид питания – молоко матери; максимальное разнообразие было отмечено у детей, которых кормили молочной смесью, изготовленной с использованием частично гидролизованного белка. Объяснить наблюдаемое явление можно с учетом существующей тесной связи между кормящей матерью и ее ребенком - в грудном молоке содержится множество различных соединений, обладающих противомикробной активностью и способных частично брать на себя функцию защиты и элиминации патогенов. В таком случае, наличие широкого разнообразия антител может быть преждевременным.

Три группы детей, питавшиеся искусственными смесями, напротив, к взрослым гораздо ближе, репертуары их антигликановых IgM сопоставимы.

Повышенная способность производить IgM, которую мы видим здесь, объясняется тем, что молочные смеси содержат богатое разнообразие пептидов небольшого размера (до 1,5 кДа), полученные, к тому же, из нечеловеческого белка. Такие смеси могут содержать большее количество антигенных детерминант за счет гидролиза – весьма неспецифического типа химической реакции, а также по причине чужеродности исходного белка. По результатам многочисленных экспериментов, описанных в литературе, установлен факт, что некоторые пептиды могут служить углеводными миметиками, ингибиторами взаимодействия белков и углеводов, а также – иммуногенами.

ВЫВОДЫ

1. Близкий к полноценному репертуар антигликановых антител 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 антител. 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 со взрослым человеком, однако в нем отсутствуют антитела 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 антител 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 антител. Питание напрямую или опосредованно, через микрофлору, влияет на репертуар антигликановых антител.
4. Репертуары антигликановых антител при нормальной и патологически протекающей беременности достоверно отличаются,

что стало основой разработки молекулярной диагностики отклонений при беременности.

5. Гликочип как инструмент исследования репертуаров антигликановых антител, существенно улучшен за счет использования пластика в качестве материала для подложки, а также нового подхода к химии иммобилизации лигандов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abrahamsson T.R., Sherman P.M. Multifaceted Effects of Human Milk Oligosaccharides // *J Infect Dis.* 2014. Т. 209. № 3. С. 323-324.
2. Abreu M. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function // *Nat Rev Immunol.* 2010. Т. 10. № 2. С. 131-44.
3. Agadjanyan M. и др. Peptide mimicry of carbohydrate epitopes on human immunodeficiency virus // *Nat Biotechnol.* 1997. Т. 15. № 6. С. 547-51.
4. Agarwal S., Cunningham-Rundles C. Assessment and clinical interpretation of reduced IgG values // *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2007. Т. 99. № 3. С. 281-283.
5. Akkerman R., Faas M.M., Vos P. Non-digestible carbohydrates in infant formula as substitution for human milk oligosaccharide functions: Effects on microbiota and gut maturation // *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018. Т. 15. С. 1-12.
6. Aldredge D.L. и др. Annotation and structural elucidation of bovine milk oligosaccharides and determination of novel fucosylated structures // *Glycobiology.* 2013. Т. 23. № 6. С. 664-676.
7. Allman D., Pillai S. Peripheral B cell subsets // *Curr Opin Immunol.* 2008. Т. 20. № 2. С. 149-157.
8. Alyce F.M., Oliver M., Kearney J.F. Marginal Zone and B1 B Cells Unite in the Early Response against T-Independent Blood-Borne Particulate Antigens // *Immunity.* 2001. Т. 14. № 5. С. 617-629.
9. Amon R. и др. Glycans in immune recognition and response // *CarbohydrRes.* 2014. Т. 7. № 389. С. 115-122.
10. Andreas N.J. Role of human milk oligosaccharides in Group B Streptococcus colonization // *ClinTranslImmunology.* 2016. Т. 5. № 8. С. 99
11. Appelgren D. и др. Marginal-Zone B-Cells Are Main Producers of IgM in Humans, and Are Reduced in Patients With Autoimmune Vasculitis // *FrontImmunol.* 2018. № 9. С. 2242.
12. Arda A., Jimenez-Barbero J. The recognition of glycans by protein receptors. Insights from NMR spectroscopy // *Chem Commun (Camb).* 2018. Т. 54. № 38. С. 4761-4769.
13. Arend P. "Natural" antibodies and histo-blood groups in biological development with respect to histo-blood group A. A perspective review // *Immunobiology.* 2011. Т. 216. № 12. С. 1318-21.

14. Asakuma S. и др. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria // *J Biol Chem*. 2011. Т. 286. № 40. С. 34583-92.
15. Attananvanich K., Kearney J.F. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells // *J Immunol*. 2004. Т. 172. № 2. С. 803-11.
16. Avrameas S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothiseauton' // *Immunol Today*. 1991. Т. 12. № 5. С. 154-159
17. Avrameas S., Alexopoulos H., Moutsopoulos H.M. Natural Autoantibodies: An Undersung Hero of the Immune System and Autoimmune Disorders—A Point of View // *Front Immunol*. 2018. Т. 9. С. 1320.
18. Ayechu-Muruzabal V. и др. Diversity of Human Milk Oligosaccharides and Effects on Early Life Immune Development // *Front Pediatr*. 2018. Т. 6. С. 239.
19. Bacon J.M., Young I.F. ABO incompatible blood transfusion // *Pathology*. 1989. Т. 21. № 3. С. 181-184.
20. Bailly P., Bouhours J.-F. P blood group and related antigens. In: Cartron J.-P., Rouger P. (Eds.), *Blood Cell Biochemistry*, 1995. V.6: Molecular Basis of Major Human Blood Group Antigens. Plenum Press, New York, NY, P. 299-329.
21. Bakker-Zierikzee A.M. и др. Effects of infant formula containing a mixture of galacto- and fructo-oligosaccharides or viable *Bifidobacterium animalis* on the intestinal microflora during the first 4 months of life // *Br J Nutr*. 2005. Т. 94. № 5. С. 783-90.
22. Baldus S.E. и др. Coexpression of MUC-1 mucin peptide core and the Thomsen-Friedenreich antigen in colorectal neoplasms // *Cancer*. 1998. Т. 82. № 6. С. 1019-1027.
23. Ballard O., Morrow A.L. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors // *Pediatr Clin North Am*. 2013. Т. 60. № 1. С. 49-74.
24. Basha S., Surendran N., Pichichero M. Immune Response in Neonates // *Expert Rev Clin Immunol*. 2014. Т. 10. № 9. С. 1171-1184.
25. Battersby A. и др. Antimicrobial Proteins and Peptides in Early Life: Ontogeny and Translational Opportunities // *Front Immunol*. 2016. Т. 7. С. 309.
26. Baumgarth N. Innate-like B cells and their rules of engagement // *Adv Exp Med Biol*. 2013. № 785. С. 57-66.
27. Baumgarth N. и др. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection // *J. Exp. Med*. 2000. Т. 192. № 2. С. 271-80.

28. Baumgarth N., Tung J.W., Herzenberg L.A. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion // *Springer Semin Immun.* 2005. № 26. С. 347–362.
29. Bellis A. и др. Characterization of antipituitary antibodies targeting pituitary hormone-secreting cells in idiopathic growth hormone deficiency and autoimmune endocrine diseases // *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005. Т. 63. № 1. С. 45-9.
30. Ben X-M. Nutritional management of newborn infants: Practical guidelines // *World J Gastroenterol*. 2008. Т. 14. № 40. С. 6133-6139.
31. Ben X-M. и др. Low level of galacto-oligosaccharide in infant formula stimulates growth of intestinal *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* // *World J Gastroenterol*. 2008. Т. 14. № 42. С. 6564-6568.
32. Berg R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract // *Adv Exp Me Biol*. 1999. Т. 473. С. 11-30.
33. Bhatia B.D. и др. Bacterial flora in mothers and babies with reference to causative agent in neonatal septicemia // *Indian Pediatr*. 1989. Т. 26. № 5. С. 455-9.
34. Biagi E. и др. The Bacterial Ecosystem of Mother's Milk and Infant's Mouth and Gut // *Front Microbiol*. 2017. Т. 8. С. 1214.
35. Bienenstock J. и др. Fucosylated but Not Sialylated Milk Oligosaccharides Diminish Colon Motor Contractions // *PLoS One*. 2013. Т. 8. № 10. С. 76236.
36. Binder C.J. и др. The role of natural antibodies in atherogenesis // *J Lipid Res*. 2005. Т. 46. № 7. С. 1353-63.
37. Binder C.J., Silverman G.J. Natural antibodies and the autoimmunity of atherosclerosis // *Springer Semin Immunopathol*. 2005. Т. 26. № 4. С. 385-404.
38. Bird G.W. и др. Inherited 'mosaicism' within the ABO blood group system // *J Immunogenet*. 1978. Т. 5. №. 4. С. 215-9.
39. Bliss J.M., Wynn J.L. Editorial: The Neonatal Immune System: A Unique Host-Microbial Interface // *Front Pediatr*. 2017. Т. 5. С. 274.
40. Bode L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama // *Glycobiology*. 2012. Т. 22. № 9. С. 1147-1162.
41. Bode L. The functional biology of human milk oligosaccharides // *Early Hum Dev*. 2015. Т. 91. № 11. С. 619-22.
42. Boersma E.R. Serum immunoglobulins IgG, IgM, and IgA in maternal cord blood pairs from infants of normal and low birth weights in Tanzania // *Arch Dis Child*. 1981. Т. 56. № 1. С. 31-35.

43. Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses // *Molecular Immunology*.2000. № 37. С. 1141–1149.
44. Bonney E.A. Immune regulation in pregnancy: a matter of perspective? // *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2016. Т. 43. № 4. С. 679-698.
45. Bovin N.V. Natural antibodies to glycans // *Biochemistry (Mosc)*.2013. Т. 78. № 7. С. 786-97.
46. Box G.E.P., Cox D.R. An analysis of transformations // 1964. J. R. Stat. Soc. B. Т. 26. С. 211–252.
47. Brady J.P. Marketing breast milk substitutes: problems and perils throughout the world // *Arch Dis Child*. 2012. Т. 97. № 6. С. 529-532.
48. Brandlein S. и др. Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans // *Cancer res*. 2003. Т. 63. № 22. С. 7995-8005.
49. Brandlein S., Vollmers H.P. Natural antibodies and cancer // *J Autoimmune*. 2007. Т. 29. № 4. С. 295-302.
50. Brandzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions // *Scand J Immunol*.2009. Т. 70. № 6. С. 505-515.
51. Bratosin D. и др. Improved storage of erythrocytes by prior leukodepletion: flow cytometric evaluation of stored erythrocytes // *Cytometry*.2001. Т. 46. № 6. С. 351-6.
52. Brockhausen I. и др. Biosynthesis of O-glycans in leukocytes from normal donors and from patients with leukemia: increase in O-glycan core 2 UDP-GlcNAc:Gal beta 3 GalNAc alpha-R (GlcNAc to GalNAc) beta(1-6)-N-acetylglucosaminyltransferase in leukemic cells // *Cancer Res*. 1991. Т. 51. № 4. С. 1257-63.
53. Brockhausen I. и др. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells // *Eur. J. Biochem*. 1995. Т. 233. № 2. С. 607-17.
54. Brodin P., Davis M.M. Human immune system variation // *Nat Rev Immunol*. 2017. Т. 17. № 1. С. 21-27.
55. Brooks C.L. и др. Antibody recognition of a unique tumor-specific glycopeptide antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2010. Т. 107. С. 10056-10061.
56. Butler J.E. и др. Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues // *Immunology*.2000. Т. 100. С. 119-130.
57. Caballero A. и др. Functional and structural requirements for the internalization of distinct BCR-ligand complexes // *Eur J Immunol*.2006. Т. 36. № 12. С 3131-45.

58. Cabinian A. и др. Transfer of Maternal Immune Cells by Breastfeeding: Maternal Cytotoxic T Lymphocytes Present in Breast Milk Localize in the Peyer's Patches of the Nursed Infant // *PLoS One*. 2016. Т. 11. № 6. С. 0156762.
59. Cacho N.T., Lawrence R.M. Innate Immunity and Breast Milk // *Front Immunol*. 2017. Т. 8. С. 584.
60. Cafarelli C. и др. Cow's milk protein allergy in children: a practical guide // *Ital J Pediatr*. 2010. Т. 36. № 5.
61. Calder P.C. и др. Early nutrition and immunity - progress and perspectives // *Br J Nutr*. 2006. Т. 96. № 4. С. 774-90.
62. Cancro M.P., Kearney J.F. B cell positive selection: road map to the primary repertoire? // *J Immunol*. 2004. Т. 1. № 1. С. 15-9
63. Capellano G. и др. Anti-cytokine autoantibodies in autoimmune diseases // *Am J Clin Exp Immunol*. 2012. Т. 1. № 12. С. 136-146.
64. Carlin A.F. и др. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response // *Blood*. 2009. Т. 113. № 14. С. 3333-6.
65. Carrol M.C., Holers V.M. Innate Autoimmunity // *Advances in Immunology*. 2005. Т. 86. С. 137-157.
66. Castanys-Munoz E., Martin M.J., Prieto P.A. 2'-fucosyllactose: an abundant, genetically determined soluble glycan present in human milk // *Nutr Rev*. 2013. Т. № 12. С. 773-89.
67. Castle S.C. и др. Comorbidity is a better predictor of impaired immunity than chronological age in older adults // *J Am Geriatr Soc*. 2005. Т. 53. № 9. С. 1565-9.
68. Cazet A. и др. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer // *Breast Cancer Res*. 2010. №12. С. 204.
69. Cebra J.J. и др. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses // *Dev Immunol*. 1998. Т. 6. № 1-2. С. 13-8.
70. Cerutti A., Cols M., Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate like antibody-producing lymphocytes // *Nat Rev Immunol*. 2013. Т. 13. № 2. С. 113-121.
71. Cesa S. и др. Infant Milk Formulas: Effect of Storage Conditions on the Stability of Powdered Products towards Autoxidation // *Foods*. 2015. Т. 4. № 3. С. 487-500.

72. Chandler K.B., Costello C.E. Glycomics and Glycoproteomics of Membrane Proteins and Cell Surface Receptors: Present Trends and Future Opportunities // *Electrophoresis*. 2016. Т. 37. № 11. С. 1407-1419.
73. Chaplin D.D. Overview of the immune response // *J Allergy Clin Immunol*. 2010. Т. 125. С. 3-23.
74. Charbonneau M.R. и др. Sialylated milk oligosaccharides promote microbiota-dependent growth in models of infant undernutrition // *Cell*. 2016. Т. 164. № 5. С. 859-871.
75. Chatterjee P., и др. Modulation of antigen presentation and B cell receptor signaling in B cells of beige mice // *J Immunol*. 2012. Т. 188. № 6. С. 2695-702.
76. Chen L. и др. The Maturing Development of Gut Microbiota in Commercial Piglets during the Weaning Transition // *Front Microbiol*. 2017. Т. 8. № 1688.
77. Chen L., Flies D.B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition // *Nat Rev Immunol*. 2013. Т. 13. №. 4. С. 227-242.
78. Chen S., Haab B.B. Analysis of glycans on serum proteins using antibody microarrays // *Methods Mol Biol*. 2009. Т. 520. С. 39-58.
79. Chen S-J., Liu Y-L., Sytwu H-K. Immunologic Regulation in Pregnancy: From Mechanism to Therapeutic Strategy for Immunomodulation // *Clin Dev Immunol*. 2012. Т. 258391.
80. Chen X. Human Milk Oligosaccharides (HMOS): Structure, Function, and Enzyme-Catalyzed Synthesis // *Adv Carbohydr Chem Biochem*. 2015. Т. 72. С. 113-90.
81. Cheng M.M. и др. Development of serum IgA and IgM levels in breast-fed and formula-fed infants during the first week of life // *Early Hum Dev*. 2012. Т. 88. № 9. С. 743-5.
82. Chia J., Goh G., Bard F. Short O-GalNAc glycans: regulation and role in tumor development and clinical perspectives // *Biochim Biophys Acta*. 2016. Т, 1860. № 8. С. 1623-1639.
83. Choi H.W., Klessig D.F. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity // *BMC Plat Biol*. 2016. Т. 16. С. 232.
84. Choi Y-S., Song I.G. Fetal and preterm infant microbiomes: a new perspective of necrotizing enterocolitis // *Korean J pediatr*. 2017. Т. 60. № 10. С. 307-311.
85. Chou M-Y. и др. Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans // *J Clin Invest*. 2009. Т. 199. № 5. С. 1335-1349.

86. Choudhuri K. и др. Immunology: how do T cells recognize antigen? // *Curr Biol.* 2005. Т. 15. № 10. С. 382-5.
87. Chu D. и др. The microbiome in preterm birth // *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol.* 2018. Т. 52. С. 103-113.
88. Cinamon G. и др. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport // *Nat Immunol.* 2008. Т. 9. № 1. С. 54-62.
89. Cisalpino D. и др. Microbiota-Induced Antibodies Are Essential for Host Inflammatory Responsiveness to Sterile and Infectious Stimuli // *J Immunol.* 2017. Т. 198. № 10. С. 4096-4106.
90. Cohen I., Norins L. Antibodies of the IgG, IgM, and IgA classes in newborn and adult sera reactive with gram-negative bacteria // *J Clin Invest.* 1968. Т. 47. № 5. С. 1053-1062.
91. Cole D. и др. The molecular determinants of CD8 co-receptor function // *Immunology.* 2012. Т. 137. № 2. С. 139-148.
92. Conlon M.A., Bird A.R. The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health // *Nutrients.* 2015. Т. 7. № 1. С. 17-44.
93. Conway S.P., Dear P.R., Smith I. Immunoglobulin profile of the preterm baby // *Arch Dis Child.* 1985. Т. 60. № 3. С. 208-212.
94. Cooling L. Blood Groups in Infection and Host Susceptibility // *Clin microbial Rev.* 2015. Т. 28. № 3. С. 807-870.
95. Cooper D.K.C. Modifying the sugar icing on the transplantation cake // *Glycobiology.* 2016. Т. 26. № 6. С. 571-581.
96. Coppa G.V. и др. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: Escherichia coli, Vibrio cholerae, and Salmonella typhi // *Pediatr Res.* 2006. Т. 59. № 3. С. 377-382.
97. Corkins K., Shurley T. What's in the Bottle? A Review of Infant Formulas // *Nutr Clin Pract.* 2016. Т. 31. № 6. С. 723-729.
98. Corr S.C., Gahan C.C., Hill C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis // *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008. Т. 52. № 1. С. 2-12.
99. Coutinho A., Kazatchkine M.D., Avrameas S. Natural autoantibodies // *Current Opinion in Immunology.* 1995. Т. 7. С. 812-818.

100. Craft K.M., Townsend S.D. The Human Milk Glycome as a Defense Against Infectious Diseases: Rationale, Challenges, and Opportunities // *ACS Infect Dis.* 2018. Т. 4. № 2. С. 77-83.
101. Cramer D.V. Natural antibodies and the host immune responses to xenografts // *Xenotransplantation.* 2000. Т. 7. № 2. С. 83-92.
102. Cravioto A. и др. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk // *J Infect Dis.* 1991. Т. 163. № 6. С. 1247-1255.
103. Cuenca A.G. и др. Role of Innate Immunity in Neonatal Infection // *Am J Perinatol.* 2013. Т. 30. № 2. С. 105-112.
104. Cunliffe R.N., Mahida Y.R. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract // *J Leukoc Biol.* 2004. Т. 75. № 1. С. 49-58.
105. Daniels G. Bromilow I. // Essential guide to blood groups. Second Edition. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. 2010. 111 с.
106. Danzer C.P. и др. Transitional and marginal zone B cells have a high proportion of unmasked CD22: implications for BCR signaling // *Int Immunol.* 2003. Т. 15. № 10. С. 1137-1147.
107. Davenport E.R. и др. The human microbiome in evolution // *BMC Biol.* 2017. Т. 15. № 127.
108. DeFranco A.L. The two-headed antigen. B-cell co-receptors // *Curr Biol.* 1996. Т. 6. № 5. С. 548-50.
109. Diaz-Rodriguez M., и др. Natural and adaptive IgM antibodies in the recognition of tumor-associated antigens of breast cancer (Review) // *Oncol Rep.* 2015. Т. 34. № 3. С. 1106-1114.
110. Dighiero G., Rose N.R. Critical self-epitopes are key to the understanding of self-tolerance and autoimmunity // *Immunol. Today.* 1999. Т. 20. № 9. С. 423-428
111. Ding Zh. и др. Complement-Activating IgM Enhances the Humoral but Not the T Cell Immune Response in Mice // *PLoS One.* 2013. Т. 8. № 11. С. 81299.
112. Doherty A.M. и др. Human Milk Oligosaccharides and Associations With Immune-Mediated Disease and Infection in Childhood: A Systematic Review // *Front Pediatr.* 2018. Т. 6. С. 91.
113. Dowling D.J., Levy O. Ontogeny of Early Life Immunity // *Trends Immunol.* 2014. Т. 35. № 7. С. 299-310.

114. Dzidic M. и др. Gut Microbiota and Mucosal Immunity in the Neonate // *Med Sci (Basel)*. 2018. Т. 6. № 3. С. 56.
115. Edwards L.J., Evavold B.D. T cell recognition of weak ligands: roles of signaling, receptor number, and affinity // *Immunol Res*. 2011. Т. 50. № 1. С. 39-48.
116. Ehrenstein MR, O'Keefe TL, Davies SL, Neuberger MS. Targeted gene disruption reveals a role for natural secretory IgM in the maturation of the primary immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) 95:10089–1093.
117. Einarsdottir H.K. и др. Comparison of the Fc glycosylation of fetal and maternal immunoglobulin G // *Glycoconj J*. 2013. Т. 30. № 2. С. 147-157.
118. Elkon K., Casali P. Nature and functions of autoantibodies // *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008. Т. 4. № 9. С. 491-498.
119. Ellermann-Eriksen S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus // *Virol J*. 2005. Т. 2. С. 59.
120. Elliott D.E., Siddique S.S., Weinstock J.V. Innate immunity in disease // *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014. Т. 12. № 15. С. 749-755.
121. Esteve-Sole A. и др. Immunological Changes in Blood of Newborns Exposed to Anti-TNF- α during Pregnancy // *Front Immunol*. 2017. Т. 8. С. 1123.
122. Evaldson G. и др. The normal human anaerobic microflora // *Scand J Infect Dis Suppl*. 1982. Т. 35. С. 9-15.
123. Ewald R., Sumner S.C.J. Blood Type Biochemistry and Human Disease // *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016. Т. 8. № 6. С. 517-535.
124. Ezzelarab M., Ayares D., Cooper D. Carbohydrates in xenotransplantation // *Immunol. Cell Biol*. 2005. Т. 83. С. 396–404.
125. Facinelli B. и др. Breast milk oligosaccharides: effects of 2'-fucosyllactose and 6'-sialyllactose on the adhesion of Escherichia coli and Salmonella fytis to Caco-2 cells // *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2018. Т. 21. С. 1-3.
126. Fadrl M. и др. Keeping bugs in check: The mucus layer as a critical component in maintaining intestinal homeostasis // *IUBMB Life*. 2015. Т. 67. № 4. С. 275-85.
127. Faire U., Frostegard J. Natural antibodies against phosphorylcholine in cardiovascular disease // *Ann N Y Acad Sci*. 2009. №. 1173. С. 292-300.
128. Falth-Magnusson K., Kjellman N., Magnusson K.E. Antibodies IgG, IgA, and IgM to food antigens during the first 18 months of life in relation to feeding and development of atopic disease // *J Allergy Clin Immunol*. 1988. Т. 81. № 4. С. 743-9.

129. Fiebiger U., Bereswill S., Heimesaat M.M. Dissecting the Interplay Between Intestinal Microbiota and Host Immunity in Health and Disease: Lessons Learned from Germfree and Gnotobiotic Animal Models // *Eur J Microbiol Immunol.* 2016. Т. 6. № 4. С. 253-271.
130. Feinberg Н. и др. Mechanism for Recognition of an Unusual Mycobacterial Glycolipid by the Macrophage Receptor Mincle // *J Biol Chem.* 2013. Т. 288. № 40. С. 28457-28465.
131. Forthall D.N. Functions of antibodies // *Microbiol Spectr.* 2014. Т. 2. № 4. С. 1-17.
132. Foster K.R. и др. The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash // *Nature.* 2017. Т. 548. № 7665. С. 43-51.
133. Fouda G.G. и др. The Impact of IgG transplacental transfer on early life immunity // *Immunohorizons.* 2018. Т. 2. № 1. С. 14-25.
134. Fouhy F. и др. Composition of the early intestinal microbiota. Knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps // *GutMicrobes.* 2012. Т. 3. № 3. С. 203-220.
135. Fujimura K.E. и др. Role of the gut microbiota in defining human health // *Expert Rev Anti infect Ther.* 2010. Т. 8. № 4. С. 435-454.
136. Galili U. Immune response, accommodation, and tolerance to transplantation carbohydrate antigens // *Transplantation.* 2004. Т. 78. № 8. С. 1093-1098.
137. Garcia-Martinez I., Shaker M.E., Mehal W.Z. Therapeutic Opportunities in Damage-Associated Molecular Pattern-Driven Metabolic Diseases // *Antioxid Redox Signal.* 2015. Т. 23. №. 17. С. 1305-1315.
138. Garrido D. и др. Comparative transcriptomics reveals key differences in the response to milk oligosaccharides of infant gut-associated bifidobacteria // *SciRep.* 2015. Т. 5. № 13517.
139. Gascoigne N.R.J. и др. Co-Receptors and Recognition of Self at the Immunological Synapse // *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010. Т. 340. С. 171-189.
140. Gege X. и др. Absolute Quantitation of Human Milk Oligosaccharides Reveals Phenotypic Variations during Lactation // *J Nutr.* 2017. Т. 147. № 1. С. 117-124.
141. Geisberger R., Cramer R., Achatz G. Models of signal transduction through the B-cell antigen receptor // *Immunology.* 2003. Т. 110. № 4. С. 401-410.
142. Georgeson G.D. и др. Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections // *Eur J Pediatr.* 2001. Т. 160. № 8. С. 478-82.

143. Georgountzou A., Papadopoulos N.G. Postnatal Innate Immune Development: From Birth to Adulthood // *Front Immunol.* 2017. Т. 8. С. 957.
144. German J.B. и др. Human milk oligosaccharides: evolution, structures and bioselectivity as substrates for intestinal bacteria // *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program.* 2008. Т. 62. С. 205-18.
145. Gervassi A.L., Horton H. Is Infant Immunity Actively Suppressed or Immature? // *Virology (Auckl).* 2014. Т. 5. С. 1-9.
146. Ghosn E.E.B. и др. Distinct progenitors for B-1 and B-2 cells are present in adult mouse spleen // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011. Т. 108. № 7. С. 2879-2884.
147. Giannattasio A., и др. Nutrition and immunity in newborns // *Ital J Pediatr.* 2015. Т. 41. С. A33.
148. Gonia S. и др. Human Milk Oligosaccharides Inhibit *Candida albicans* Invasion of Human Premature Intestinal Epithelial Cells // *J Nutr.* 2015. Т. 145. № 9. С. 1992-8.
149. Gotoh A. и др. Sharing of human milk oligosaccharides degradants within bifidobacterial communities in faecal cultures supplemented with *Bifidobacterium bifidum* // *SciRep.* Т. 2018. Т. 8. № 13958.
150. Granato A., Chen Y., Wesemann D.R. Primary immunoglobulin repertoire development: time and space matter // *Curr Opin Immunol.* 2015. № 33. С. 126-131.
151. Gregory K.E., Walker W.A. Immunologic Factors in Human Milk and Disease Prevention in the Preterm Infant // *Curr Pediatr Rep.* 2013. Т. 1. № 10.
152. Grether J.K. и др. Prenatal and Newborn Immunoglobulin Levels from Mother-Child Pairs and Risk of Autism Spectrum Disorders // *Front Neurosci.* 2016. Т. 10. С. 218.
153. Grier A. и др. Impact of prematurity and nutrition on the developing gut microbiome and preterm infant growth // *Microbiome.* 2017. Т. 5. № 158.
154. Groer M.W. и др. Development of the preterm infant gut microbiome: a research priority // *Microbiome.* 2014. Т. 2. № 38.
155. Gronwall C., Silverman G.J. Natural IgM: Beneficial autoantibodies for the control of inflammatory and autoimmune disease? // *J Clin Immunol.* 2014. Т. 34. № 0-1. С. 12-21.
156. Gronwall C., Vas J., Silverman G.J. Protective roles of natural IgM antibodies // *Front Immunol.* 2012. № 3. С. 66.
157. Gross U. и др. Comparative Immunoglobulin G Antibody Profiles between Mother and Child (CGMC Test) for Early Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis // *J Clin Microbiol.* 2000. Т. 38. № 10. С. 3619-3622.

158. Grover M., Kashyap P.C. Germ free mice as a model to study effect of gut microbiota on host physiology // *Neurogastroenterol Motil.* 2014. Т. 26. № 6. С. 745-48.
159. Grutzkau A. и др. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria // *Gut.* 1990. Т. 31. № 9. С. 1011-1015.
160. Guan hao B. и др. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review // *Dairy Sci Technol.* 2013. Т. 93. № 3. С. 211-223.
161. Guilmont A. и др. Natural killer cell responses to infections in early life // *J Innate Immun.* 2011. Т. 3. № 3. С. 280-8.
162. Haider S.A. Serum IgM in Diagnosis of Infection in the Newborn // *Arch Dis Child.* 1972. Т. 47. № 253. С. 382-393.
163. Hakomori S.I., Cummings R.D. Glycosylation effects on cancer development // *Glycoconj J.* 2012. Т. 29. № 8-9. С. 565-6.
164. Hakomori S. Tumor-associated carbohydrate antigens // *Ann. Rev. Immunol.* 1984. Т. 2. С. 103-126.
165. Halcken S. и др. Comparison of a partially hydrolyzed infant formula with two extensively hydrolyzed formulas for allergy prevention: a prospective, randomized study // *Pediatr Allergy Immunol.* 2000. Т. 11. № 3. С. 149-61.
166. Hall A.B., Tolonen A.C., Xavier R.J. Human genetic variation and the gut microbiome in disease // *Nat Rev Genet.* 2017. Т. 18. № 11. С. 690-699.
167. Hanson L.A., Soderstrom T. Human milk: Defense against infection // *Prog Clin Biol Res.* 1981. Т. 61. С. 147-59.
168. Hanson L.A., Winberg J. Breast milk and defence against infection in the newborn // *Arch Dis Child.* 1972. Т. 47. № 256. С. 845-848.
169. Hardy R.R. B-1 B Cell Development // *J Immunol.* 2006. Т. 177. № 5. С. 2749-2754.
170. Hardy R.R., Hayakawa K. Perspectives on fetal-derived CD5⁺ B1 B cells // *Eur J Immunol.* 2015. Т. 45. № 11. С. 2978-2984.
171. Harris R. Infectious diseases, the ABO blood groups and human evolution // *Eugen Rev.* 1963. Т. 54. № 4. С. 201-204.
172. Hayashi S., и др. The neutralization of pseudorabies virus by anti-alpha-galactosyl natural antibody in normal serum // *Virus Res.* 2004. Т. 99. № 1. С. 1-7.
173. Hendricks J. и др. Class-switched marginal zone B cells in spleen have relatively low numbers of somatic mutations // *Mol Immunol.* 2011. Т. 48. № 6-7. С. 874-82.

174. Hendricks J., Bos M.A., Kroese F.G.M. Heterogeneity of Memory Marginal Zone B Cells // *Crit Rev Immunol*. 2018. T. 38. № 2. C. 145-158.
175. Hernandez A.M., Holodick N.E. Editorial: Natural Antibodies in Health and Disease // *Front Immunol*. 2017. T. 8. C. 1795.
176. Hibel L.C., Schitz H. Maternal and Infant Secretory Immunoglobulin A across the Peripartum Period // *J Hum Lact*. 2016. T. 32. № 3. C. 44-51.
177. Hirpara K.B., Patel H.G., Prajapati J.P. Standardization of rate of sugar addition for the manufacture of *Thabdi* // *J Food Sci Technol*. 2015. T. 52. № 2. C. 1152-1157.
178. Hochwallner H. и др. Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention // *Methods*. 2014. T. 66. № 1. C. 22-33.
179. Hochwallner H. и др. Infant milk formulas differ regarding their allergenic activity and induction of T-cell and cytokine responses // *Allergy*. 2017. T. 72. № 3. C. 416-424.
180. Hoffman W., Lakkis F.G., Chalasani M. B Cells, Antibodies, and More // *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016. T. 7. № 1. C. 137-154.
181. Hoja-Łukowicz D. и др. L1CAM from human melanoma carries a novel type of N-glycan with Gal β 1-4Gal β 1-motif. Involvement of N-linked glycans in migratory and invasive behavior of melanoma cells // *Glycoconj J*. 2013. T. 30. № 3. C. 205-25.
182. Holodick N.E., Rodriguez-Zhurbenko N., Hernandez A.M. Defining Natural Antibodies. // *Front.Immunol*. 2017. №8. C. 872.
183. Hong M., Bertolotti A. Tolerance and immunity to pathogens in early life: insights from HBV infection // *Semin Immunopathol*. 2017. T. 39. № 6. C. 643-652.
184. Hong S.J. Types of Special Infant Formulas Marketed in Korea and Their Indications // *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2018. T. 21. № 3. C. 155-162.
185. Hooper L.V. и др. A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999. T. 96. № 17. C. 9833-8.
186. Hooper L.V., Littman D.R., Macpherson A.J. Interactions between the microbiota and the immune system // *Science*. 2012. T. 336. № 6086. C. 1268-1273.
187. Horm T.M., Schroeder J.A. MUC1 and metastatic cancer Expression, function and therapeutic targeting // *Cell Adh Migr*. 2013. T. 7. № 2. C. 187-198.
188. Horwitz A., Kung S.J., McGeady S.J. Infants with low immunoglobulin levels: Isolated low IgA level vs other immunoglobulin abnormalities // *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010. T. 105. № 4. C. 295-8.

189. Hou P. и др. B Cell Antigen Receptor Signaling and Internalization Are Mutually Exclusive Events // *PLoS Biol.* 2006. Т. 4. № 7. С. 200.
190. Houghteling P.D., Walker W.A. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to the infant's and child's health? // *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015. Т. 60. № 3. С. 294-307.
191. Hrnecir T. и др. Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: studies in germ-free mice // *BMC Immunol.* 2008. Т. 9. С. 65.
192. Hugenholtz F., Vos W.M. Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation // *Cell Mol Life Sci.* 2018. Т. 75. № 1. С. 149-160.
193. Hurley W.L., Theil P.K. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk // *Nutrients.* 2011. Т. 3. № 4. С. 442-474.
194. Inman C.F. и др. Rearing environment affects development of the immune system in neonates // *Clin Exp Immunol.* 2010. Т. 160. № 3. С. 431-439.
195. Ismail N.A. и др. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults // *Arch Med Sci.* 2011. Т. 7. № 3. С. 501-507.
196. Iyengar L., Selvaray R.J. Intestinal Absorption of Immunoglobulins by Newborn Infants // 1972. Т. 47. № 253. С. 411-414.
197. Jackson K.M., Nazar A.M. Breastfeeding, the immune response, and long-term health // *J Am Osteopath Assoc.* 2006. Т. 106. № 4. С. 203-7.
198. Jakatis B.M., Denning P.W. Human Breast Milk and the Gastrointestinal Innate Immune System // *Clin Perinatol.* 2014. Т. 41. № 2. С. 423-35.
199. Janatpour K.A. и др. Clinical outcomes of ABO-incompatible RBC transfusions // *Am J Clin Pathol.* 2008. Т. 129. № 2. С. 276-281.
200. Janeway C.A. и др. Immune recognition and effector function in subsets of CD4 T cells // *Princess Takamatsu Symp.* 1988. Т. 19. С. 193-208.
201. Jang M.H. и др. Intestinal villous M cells: An antigen entry site in the mucosal epithelium // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004. Т. 101. № 16. С. 6110-6115.
202. Jantscher-Krenn E., Bode L. Human milk oligosaccharides and their potential benefits for the breast-fed neonate // *Minerva Pediatr.* 2012. Т. 64. № 1. С. 83-99.
203. Jayasekera J.P., Moseman E.A., Carroll M.C. Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity // *J Virol.* 2007. Т. 81. № 7. С. 3487-94.

204. Johansson M.E., Larsson J.M., Hansson G.C. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011. T. 108. C. 4659-65.
205. John J.A., Draper N.R. An alternative family of transformations // *Appl. Stat.* 1980. T. 29. C. 190-197.
206. Johnson J.L. и др. The Regulatory Power of Glycans and their Binding Partners in Immunity // *Trends Immunol.* 2013. T. 34. № 6. C. 290-298.
207. Jones M. The Influence of the Gut Microbiota on Host Physiology: In Pursuit of Mechanisms // *Yale J Biol Med.* 2016. T. 89. № 3. C. 285-297.
208. Jounai N. и др. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination // *Front Cell Infect Microbiol.* 2012. T. 2. C. 168.
209. Kailemia M. J., Park D., Lebrilla C.B. Glycans and Glycoproteins as Specific Biomarkers for Cancer // *Anal Bioanal Chem.* 2017. T. 409. № 2. C. 395-410.
210. Kalish R.S. Antigen processing: the gateway to the immune response // *J Am Acad Dermatol.* 1995. T. 32. № 4. C. 640-652.
211. Kaminski D.A., Stavnezer J. Enhanced IgA Class Switching in Marginal Zone and B1 B Cells Relative to Follicular/B2 B Cells // *J Immunol.* 2006. № 177. C. 6025-6029.
212. Kampmann B., Jones C.E. Factors influencing innate immunity and vaccine responses in infancy // *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci.* 2015. T. 370. № 1671. C. 20140148.
213. Kankkunen P. и др. (1,3)- β -Glucans Activate Both Dectin-1 and NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages // *J Immunol.* 2010. T. 184. № 11. C. 6335-6342.
214. Katayama M., Specian R.D., Deitch E.A. Role of bacterial adherence and the mucus barrier on bacterial translocation: effects of protein malnutrition and endotoxin in rats // *Ann Surg.* 1997. T. 225. № 3. C. 317-326.
215. Kelly D., Coutts A.G. Early nutrition and the development of immune function in the neonate // *Proc Nutr Soc.* 2000. T. 59. № 2. C. 177-85.
216. Kelsoe G., Haynes R. What Are the Primary Limitations in B-Cell Affinity Maturation, and How Much Affinity Maturation Can We Drive with Vaccination? Breaking through Immunity's Glass Ceiling // *Old Spring Harb Perspect Biol.* 2018. T. 10. № 15. C. 029397.

217. Kennedy E.A., King K.Y., Baldrige M.T. Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria // *Front Physiol.* 2018. Т. 9. С. 1534.
218. Kim H-H. и др. Galactooligosaccharide and Sialyllactose Content in Commercial Lactose Powders from Goat and Cow Milk // *Korean J Food Sci Anim Resour* // 2015. Т. 35. № 4. С. 572-576.
219. Kinnebrew M.A., Pamer E.G. Innate immune signaling in defense against intestinal microbes // *Immunol Rev.* 2012. Т. 245. № 1. С. 113-31.
220. Kitaoka M. Bifidobacterial Enzymes Involved in the Metabolism of Human Milk Oligosaccharides // *Adv Nutr.* 2012. Т. 3. № 3. С. 422-429.
221. Knirel Y.A., и др. Human tandem-repeat-type galectins bind bacterial non- β Gal polysaccharides // *Glycoconj. J.* 2014. Т. 31. С. 7-12.
222. Kobata A. Structures and application of oligosaccharides in human milk // *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010. Т. 86. № 7. С. 731-747.
223. Koch M. и др. Maternal IgG and IgA antibodies dampen mucosal T helper cell responses in early life // *Cell.* 2016. Т. 165. № 4. С. 827-841.
224. Kollman T.R. и др. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny // *Immunity.* 2017. Т. 46. № 3. С. 350-363.
225. Korpela K., Vos W.M. Early life colonization of the human gut: microbes matter everywhere // *Front Immunol.* 2018. Т. 44. С. 70-78.
226. Kraft J.D. и др. Neonatal macrophages express elevated levels of interleukin-27 that oppose immune responses // *Immunology.* 2013. Т. 139. №. 4. С. 484-493.
227. Kretschmer K. и др. The selection of marginal zone B cells differs from that of B-1a cells // *J Immunol.* 2003. Т. 171. № 12. С. 6495-501.
228. Kumar S.K., Bhat B.V. Distinct mechanisms of the newborn innate immunity // *Immunol Lett.* 2016. Т. 173. С. 42-54.
229. Laforest-Lapoint I., Arrieta M-C. Patterns of Early-Life Gut Microbial Colonization during Human Immune Development: An Ecological Perspective // *Front Immunol.* 2017. Т. 8. № 788.
230. Lagier J-C. и др. Human Gut Microbiota: Repertoire and Variations // *Front Cell Infect Microbiol.* 2012. Т. 2. № 136.
231. Laucirica D.R. и др. Milk Oligosaccharides Inhibit Human Rotavirus Infectivity in MA104 Cells // *J Nutr.* 2017. Т. 147. № 9. С. 1709-1714.

232. Leoz M.L. и др. Lacto N Tetraose, Fucosylation, and Secretor Status are Highly Variable in Human Milk Oligosaccharides From Women Delivering Preterm // *J Proteome Res.* 2012. Т. 11. № 9. С. 4662-4672.
233. Lesinsky G.B., Westerink M.A. Novel vaccine strategies to T-independent antigens // *J Microbiol Methods.* 2001. Т 47. № 2. С. 135-49.
234. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates // *Nat Rev Immunol.* 2007. Т. 7. № 5. С. 279-90.
235. Levy O., Wynn J.L. A Prime Time for Trained Immunity: Innate Immune Memory in Newborns & Infants // *Neonatology.* 2014. Т. 105. № 2. С. 136-141.
236. Li H., Manwani B., Leng S.X. Frailty, inflammation, and immunity // *Aging Dis.* 2011. Т. 2. № 6. С. 466-473.
237. Li M. и др. Microbial Composition and In Vitro Fermentation Patterns of Human Milk Oligosaccharides and Prebiotics Differ between Formula-Fed and Sow-Reared Piglets // *J Nutr.* 2012. Т. 142. № 4. С. 681-689.
238. Li W.M., Bally B.M., Schutze-Redelmeier M.P. Enhanced immune response to T-independent antigen by using CpG oligodeoxynucleotides encapsulated in liposomes // *Vaccine.* 2001. Т. 20. № 1-2. С. 148-57.
239. Li Y., Li H., Weigert M. Autoreactive B Cells in the Marginal Zone that Express Dual Receptors // *J Exp Med.* 2002. Т. 195. № 2. С. 181-188.
240. Lin L.I. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility // *Biometrics.* 1989. Т. 45. № 1. С. 255-68.
241. Liu B., Newburg D.S. Human Milk Glycoproteins Protect Infants Against Human Pathogens // *Breastfeed Med.* 2013. Т. 8. № 4. С. 354-362.
242. Lloyd-Price J., Abu-Ali G., Huttenhower C. The healthy human microbiome // *Genome Med.* 2016. Т. 8. № 51.
243. Lobo P.I. Role of Natural Autoantibodies and Natural IgM Anti-Leucocyte Autoantibodies in Health and Disease // *Front Immunol.* 2016. Т. 7. С. 198.
244. Lopez C., Cauty C., Guyomarc'h F. Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: role of technological processes and potential impacts // *Dairy Sci Technol.* 2015. Т. 95. С. 863-893.
245. Lopez P. и др. Th17 responses and natural IgM antibodies are related to gut microbiota composition in systemic lupus erythematosus patients // *Sci Rep.* 2016. Т. 6. С. 24072.

246. Lopez-Carvalho T., Kearney J.F. Development and selection of marginal zone B cells // *Immunol Rev.* 2004. T. 197. C. 192-205.
247. Lu L., Walker W.A. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium // *Am J Clin Nutr.* 2001. T. 73. C. 1124-1130.
248. Lutz H.U. Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: An overview // *Journal of Autoimmunity.* 2007. № 29. C. 287-294.
249. Lutz H.U. Naturally Occurring Antibodies (NABs). *Advances in Experimental Medicine and Biology* 750. Springer Science & Business Media. 2012. 267 с.
250. Mabbott N.A. и др. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium // *Mucosal Immunol.* 2013. T. 6. № 4. C. 666-677.
251. MacGillivray D.M., Kollman T.R. The Role of Environmental Factors in Modulating Immune Responses in Early Life // *Front Immunol.* 2014. T. 5. C. 434.
252. Macrobal A. и др. Consumption of Human Milk Oligosaccharides by Gut-related Microbes // *J Agric Food Chem.* 2010. T. 58. № 9. C. 534-5340.
253. Macrobal A., Sonnenburg J.L. Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota // *Clin Microbiol Infect.* 2012. T. 18. № 4. C. 12-15.
254. Maddux A.B., Douglas I.S. Is the developmentally immature immune response in paediatric sepsis a recapitulation of immune tolerance? // *Immunology.* 2015. T. 145. № 1. C. 1-10.
255. Maki R. и др. Immunoglobulin gene rearrangement in immature B cells // *Science.* 1980. № 209. C. 1366-9.
256. Malhotra A., и др. B Cell Antigen Receptor Endocytosis and Antigen Presentation to T Cells Require Vav and Dynamin // *J Biol Chem.* 2009. T 284. № 36. C. 24088-24097.
257. Mandar R., Mikelsaar M. Transmission of mother's microflora to the newborn at birth // *Biol Neonate.* 1996. T. 69. № 1. C. 30-5.
258. Maranduba C.M. и др. Intestinal Microbiota as Modulators of the Immune System and Neuroimmune System: Impact on the Host Health and Homeostasis // *J Immunol Res.* 2015. T. 931574.
259. Marchant A., Kollman T.R. Understanding the Ontogeny of the Immune System to Promote Immune-Mediated Health for Life // *Front Immunol.* 2015. T. 6. C. 77.
260. Marchini G. и др. The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa // *Br J Dermatol.* 2002. T. 147. № 6. C. 1127-34.

261. Mariat D. и др. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age // *BMC Microbiol.* 2009. Т. 9. № 123.
262. Marodi L. Innate cellular immune responses in newborns // *Clin Immunol.* 2006. Т. 118. № 2-3. С. 137-44.
263. Martin C.R., Ling P-R., Blackburn G.L. Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula // *Nutrients.* 2016. Т. 8. № 5. С. 279.
264. Martin F., Oliver A.M., Kearney J.F. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens // *Immunity.* 2001. Т. 14. № 5. С. 617-629.
265. Martin-Sosa S. и др. Sialyloligosaccharides in human and bovine milk and in infant formulas: variations with the progression of lactation // *J Dairy Sci.* 2003. Т. 86. № 1. С. 52-9.
266. Maxton R.T. и др. The role of the mucus gel layer in intestinal bacterial translocation // *J Surg Res.* 1994. Т. 57. № 6. С. 682-6.
267. Maynard C.L. и др. Reciprocal Interactions of the Intestinal Microbiota and Immune System // *Nature.* 2015. Т. 489. № 7415. С. 231-241.
268. McGhee J.R., Fujihashi K. Inside the Mucosal Immune System // *PLoS Biol.* 2012. Т. 10. № 9. С. 1001397.
269. McGuire M.K. и др. What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically // *Am J Clin Nutr.* 2017. Т. 105. № 5. С. 1086-1100.
270. McVeagh P., Miller J.B. Human milk oligosaccharides: only the breast // *J paediatr Child Health.* 1997. Т. 33. № 4. С. 281-6.
271. Meager A. и др. Anti-cytokine autoantibodies in autoimmunity: preponderance of neutralizing autoantibodies against interferon-alpha, interferon-omega and interleukin-12 in patients with thymoma and/or myasthenia gravis // *Clin Exp Immunol.* 2003. Т. 132. № 1. С. 128-136.
272. Melville J.M., Moss T.J.M. The immune consequences of preterm birth // *Front Neurosci.* 2013. Т. 7. С. 79.
273. Meyer M.P., Malan A.F. Total IgM levels at birth and in early infancy // *Ann Trop Paediatr.* 1993. Т. 13. № 1. С. 87-9.
274. Michalski C., Kan B., Lavoie P.M. Antifungal Immunological Defenses in Newborns // *Front Immunol.* 2017. Т. 8. С. 281.

275. Milani C. и др. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota // *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017. Т. 81. № 4. С. 36-47.
276. Milland J., Sandrin M.S. ABO blood group and related antigens, natural antibodies and transplantation // *Tissue Antigens.* 2006. Т. 68, № 8. С. 459-66.
277. Mishra A.K., Mariuzza R.A. Insights into the Structural Basis of Antibody Affinity Maturation from Next-Generation Sequencing // *Front Immunol.* 2018. Т. 1. № 9. С. 117.
278. Moeller A.H., Ochman H. Factors that drive variation among gut microbial communities // *Gut Microbes.* 2013. Т. 4. № 5. С. 403-408.
279. Mogensen T.H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses // *Clin Microbiol Rev.* 2009. Т. 22. № 2. С. 240-273.
280. Moll M., Kauffman A., Maisner A. Influence of N-Glycans on Processing and Biological Activity of the Nipah Virus Fusion Protein // *J Virol.* 2004. Т. 78. № 13. С. 7274-7278.
281. Mongini P.K. и др. Innate immunity and human B cell clonal expansion: effects on the recirculating B2 subpopulation // *J Immunol.* 2005. Т. 175. № 9. С. 6143-54.
282. Montecino-Rodriguez M., Berent-Maoz B., Dorshkind K. Causes, consequences, and reversal of immune system aging // *J Clin Invest.* 2013. Т. 123. № 3. С. 958-965.
283. Moormann A.M. How might infant and paediatric immune responses influence malaria vaccine efficacy? // *Parasite immunol.* 2009. Т. 31. № 9. С. 547-559.
284. Morozov V. и др. Human Milk Oligosaccharides as Promising Antivirals // *Mol Nutr Food Res.* 2018. Т. 62. № 6. С. 1700679.
285. Mouthon L., Lacroix-Desmazes S, Nobrega A, Barreau C, Coutinho A, and Kazatchkine MD. The self-reactive antibody repertoire of normal human serum IgM is acquired in early childhood and remains conserved throughout life // *Scand J Immunol.* 1996; 44(3):243-51.
286. Mudd A.T. и др. Porcine Milk Oligosaccharides and Sialic Acid Concentrations Vary Throughout Lactation // *Front Nutr.* 2016. Т. 8. № 3. С. 39.
287. Mueller N.T. и др. The infant microbiome development: mom matters // *Trends Mol Med.* 2015. Т. 21. № 2. С. 109-117.
288. Munger E. и др. Reciprocal Interactions between Gut Microbiota and Host Social Behavior // *Front Integr Neurosci.* 2018. Т. 12. № 21.
289. Munkley J., Elliott D.J. Hallmarks of glycosylation in cancer // *Oncotarget.* 2016. Т. 7. № 23. С. 25478-35489.

290. Myhill L.J. и др. Mucosal Barrier and Th2 Immune Responses Are Enhanced by Dietary Inulin in Pigs Infected With *Trichuris suis* // *Front Immunol.* 2018. Т. 9. С. 2557.
291. Nagele E.P. и др. Natural IgG Autoantibodies Are Abundant and Ubiquitous in Human Sera, and Their Number Is Influenced By Age, Gender, and Disease // *PLoS One.* 2013. Т. 8. № 4. С. 60726.
292. Nagendran V., Emmanuel N., Bansal A.S. Does the Maternal Serum IgG Level during Pregnancy in Primary Antibody Deficiency Influence the IgG Level in the Newborn? // *Case Reports Immunol.* 2015. Т. 286380.
293. Naikawa A. и др. A case of ABO-incompatible blood transfusion treated by plasma exchange therapy and continuous hemodiafiltration // *CEN Case Rep.* 2018. Т. 7. № 1. С. 114-120.
294. Nakano T., Sugawara M., Kawakami H. Sialic acid in human milk: composition and functions // *Acta Paediatr Taiwan.* 2001. Т. 42. № 1. С. 11-7.
295. Narula G. и др. Age-related reference intervals for immunoglobulin levels and lymphocyte subsets in Indian children // *Indian J Pathol Microbiol.* 2017. Т. 60. № 3. С. 360-364.
296. Nath S., Mukherjee P. Muc1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression // *Trends Mol Med.* 2014. Т. 20. № 6. С. 332-342.
297. Navin T.R., Krug E.C., Pearson R.D. Effect of immunoglobulin M from normal human serum on *Leishmania donovani* promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes // *Infect. Immun.* 1989. Т. 57. № 4. С. 1343-6.
298. Neu J., Rushing J. Cesarean versus Vaginal Delivery: Long term infant outcomes and the Hygiene Hypothesis // *Clin Perinatol.* 2011. Т. 38. № 2. С. 321-331.
299. New J.S., King R.G., Kearney J.F. Manipulation of the Glycan-Specific Natural Antibody Repertoire for Immunotherapy // *Immunol Rev.* 2016. Т. 270. № 1. С. 32-50.
300. Niers L. и др. Nutritional support for the infant's immune system // *NutrRev.* 2007. Т. 65. № 8. С. 347-60.
301. Niewiesk S. Maternal Antibodies: Clinical Significance, Mechanism of Interference with Immune Responses, and Possible Vaccination Strategies // *Front Immunol.* 2014. Т. 5. С. 446.
302. Nochi T., Kiyono H. Innate immunity in the mucosal immune system // *Curr Pharm Des.* 2006. Т. 12. № 32. С. 4203-13.

303. Obukhanych T.V., Nussenzweig M.C. T-independent type II immune responses generate memory B cells // *J Exp Med*. 2006. Т. 203. № 2. С. 305-310.
304. Ochsenbein A.F., Zinkernagel R.M. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity // *Immunol Today*. 2000. Т. 21. № 12. С. 624-30.
305. Ochsenbein A.T. и др. Control of Early Viral and Bacterial Distribution and Disease by Natural Antibodies // *Science*. 1999. № 286. С. 2156-59.
306. Oddy W.H. Breastfeeding protects against illness and infection in infants and children: a review of the evidence // *Breastfeed Rev*. 2001. Т. 9. № 2. С. 11-8.
307. Ohno H. Intestinal M cells // *J Biochem*. 2016. Т. 159. № 2. С. 151-160.
308. Ohtsubo K., Marth J.D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease // *Cell*. 2006. Т. 126. № 5. С. 855-867.
309. Olin A. и др. Stereotypic Immune System Development in Newborn Children // *Cell*. 2018. Т. 174. №. 54. С. 1277-1292.
310. Ollila J., Vihinen M. B cells // *Int J Biochem Cell Biol*. 2005. Т. 37. № 3. С. 518.
311. Oyelaran O. и др. Profiling Human Serum Antibodies with a Carbohydrate Antigen Microarray // *J Proteome Res*. 2009. Т. 8. С. 4301-4310.
312. Ozcan E., Sela D.A. Inefficient Metabolism of the Human Milk Oligosaccharides Lacto-N-tetraose and Lacto-N-neotetraose Shifts *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Physiology // *Front Nutr*. 2018. Т. 5. № 46.
313. Ozdemir A. и др. Reference values of serum IgG and IgM levels in preterm and term newborns // *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016. Т. 29. № 6. С. 972-6.
314. Padler-Karavani V., и др. Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: potential implications for disease // *Glycobiology*. 2008. Е. 18. № 10. С. 818-30.
315. Pagliari D., и др. The Intricate Link among Gut “Immunological Niche,” Microbiota, and Xenobiotics in Intestinal Pathology // *MediatorsInflamm*. 2017. С. 8390-8395.
316. Panda S. и др. Natural IgG antibodies provide innate protection against ficolin-opsynized bacteria // *EMBOJ*. 2013. Т. 32. № 22. С. 2905-2919.
317. Panda S., Ding J.L. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity // *J Immunol*. 2015. Т. 194. № 1. С. 13-20.
318. Panigrahi P. и др. Long-term Colonization of a *Lactobacillus plantarum* Synbiotic Preparation in the Neonatal Gut // *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2008. Т. 47. С. 45-53.

319. Pannaraj P.S. и др. Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome // *JAMA Pediatr.* 2017. Т. 171. № 7. С. 647-654.
320. Parmeira P. и др. IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies // *Clin Dev Immunol.* 2012. Т. 985646.
321. Parra D., Takizawa F., Sunyer J.O. Evolution of B Cell Immunity // *Annu Rev Anim Biosci.* 2013. №1. С. 65-97.
322. Parthasarathy N. и др. Application of carbohydrate microarray technology for the detection of *Burkholderia pseudomallei*, *Bacillus anthracis* and *Francisella tularensis* antibodies // *Carbohydrate Research.* 2008. Т. 343. С. 2783-2788.
323. Patel P., Kearney J.F. Immunological Outcomes of Antibody Binding to Glycans Shared Between Microorganisms and Mammals // *J Immunol.* 2016. Т. 197. № 11. С. 4201-4209.
324. Pelanda R., Torres R.M. Central B-Cell Tolerance: Where Selection Begins // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012. Т. 4. № 4. С. 007146.
325. Perre V. Transfer of antibody via mother's milk // *Vaccine.* 2003. Т. 21. № 24. С. 3374-6.
326. Petrova G., Ferrante A., Gorski J. Cross-reactivity of T cells and its role in the immune system // *Crit Rev Immunol.* 2012. Т. 32. № 4. С. 349-72.
327. Phillips M.L. Gut Reaction: Environmental Effects on the Human Microbiota // *Environ Health Perspect.* 2009. Т. 117. № 5. С. 198-205.
328. Piccard M., и др. Neonatal Immune Tolerance Induction to Allow Long-Term Studies With an Immunogenic Therapeutic Monoclonal Antibody in Mice // *AAPS J.* 2016. Т. 18. № 2. С. 354-61.
329. Pickard J.M. Chervonsky A.V. Intestinal fucose as a mediator of host-microbe symbiosis // *J Immunol.* 2015. Т. 194. № 12. С. 5588-5593.
330. Pilgrim U. и др. Normal values of immunoglobulins in premature and in full-term infants, calculated as percentiles // *Helv Paediatr Acta.* 1975. Т. 30. № 2. С. 121-134.
331. Pillai S., Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision // *Nat Rev immunol.* 2009. Т. 9. № 11. С. 767-77.
332. Pillai S., Cariappa A., Moran S.T. Marginal zone B cells // *Ann Rev Immunol.* 2005. Т. 23. С. 161-196.
333. Pina-Perez M.C., Martinez A., Rodrigo D. New Advances in Infant Feeding: New Products and Novel Technologies // *Recent Pat Food Agric.* 2017. Т. 8. № 3. С. 152-165.

334. Pineda-Martinez S. и др. Immunoglobulin Concentrations in Plasma and Saliva During the Neonatal Period // *Pediatr Neonatol*. 2016. Т. 57. № 3. С. 213-218.
335. Plaza-Diaz J., Fontana L., Gil A. Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development // *Nutrients*. 2018. Т. 10. № 8.
336. Poletaev A., Boura P. The immune system, natural autoantibodies and general homeostasis in health and disease // *Hippokratia*. 2011. Т. 15. № 4. С. 295-298.
337. Polonskaya Z. и др. T cells control the generation of nanomolar-affinity anti-glycan antibodies // *J Clin Invest*. 2017. Т. 127. № 4. С. 1491-1504.
338. Popa I., Ganea E., Petrescu S.M. Expression and subcellular localization of RAGE in melanoma cells // *Biochem Cell Biol*. 2014. Т. 92. № 2. С. 127-136.
339. Predergast J.M. и др. Novel anti-Sialyl-Tn monoclonal antibodies and antibody-drug conjugates demonstrate tumor specificity and anti-tumor activity // *Mabs*. 2017. Т. 9. № 4. С. 615-627.
340. Prescott S.L. Early Nutrition as a Major Determinant of 'Immune Health': Implications for Allergy, Obesity and Other Noncommunicable Diseases // *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*. 2016. Т. 85. С. 1-17.
341. Quercia S. и др. From lifetime to evolution: timescales of human gut microbiota adaptation // *Front Microbiol*. 2014. Т. 5. № 587.
342. Rabinovich G.A., Kooyk Y., Cobb B.A. Glycobiology of immune responses // *Ann NY Acad Sci*. 2012. Т. 1253. С. 1-15.
343. Racine R., Winslow G.M. IgM in Microbial Infections: Taken for Granted // *Immunol Lett*. 2009. Т. 125. № 2. С. 79–85.
344. Rahyab A.S. и др. Natural antibody - Biochemistry and functions // *Glob JBiochem*. 2011. Т. 2. № 4. С. 283-288.
345. Rai T., Wu X., Shen B. Frequency and risk factors of low immunoglobulin levels in patients with inflammatory bowel disease // *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2015. Т. 3. № 2. С. 115-121.
346. Rasche L. и др. The Natural Human IgM Antibody PAT-SM6 Induces Apoptosis in Primary Human Multiple Myeloma Cells by Targeting Heat Shock Protein GRP78 // *PLoS One*. 2013. Т. 8. № 5. С. 63414.
347. Ravivarma K.R. и др. Immunoglobulins in newborns: differential study of premature and full term infants // *J Postgrad Med*. 1979. Т. 25. № 2. С. 97-101.
348. Razavi A. и др. Comparative Immune Response in Children and Adults with *H. pylori* Infection // *J Immunol Res*. 2015. Т. 315957.

349. Reen D.J., Puri P. Significance of elevated IgA antibody levels in neonates with gastrointestinal conditions // *J Pediatr Surg*. 1983. Т. 18. № 1. С. 85-8.
350. Rios D. и др. Antigen sampling by intestinal M cells is the principal pathway initiating mucosal IgA production to commensal enteric bacteria // *Mucosal Immunol*. 2016. Т. 9. № 4. С. 907-16.
351. Rivera A. и др. Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity // *Nat Immunol*. 2016. Т. 17. № 4. С. 356-363.
352. Rodriguez J.M. и др. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life // *Microb Ecol Health Dis*. 2015. Т. 26.
353. Rogosch T. и др. IgA response in preterm neonates shows little evidence of antigen-driven selection // *J Immunol*. 2012. Т. 189. № 11. С. 5449-5456.
354. Romo M.R., Perez-Martinez D., Ferrer C.C. Innate immunity in vertebrates: an overview // *Immunology*. 2016. Т. 148. № 2. С. 125-139.
355. Ronda N. и др. Analysis of natural and disease-associated autoantibody repertoires: anti-endothelial cell IgG autoantibody activity in the serum of healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus // *Int. Immunol*. 1994. Т. 6. № 11. С. 1651-60.
356. Rooks M.G., Garrett W.S. Gut microbiota, metabolites and host immunity // *Nat Rev Immunol*. 2016. Т. 16. № 6. С. 341-352.
357. Rossen L.M., Simon A.E., Herrick K.A. Types of Infant Formulas Consumed in the United States // *Clin Pediatr (Phila)*. 2016. Т. 55. № 3. С. 278-285.
358. Rothstein T.L. Natural Antibodies as Rheostats for Susceptibility to Chronic Diseases in the Aged // *Front Immunol*. 2016. № 7. С. 127.
359. Rouch J.D. и др. Development of Functional Microfold (M) Cells from Intestinal Stem Cells in Primary Human Enteroids // *PLoS One*. 2016. Т. 11. № 1. С. 0148216.
360. Rowley B. и др. Autoreactive B-1 B Cells: Constraints on Natural Autoantibody B Cell Antigen Receptors // *J. Autoimmune*. 2007. Т. 29. № 4. С. 236-245.
361. Ruiz-Palacios G.M. и др. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection // *J Biol Chem*. 2003. Т. 278. № 16. С. 14112-20.
362. Ryan A.S., Hay W.W. Jr. Challenges of infant nutrition research: a commentary // *Nutr J*. 2016. Т. 15. С. 42.
363. Sakhon O.S. и др. M cell-derived vesicles suggest a unique pathway for trans-epithelial antigen delivery // *Tissue Barriers*. 2015. Т. 3. № 1-2. С. 1004975.

364. Sandberg K. и др. Preterm infants with low immunoglobulin G levels have increased risk of neonatal sepsis but do not benefit from prophylactic immunoglobulin G // *J Pediatr*. 2000. Т. 135. № 5. С. 623-8.
365. Sarker S.A., Gyr K. Non-immunological defence mechanisms of the gut // *Gut*. 1992. Т. 33. № 7. С. 987-993.
366. Saso A., Kampmann B. Vaccine responses in newborns // *Semin Immunopathol*. 2017. Т. 39. № 6. С. 627-642.
367. Savilahti E., Jarvenpaa A.L., Raiha N.C. Serum immunoglobulins in preterm infants: comparison of human milk and formula feeding // *Pediatrics*. 1983. Т. 72. № 3. С. 312-316.
368. Schachner M., Martini R. Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function // *Trends Neurosci*. 1995. Т. 18. № 4. С. 183-91.
369. Scharschmidt T.C. Establishing tolerance to commensal skin bacteria: timing is everything // *Dermatol Clin*. 2017. Т. 35. № 1. С. 1-9.
370. Schnaar R.L. Glycans and glycan binding proteins in immune regulation: A concise introduction to glycobiology for the allergist // *J Allergy Clin Immunol*. 2015. Т. 153. № 3. С. 609-615.
371. Schnaar R.L. Glycobiology simplified: diverse roles of glycan recognition in inflammation // *J Leukoc Biol*. 2016. Т. 99. № 6. С. 825-838.
372. Schneider P. и др. Maturation of Marginal Zone and Follicular B Cells Requires B Cell Activating Factor of the Tumor Necrosis Factor Family and Is Independent of B Cell Maturation Antigen // *JEM*. 2001. Т. 194. № 11. С. 1691.
373. Schwartzman J.A., Ruby E.G. Stress as a Normal Cue in the Symbiotic Environment // *Trends Microbiol*. 2016. Т. 24. № 5. С. 414-424.
374. Sela D. Bifidobacterial utilization of human milk oligosaccharides // *Int J FoodMicrobiol*. 2011. Т. 149. № 1. С. 58-64.
375. Selber-Hnatiw S. и др. Human Gut Microbiota: Toward an Ecology of Disease // *FrontMicrobiol*. 2017. Т. 8. № 1265.
376. Selvamuthukumar M., Muthukumar S., Shukla S.S. Bifidus milk powder: processing parameter standardization and shelf stability evaluation // *J Food Sci Technol*. 2016. Т. 53. № 4. С. 2054-2060.
377. Seppo A.E. и др. Human milk oligosaccharides and development of cow's milk allergy in infants // *J Allergy Clin Immunol*. 2017. Т. 139. № 2. С. 708-711.

378. Sharma A. и др. The developing human preterm neonatal immune system: A case for more research in this area // *Clin Immunol.* 2012. Т. 145. № 1. С. 61-68.
379. Sharma S., Lal H., Saigal R.K. Immunoglobulins IgG, IgM and IgA levels in preterm and small for date newborns // *Indian Pediatr.* 1991. Т. 28. № 7. С. 741-4.
380. Shaw P.X. и др. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity // *J Clin invest.* 2000. Т. 105. № 12. С. 1731-1740.
381. Sheehan J.K., Kesimer M., Pickles R. Innate immunity and mucus structure and function // *Novartis Found Symp.* 2006. № 279. С. 155-66.
382. Shen C. и др. Development of serum antibodies during early infancy in rhesus macaques: implications for humoral immune responses to vaccination at birth // *Vaccine.* 2014. Т. 32. № 41. С. 5337-5342.
383. Shi N. и др. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system // *Mil Med Res.* 2017. Т. 4. № 14.
384. Shreiner A.B., Kao J.Y., Young V.B. The gut microbiome in health and in disease // *Curr opin Gastroenterol.* 2015. Т. 31. № 1. С. 69-75.
385. Silosi I. и др. The role of autoantibodies in health and disease // *Rom J Morphol Embryol.* 2016. Т. 57. С. 633-638.
386. Silva N.S., Klein U. Dynamics of B cells in germinal centers // *Nat Rev Immunol.* 2015. Т. 15. № 3. С. 137-148.
387. Simon A.K., Hollander G.A., McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age // *Proc Biol Sci.* 2015. Т. 282. № 1821. С. 20143085.
388. Singhal A., Hakomori S. Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer // *BioEssays.* 1990. Т. 12. С. 223-230.
389. Sisco W.M. и др. Comparative composition, diversity, and abundance of oligosaccharides in early lactation milk from commercial dairy and beef cows // *J DairySci.* 2017. Т. 100. № 5. С. 3883-3892.
390. Skripal I.G. ABO system of blood groups in people and their resistance to certain infectious diseases (prognosis) // *Mikrobiol Z.* 1996. Т. 58. № 2. С. 102-8.
391. Slovin S.F., Keding S.J., Ragupathi G. Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer // *Immunol. and Cell Biol.* 2005. Т. 83. С. 418-28.
392. Smilowitz J.T. и др. Breast Milk Oligosaccharides: Structure-Function Relationships in the Neonate // *Annu Rev Nutr.* 2014. Т. 34. С. 143-169.

393. Smorodin, E.P. и др. The relation of serum anti-(GalNAc beta) and para-Forsman disaccharide IgG levels to the progression and histological grading of gastrointestinal cancer // *Exp Oncol.* 2007. № 29. С. 1-6.
394. Song H., Cerny J. Functional Heterogeneity of Marginal Zone B Cells Revealed by Their Ability to Generate Both Early Antibody-forming Cells and Germinal Centers with Hypermutation and Memory in Response to a T-dependent Antigen // *J Exp Med.* 2003. Т. 198. № 12. С. 1923-1935.
395. Spalter S.H. и др. Normal human serum contains natural antibodies reactive with autologous ABO blood group antigens // *Blood.* 1999. Т. 93. № 12. С. 4418-24.
396. Springer G.F. Blood-group and Forsman antigenic determinants shared between microbes and mammalian cells // *Prog. Allergy.* 1971. Т. 15. С. 9-77.
397. Springer G.F., Horton R.E., Forbes M. Origin of antihuman blood group B agglutinins in germfree chicks // *J Exp Med.* 1959. Т. 110. № 2. С. 221-44.
398. Stoddart A., Jackson A.P., Brodsky F.M. Plasticity of B Cell Receptor Internalization upon Conditional Depletion of Clathrin // *Mol Biol Cell.* 2005. Т. 16. № 5. С. 2339-2348.
399. Stowell S.R., Tongzhong J., Cummings R.D. Protein Glycosylation in Cancer // *Annu Rev Pathol.* 2016. № 10. С. 473-510.
400. Sundekilde U.K. и др. Natural variability in bovine milk oligosaccharides from Danish Jersey and Holstein-Friesian breeds // *J Agric Food Chem.* 2012. Т. 60. № 24. С. 6188-6196.
401. Suzuki K., и др. GALT: organization and dynamics leading to IgA synthesis // *Adv Immunol.* 2010. Т. 107. С. 153-85.
402. Szajewska H., Horvath A. A partially hydrolyzed 100% whey formula and the risk of eczema and any allergy: an updated meta-analysis // *World Allergy Organ J.* 2017. Т. 10. № 1. С. 27.
403. Tang D. и др. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that Spur Autophagy and Immunity // *Immunol Rev.* 2012. Т. 249. № 1. С. 158-175.
404. Thomson P., Medina D.A., Garrido D. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization // *Food Microbiol.* 2018. Т. 75. С. 37-46.
405. Thrane P.S., Rognum T.O., Brandtzaeg P. Ontogenesis of the secretory immune system and innate defence factors in human parotid glands // *Clin Exp Immunol.* 1991. Т. 82. № 2. С. 342-8.

406. Thursby E., Juge N. Introduction to the human gut microbiota // *Biochem J.* 2017. Т. 474. № 11. С. 1823-1836.
407. Timmerman H.M. и др. Intestinal colonisation patterns in breastfed and formula-fed infants during the first 12 weeks of life reveal sequential microbiota signatures // *Sci Rep.* 2017. Т. 7. № 8327.
408. Toscano M. и др. Role of the Human Breast Milk-Associated Microbiota on the Newborns' Immune System: A Mini Review // *Front Microbiol.* 2017. Т. 8. С. 2100.
409. Tram T. и др. Sialic acid content of infant saliva: comparison of breast fed with formula fed infants // *Arch Dis Child.* 1997. Т. 77. № 4. С. 315-318.
410. Triantis V., Bode L., Neerven R.J.J. Immunological Effects of Human Milk Oligosaccharides // *Front Pediatr.* 2018. Т. 6. № 190.
411. Tsiantoulas D., Gruber S., Binder C.J. B-1 cell immunoglobulin directed against oxidation-specific epitopes // *Front Immunol.* 2013. Т. 9. № 3. С. 1-6.
412. Tuddenham S., Sears C.L. The Intestinal Microbiome and Health // *Curr Opin Infect Dis.* 2015. Т. 28. № 5. С. 464-470.
413. Tuominen A. и др. A natural antibody to oxidized cardiolipin binds to oxidized low-density lipoprotein, apoptotic cells, and atherosclerotic lesions // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006. Т. 26. № 9. С. 2096-102.
414. Tyrer P. и др. Microbial pattern recognition receptors mediate M-cell uptake of a gram-negative bacterium // *Infect Immun.* 2006. Т. 74. № 1. С. 625-631.
415. Umesaki Y. Use of gnotobiotic mice to identify and characterize key microbes responsible for the development of the intestinal immune system // *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2014. Т. 90. № 9. С. 313-332.
416. Urashima T. и др. Recent advances in studies on milk oligosaccharides of cows and other domestic farm animals // *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013. Т. 77. № 3. С. 455-66.
417. Vandenplas Y. Prevention and Management of Cow's Milk Allergy in Non-Exclusively Breastfed Infants // *Nutrients.* 2017. Т. 9. № 7. С. 731.
418. Vandenplas Y. и др. Human Milk Oligosaccharides: 2'-Fucosyllactose (2'-FL) and Lacto-N-Neotetraose (LNnT) in Infant Formula // *Nutrients.* 2018. Т. 10. С. 9.
419. Vandenplas Y., Greef E., Devreker T. Treatment of Cow's Milk Protein Allergy // *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2014. Т. 17. № 1. С. 1-5.
420. Vandenplas Y., Greef E., Veerman G. Prebiotics in infant formula // *Gut Microbes.* 2014. Т. 5. № 6. С. 681-687.

421. Varambally S. и др. Natural human polyreactive IgM induce apoptosis of lymphoid cell lines and human peripheral blood mononuclear cells // *Int Immunol.* 2004. Т. 16. № 3. С. 517-524.
422. Varki A. Biological roles of glycans // *Glycobiology.* 2017. Т. 27. № 1. С. 3-49.
423. Varki A. Letter to the Glyco-Forum: Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs? Glycan “self-associated molecular patterns” dampen innate immunity, but pathogens can mimic them // *Glycobiology* // 2011. Т. 21. № 9. С. 1121-1124.
424. Vega-Magana N. и др. Bacterial Translocation Is Linked to Increased Intestinal IFN- γ , IL-4, IL-17, and mucin-2 in Cholestatic Rats // *Ann Hepatol.* 2018. Т. 17. № 2. С. 318-329.
425. Voreades N., Kozil A., Weir T.L. Diet and the development of the human intestinal microbiome // *Front Microbiol.* 2014. Т. 5. № 494.
426. Vuskovic M.I. и др. Processing and analysis of serum antibody binding signals from Printed Glycan Arrays for diagnostic and prognostic application // *Int J Bioinform Res Appl.* 2011. Т. 7. № 4. С. 402-26.
427. Walker W. The importance of appropriate initial bacterial colonization of the intestine in newborn, child and adult health // *Pediatr Res.* 2017. Т. 82. № 3. С. 387-395.
428. Wampach A. и др. Colonization and Succession within the Human Gut Microbiome by Archaea, Bacteria, and Microeukaryotes during the First Year of Life // *Front Microbiol.* 2017. Т. 8. № 738.
429. Wang B. и др. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas // *Am J Clin Nutr.* 2001. Т. 74. № 4. С. 510-515.
430. Wang D. N-glycan Cryptic Antigens as Active Immunological Targets in Prostate Cancer Patients // *J Proteomics Bioinform.* 2012. Т. 5. № 4. С. 090-095.
431. Wang J.H., Reinherz E.L. Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules // *Mol Immunol.* 2002. Т. 38. № 14. С. 1039-1049.
432. Wang M. и др. Fecal Microbiota Composition of Breast-fed Infants is Correlated with Human Milk Oligosaccharides Consumed // *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015. Т. 60. № 6. С. 825-833.
433. Wang M. и др. Roles of M cells in infection and mucosal vaccines // *Hum Vaccin Immunother.* 2014. Т. 10. № 12. С. 3544-3551.
434. Wang P. и др. Circulating natural antibodies to inflammatory cytokines are potential biomarkers for atherosclerosis // *J Inflamm.* 2018. Т. 15. № 22.

435. Wang X. и др. Development of Human Breast Milk Microbiota-Associated Mice as a Method to Identify Breast Milk Bacteria Capable of Colonizing Gut // *Front Microbiol.* 2017. Т. 8. № 1242.
436. Weemaes C. и др. Development of immunoglobulin A in infancy and childhood // *Scand J Immunol.* 2003. Т. 58. № 6. С. 642-8.
437. Weichert S. и др. Structural Basis for Norovirus Inhibition by Human Milk Oligosaccharides // *J Virol.* 2016. Т. 90. № 9. С. 4843-4848.
438. Weissler K.A., Caton A.J. The role of T-cell receptor recognition of peptide:MHC complexes in the formation and activity of Foxp3⁺ regulatory T cells // *Immunol Rev.* 2014. Т. 259. № 1. С. 11-22. 224
439. Well G.T.J. и др. Human perinatal immunity in physiological conditions and during infection // *Mol Cell Pediatr.* 2017. Т. 4. № 4.
440. Weller S. и др. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire // *Blood.* 2004. Т. 104. № 12. С. 3647-3654.
441. Wen L. и др. Evidence of Marginal-Zone B Cell- Positive Selection in Spleen // *Immunity.* 2005. V.23. № 3. С. 297-308.
442. Wen L., Duffy A. Factors Influencing the Gut Microbiota, Inflammation, and Type 2 Diabetes // *J Nutr.* 2017. Т. 147. № 7. С. 1468-1475.
443. White M.T. и др. Dynamics of the antibody response to Plasmodium falciparum infection in African children // *J Infect Dis.* 2014. Т. 210. № 7. С. 1115-22.
444. Willhauck-Fleckenstein M. и др. Transcriptional regulation of the vascular endothelial glycome by angiogenic and inflammatory signaling // *Angiogenesis.* 2010. Т. 13. С. 25-42.
445. Wolfert M.A., Boons G-J. Adaptive immune activation: glycosylation does matter // *Nat Chem Biol.* 2013. Т. 9. № 12. С. 776-784.
446. Wong D., Herscovitz H.B., Immune activation by T-independent antigens: lack of effect of macrophage depletion on the immune response to TNP-LPS, PVP and dextran // *Immunology.* 1979. Т. 37. № 4. С. 765-775.
447. Wood P., Elliott T. Glycan-regulated Antigen Processing of a Protein in the Endoplasmic Reticulum Can Uncover Cryptic Cytotoxic T Cell Epitopes // *J Exp Med.* 1998. Т. 188. № 4. С. 773-778.
448. Wright C.M., Waterston A.J.R. Relationships between paediatricians and infant formula milk companies // *Arch Dis Child.* 2006. Т. 91. № 5. С. 383-385.

449. Wu Sh-L. и др. Identification of Potential Glycan Cancer Markers with Sialic Acid Attached to Sialic Acid and Up-regulated Fucosylated Galactose Structures in Epidermal Growth Factor Receptor Secreted from A431 Cell Line // *Mol Cell Proteomics*. 2013. Т. 15. № 5. С. 1239-1249.
450. Xu X. и др. Human-derived natural antibodies: biomarkers and potential therapeutics // *Future Neurol*. 2015. Т. 10. № 1. С. 25-39.
451. Yamamoto F. и др. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 2. cis-AB alleles // *Vox Sang*. 1993. Т. 64. № 2. С. 120-3.
452. Yamamoto M., Cid E., Yamamoto F. ABO blood group A transferases catalyze the biosynthesis of FORS blood group FORS1 antigen upon deletion of exon 3 or 4 // *Blood Adv*. 2017. Т. 1. № 27. С. 2756-2766.
453. Yang I. и др. The Infant Microbiome: Implications for Infant Health and Neurocognitive Development // *Nurs Res*. 2016. Т. 65. № 1. С. 76-88.
454. Yatsunenکو T. и др. Human gut microbiome viewed across age and geography // *Nature*. 2012. Т. 486. № 7402. С. 222-227.
455. Yin L. и др. Recognition of self and altered self by T cells in autoimmunity and allergy // *Protein Cell*. 2013. Т. 4. № 1. С. 8-16.
456. Yoon H.S. Neonatal innate immunity and Toll-like receptor // *Korean J Pediatr*. 2010. Т. 53. № 12. С. 985-988.
457. Yu J.C. и др. Innate Immunity of Neonates and Infants // *Front Immunol*. 2018. Т. 9. С. 1759.
458. Yu P.B. и др. Modulation of natural IgM binding and complement activation by natural IgG antibodies: a role for IgG anti-Gal alpha1-3Gal antibodies // *J Immunol*. 1996. Т. 157. № 11. С. 5163-8.
459. Yu Z.T., Nanthakumar N.N., Newburg D.S. The Human Milk Oligosaccharide 2'-Fucosyllactose Quenches *Campylobacter jejuni*-Induced Inflammation in Human Epithelial Cells HEp-2 and HT-29 and in Mouse Intestinal Mucosa // *J Nutr*. 2016. Т. 146. № 10. С. 1980-1990.
460. Zasada M., и др. Development and Maturation of the Immune System in Preterm Neonates: Results from a Whole Genome Expression Study // *Biomed Res Int*. 2014. Т. 498318.
461. Zaura E. и др. Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective // *Front Cell Infect Microbiol*. 2014. Т. 4. С. 8.

462. Zhang A. и др. Peripheral lymphoid volume expansion and maintenance are controlled by gut microbiota via RALDH⁺ dendritic cells // *Immunity*. 2016. Т. 44. № 5. С. 330-342.
463. Zhang J., Wang D., Shenghu H. Roles of antibody against oxygenized low density lipoprotein in atherosclerosis: recent advances // *Int J Clin Exp Med*. 2015. Т. 8. № 8. С. 1192-11929.
464. Zhang M., Srivastava G., Lu L. The pre-B cell receptor and its function during B cell development // *Cell Mol Immunol*. 2004. Т. 1. № 2. С. 89-94.
465. Zhang X. Regulatory functions of innate-like B cells // *Cell Mol Immunol*. 2013. Т. 10. № 2. С. 113-121.
466. Zhang Y., Garcia-Ibanez L., Toellner K.M. Regulation of germinal center B-cell differentiation // *Immunol Rev*. 2016. Т. 270. № 1. С. 8-19.
467. Zhou Z-H. и др. The Broad Antibacterial Activity of the Natural Antibody Repertoire Is Due to Polyreactive Antibodies // *Cell Host & Microbe*. 2007. № 1. С. 51
468. Zivkovic A.M., Barile D. Bovine Milk as a Source of Functional Oligosaccharides for Improving Human Health // *Adv Nutr*. 2011. Т. 2. № 3. С. 284-289.
469. Zouali M., Richar Y. Marginal Zone B-Cells, a Gatekeeper of Innate Immunity // *Front Immunol*. 2011. № 2. С. 63.
470. Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. Наука, Москва. 2007. 426 с.
471. Хайтов Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы: учебное пособие. М.: ГЭОТАРМедиа. 2013. 280 с.
472. Ярилин А.А. Иммунология. ГЭОТАР-Меди: М. 2010. 752 с.

Приложения

Приложение 1

Таблица 1. Список гликанов и форматов печати на гликоципах

№г	Гликан	Короткое название / бактерия	CA3	NYU1.0	OSPS050416	OSPS221015	OSPS300816
001	Fuc α -sp3	aF	+	+	+	+	+
002	Gal α -sp3	aA	+	+	+	+	+
003	Gal β -sp3	bA	+	+	+	+	+
004	GalNAc α 1-OSer	TnSer	+	+	+	+	+
005	GalNAc α -sp3	Tn	+	+	+	+	+
006	GalNAc β -sp3	bAN	+	+	+	+	+
007	Glc α -sp3	aG	+	+	+	+	+
009	Glc β -sp3	bG	+	+	+	+	+
010	GlcNAc β -sp3	GN	+	+	+	+	+
011	GlcNAc β -sp2	GN-C2	+	+	+	+	+
013	GlcNAc β -sp8	GN-PEG	+	+	+	+	+
014	GlcN(Gc) β -sp4	bGN(Gc)	+	+	+	+	+
016	Man α -sp3	aM	+	+	+	+	+
017	Man α -sp4	aM-Gly	+	+	+	+	+
018	Man β -sp4	bM	+	+	+	+	+
019	ManNAc β -sp4	bMN	+	+	+	+	+
020	Rha α -sp3	aR	+	+	+	+	+
021	Gal β -sp4	bA-Gly	+		+	+	+
022	GlcNAc β -sp4	GN-Gly	+		+	+	+
023	GalNAc β -sp4	bAN-Gly	+		+	+	+
025	GalNAc β -sp10	bAN-PEG2	+		+	+	+
026	Rha β -sp4	bR	+		+	+	+
027	3,6-O-Me ₂ -Glc β -sp3	3,6-Me ₂ Glc	+		+	+	+
028	Xyl β -sp4	bXyl			+	+	+
029	Fuc β -sp4	bF			+	+	+
030	Glc β -sp4	bG-Gly			+	+	+
031	L-Ara α -sp4	aAra			+	+	+
032	GalN(Gc) β -sp3	bANGc			+	+	+
037	3-O-Su-Gal β -sp3	bA3Su	+	+	+	+	+
038	3-O-Su-GalNAc β -sp3	bAN3Su	+		+	+	+
041	6-O-Su-GalNAc α -sp3	aAN6Su			+	+	+
043	6-O-Su-GlcNAc β -sp3	GN6Su	+	+	+	+	+
044	GlcA α -sp3	aGU	+	+	+	+	+
045	GlcA β -sp3	bGU	+	+	+	+	+
046	6-H ₂ PO ₃ Glc β -sp4	G6P	+	+	+	+	+
047	6-H ₂ PO ₃ Man α -sp3	M6P	+	+	+	+	+
048	Neu5Ac α -sp3	Sia	+	+	+	+	+
049	Neu5Ac α -sp9	Sia-Bn	+	+	+	+	+
050	Neu5Ac β -sp3	bSia	+	+	+	+	+
051	Neu5Ac β -sp9	bSia-Bn	+	+	+	+	+
052	Neu5Gc α -sp3	aNeu5Gc	+	+	+	+	+
053	Neu5Gc β -sp3	bSia5Gc	+	+	+	+	+
054	9-NAc-Neu5Ac α -sp3	9NAcSia	+	+	+	+	+
055	3-O-Su-GlcNAc β -sp3	GN3Su	+		+	+	+
057	D-Rib β -sp4	bRib			+	+	+
058	Fuc β -sp3	bF			+	+	+
059	aKdo-5-phosphate-sp11	A173			+	+	+
060	6-O-Su-Gal β -sp3	bA6Su			+	+	+
061	3-O-Su-GalNAc α -sp3	Tn3Su			+	+	+
062	GlcA β -sp2	bGN-C2			+	+	+
063	4-O-Su-GlcNAc β -sp2	GN4Su			+		+
064	4-O-Su-Gal β -sp3	A4Su			+		+
065	4-O-Su-GalNAc α -sp3	Tn4Su			+		+

071	Fuc α 1-2Gal β -sp3	Hdi	+	+	+	+	+
072	Fuc α 1-3GlcNAc β -sp3	Fa3GN	+	+	+	+	+
073	Fuc α 1-4GlcNAc β -sp3	Le	+	+	+	+	+
074	Fuc β 1-3GlcNAc β -sp3	Fb3GN	+	+	+	+	+
075	Gal α 1-2Gal β -sp3	Aa2A	+	+	+	+	+
076	Gal α 1-3Gal β -sp3	Bdi	+	+	+	+	+
077	Gal α 1-3GalNAc β -sp3	Tab	+	+	+	+	+
078	Gal α 1-3GalNAc α -sp3	Taa	+	+	+	+	+
080	Gal α 1-3GlcNAc β -sp3	Aa3GN	+	+	+	+	+
081	Gal α 1-4GlcNAc β -sp3	aLN	+	+	+	+	+
082	Gal α 1-4GlcNAc β -sp8	aLN-PEG	+		+	+	+
083	Gal α 1-6Glc β -sp4	Aa6G	+	+	+	+	+
084	Gal β 1-2Gal β -sp3	Ab2A	+	+	+	+	+
085	Gal β 1-3GlcNAc β -sp3	LeC	+		+	+	+
086	Gal β 1-3GlcNAc β -sp2	LeC-C2	+	+	+	+	+
087	Gal β 1-3Gal β -sp3	Ab3A	+	+	+	+	+
089	Gal β 1-3GalNAc α -sp3	TF	+	+	+	+	+
092	Gal β 1-4Glc β -sp2	Lac-C2	+	+	+	+	+
093	Gal β 1-4Glc β -sp4	Lac-Gly	+	+	+	+	+
094	Gal β 1-4Gal β -sp4	Ab4A	+	+	+	+	+
096	Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	LN-C2	+		+	+	+
097	Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	LN	+	+	+	+	+
098	Gal β 1-4GlcNAc β -sp5	LN-C8	+	+	+	+	+
099	Gal β 1-4GlcNAc β -sp8	LN-PEG	+	+	+	+	+
100	Gal β 1-6Gal β -sp4	Ab6A	+	+	+	+	+
101	GalNAc α 1-3GalNAc β -sp3	Fs-2	+	+	+	+	+
102	GalNAc α 1-3Gal β -sp3	Adi	+	+	+	+	+
103	GalNAc α 1-3GalNAc α -sp3	core5	+	+	+	+	+
104	GalNAc β 1-3Gal β -sp3	ANb3A	+	+	+	+	+
105	GalNAc β 1-3GalNAc β -sp3	para-Fs	+	+	+	+	+
106	GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp3	LacdiNAc	+	+	+	+	+
107	GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp2	LacdiNAc-C2	+	+	+	+	+
110	Glc α 1-4Glc β -sp3	Malt2	+	+	+	+	+
111	Glc β 1-4Glc β -sp4	cello	+	+	+	+	+
112	Glc β 1-6Glc β -sp4	gent	+	+	+	+	+
113	GlcNAc β 1-3GalNAc α -sp3	core3	+	+	+	+	+
114	GlcNAc β 1-3Man β -sp4	GN3M	+	+	+	+	+
115	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Asn	Ch2-Asn	+	+	+	+	+
116	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -sp3	Ch2	+		+	+	+
117	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -sp4	Ch2-Gly	+	+	+	+	+
118	GlcNAc β 1-6GalNAc α -sp3	core6	+	+	+	+	+
119	Man α 1-2Man β -sp4	Ma2Mb	+	+	+	+	+
120	Man α 1-3Man β -sp4	Ma3M	+	+	+	+	+
121	Man α 1-4Man β -sp4	Ma4M	+	+	+	+	+
122	Man α 1-6Man β -sp4	Ma6M	+	+	+	+	+
123	Man β 1-4GlcNAc β -sp4	Mb4GN	+	+	+	+	+
125	6-Bn-Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	6'Bn-LN	+	+	+	+	+
126	6-Bn-Gal α 1-4(6-Bn)GlcNAc β -sp3	Bn2-aLN	+	+	+	+	+
127	Gal β 1-4Glc β -sp4-Phe	Lac-Phe	+		+	+	+
128	Gal β 1-4Glc β -sp4-Trp	Lac-Trp	+		+	+	+
129	Gal β 1-3(6-O-Bn)GlcNAc β -sp3	6BnLeC	+		+	+	+
130	(6-O-Bn-Gal β 1)-3GlcNAc β -sp3	6'BnLeC	+		+	+	+
131	(6-O-Bn-Gal β 1)-3(6-O-Bn)GlcNAc β -sp3	Bn2LeC	+		+	+	+
132	Gal β 1-3GalNAc α -sp5	TF-C8	+		+	+	+
133	Gal β 1-4Glc β -sp4-Ala	Lac-Ala	+		+	+	+
134	Gal β 1-4Glc β -sp4-Arg	Lac-Arg	+		+	+	+
135	Gal β 1-4Glc β -sp4-Asn	Lac-Asn	+		+	+	+
136	Gal β 1-4Glc β -sp4-Ile	Lac-Ile	+		+	+	+
137	Gal β 1-4Glc β -sp4-Nle	Lac-Nle	+		+	+	+

138	Galβ1-4Glcβ-sp4-Val	Lac-Val	+		+	+	+
139	Galβ1-4GlcNAcα-sp3	LNa	+		+	+	+
140	Galα1-3GalNAc(fur)β-sp3	Tab(f)	+		+	+	+
142	GlcNAcα1-3GalNAcβ-sp3	GNa3AN	+		+	+	+
143	Fuca1-2(3-O-Su)Galβ-sp3	Hdi3Su	+	+	+	+	+
144	Galβ1-3(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2	LeC6Su-C2	+	+	+	+	+
145	Galβ1-3(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3	LeC6Su	+	+	+	+	+
146	Galβ1-4(6-O-Su)Glcβ-sp2	Lac6Su	+	+	+	+	+
149	GlcNAcβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2	Ch2-6Su	+	+	+	+	+
150	3-O-Su-Galβ1-3GalNAcα-sp3	TF3'Su	+	+	+	+	+
151	6-O-Su-Galβ1-3GalNAcα-sp3	TF6'Su	+	+	+	+	+
152	3-O-Su-Galβ1-4Glcβ-sp2	Lac3'Su	+	+	+	+	+
153	6-O-Su-Galβ1-4Glcβ-sp2	Lac6'Su	+	+	+	+	+
154	3-O-Su-Galβ1-3GlcNAcβ-sp3	LeC3'Su	+	+	+	+	+
156	3-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	LN3'Su-C2	+	+	+	+	+
158	4-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	LN4'Su-C2	+	+	+	+	+
159	4-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	LN4'Su	+	+	+	+	+
160	6-O-Su-Galβ1-3GlcNAcβ-sp2	LeC6'Su-C2	+	+	+	+	+
161	6-O-Su-Galβ1-3GlcNAcβ-sp3	LeC6'Su	+	+	+	+	+
162	6-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	LN6'Su-C2	+	+	+	+	+
164	GlcAβ1-3GlcNAcβ-sp3	GUb3GN	+	+	+	+	+
165	GlcAβ1-3Galβ-sp3	GUb3A	+	+	+	+	+
166	GlcAβ1-6Galβ-sp3	GUb6A	+	+	+	+	+
167	GlcNAcβ1-4-[HOOC(CH ₃)CH]-3-O-GlcNAcβ-sp4	GN-Mur	+	+	+	+	+
168	GlcNAcβ1-4Mur-L-Ala-D-i-Gln-Lys	GMDPLys	+	+	+	+	+
169	Neu5Acα2-3Galβ-sp3	GM4	+	+	+	+	+
170	Neu5Acα2-6Galβ-sp3	Sia6A	+	+	+	+	+
171	Neu5Acα2-3GalNAcα-sp3	3-SiaTn	+	+	+	+	+
172	Neu5Acα2-6GalNAcα-sp3	SiaTn	+	+	+	+	+
173	Neu5Acβ2-6GalNAcα-sp3	bSiaTn	+	+	+	+	+
174	Neu5Gcα2-6GalNAcα-sp3	Neu5GcTn	+	+	+	+	+
175	Neu5Gcβ2-6GalNAcα-sp3	bNeu5GcTn	+	+	+	+	+
176	3-O-Su-Galβ1-4(6-O-Su)Glcβ-sp2	Lac3',6Su2	+	+	+	+	+
177	3-O-Su-Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3	LN3'6Su2	+	+	+	+	+
178	6-O-Su-Galβ1-4(6-O-Su)Glcβ-sp2	Lac6,6'Su2	+		+	+	+
179	6-O-Su-Galβ1-3(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2	LeC6,6'Su2	+	+	+	+	+
180	6-O-Su-Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2	LN66'Su2	+	+	+	+	+
181	3,4-O-Su ₂ -Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	LN3'4'Su2	+	+	+	+	+
182	3,6-O-Su ₂ -Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	LN3'6'Su2	+	+	+	+	+
183	4,6-O-Su ₂ -Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	LN4'6'Su2-C2	+	+	+	+	+
184	4,6-O-Su ₂ -Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	LN4'6'Su2	+	+	+	+	+
186	Neu5Acα2-8Neu5Acα2-sp3	(Sia)2	+	+	+	+	+
187	Neu5Acα2-8Neu5Acα2-sp9	(Sia)2Bn	+	+	+	+	+
188	Neu5Acα2-8Neu5Acβ-sp9	(Sia)2-bBn	+	+	+	+	+
189	3,6-O-Su ₂ -Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2	LN3'66'Su3	+	+	+	+	+
190	Galβ1-4-(6-P)GlcNAcβ-sp2	LN6P	+		+	+	+
191	6-P-Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	LN6'P	+		+	+	+
192	GalNAcβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3	LacdiNAc6Su	+		+	+	+
193	3-O-Su-GalNAcβ1-4GlcNAcβ-sp3	LacdiNAc3'Su	+		+	+	+
194	6-O-Su-GalNAcβ1-4GlcNAcβ-sp3	LacdiNAc6'Su	+		+	+	+

195	6-O-Su-GalNAc β 1-4(3-O-Ac)GlcNAc β -sp3	3Ac-LacdiNAc6' Su	+			+		+		+
196	3-O-Su-GalNAc β 1-4(3-O-Su)GlcNAc β -sp3	LacdiNAc3, 3'Su2	+			+		+		+
197	3,6-O-Su ₂ -GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp3	LacdiNAc3', 6'Su2	+			+		+		+
198	4,6-O-Su ₂ -GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp3	LacdiNAc4', 6'Su2	+			+		+		+
199	4,6-O-Su ₂ -GalNAc β 1-4-(3-O-Ac)GlcNAc β -sp3	3Ac-LacdiNAc4', 6'Su2	+			+		+		+
200	4-O-Su-GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp3	LacdiNAc4' Su	+			+		+		+
201	3,4-O-Su ₂ -GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp3	LacdiNAc3', 4'Su2	+			+		+		+
202	6-O-Su-GalNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp3	LacdiNAc6, 6'Su2	+			+		+		+
203	Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp2	LN6Su	+			+		+		+
204	4-O-Su-GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp2	LacdiNAc4' Su-C2	+			+		+		+
205	Neu5Ac α 2-6GalNAc β -sp3	6SiaANb	+			+		+		+
206	Neu5Gc α 2-3Gal β -sp3	Neu5Gc3A	+			+		+		+
207	Neu5Ac β 2-6GalNAc β -sp3	bSiaANb	+			+		+		+
208	Gal β 1-3GlcNAc β -sp4	LeC-Gly				+		+		+
209	α Kdo-(2 \rightarrow 4)- α Kdo-sp11	A58				+		+		+
210	L,D-Hep-(1 \rightarrow 5)- α Kdo-4-phosphate-sp11	JN				+		+		+
211	α Kdo-(2 \rightarrow 8)- α Kdo-sp11	A78				+		+		+
212	D-glycero- α -D-talo-octulosonic acid (Ko)-(2 \rightarrow 4)- α Kdo-sp11	NW61S				+		+		+
213	Neu5Ac β 2-6Gal β -sp3	6bSiaA				+		+		+
214	DGlcA β 1-3Gal β -sp3	deltaGUb3 A				+		+		+
215	Fuca1-2Gal β 1-3GlcNAc β -sp3	LeD	+		+	+		+		+
216	Fuca1-2Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	Htype2	+		+	+		+		+
217	Fuca1-2Gal β 1-3GalNAc α -sp3	Htype3	+		+	+		+		+
219	Fuca1-2Gal β 1-4Glc β -sp4	Htype6	+		+	+		+		+
220	Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β -sp2	Aa3'Lac-C2	+		+	+		+		+
221	Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4	Aa3'Lac-Gly	+		+	+		+		+
222	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	Galili3	+		+	+		+		+
223	Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -sp2	Pk-C2	+		+	+		+		+
225	Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	P1	+		+	+		+		+
226	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β -sp3	Btri	+		+	+		+		+
227	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β -sp5	Btri-C8	+		+	+		+		+
228	Gal β 1-2Gal α 1-3GlcNAc β -sp3	Ab2Aa3GN	+		+	+		+		+
229	Gal β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp4	Ab3'LN-Gly	+		+	+		+		+
231	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3GalNAc α -sp3	LN3Tn	+		+	+		+		+
232	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6GalNAc α -sp3	LN6Tn	+		+	+		+		+
233	Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β -sp3	LeA	+		+	+		+		+
234	Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -sp3	LeX	+		+	+		+		+
235	GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β -sp3	Atri	+		+	+		+		+
236	GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β -sp5	Atri-C8	+		+	+		+		+
237	GalNH α 1-3(Fuca1-2)Gal β -OCH ₂ CH ₂ CH ₂ NHAc	ABtri	+		+	+		+		+
239	GalNAc β 1-3(Fuca1-2)Gal β -sp3	Fa2(ANb3) A	+		+	+		+		+
240	(Glc α 1-4) ₃ b-sp4	(Ga4) ₃ b	+		+	+		+		+
241	(Glc α 1-6) ₃ b-sp4	(Ga6) ₃ b	+		+	+		+		+
242	GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	GNa3'LN-C2	+		+	+		+		+

243	GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	GNa3'LN	+	+	+	+	+
245	GlcNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	GNa6'LN	+	+	+	+	+
246	GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -sp3	GN2'TF	+	+	+	+	+
247	GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α -sp3	GN3'TF	+	+	+	+	+
248	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp2	GN3'Lac	+	+	+	+	+
249	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	GN3'LN-C2	+	+	+	+	+
250	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	GN3'LN	+	+	+	+	+
251	GlcNAc β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	GN4'LN	+	+	+	+	+
252	GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -sp4	Ch3	+	+	+	+	+
253	GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	GN6'LN	+	+	+	+	+
254	GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α -sp3	core2	+	+	+	+	+
255	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc α -sp3	core4	+	+	+	+	+
256	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-4)GalNAc α -sp3	GN2-4,6Tn	+	+	+	+	+
258	Man α 1-6(Man α 1-3)Man β -sp4	(Ma)3b	+	+	+	+	+
259	Gal β 1-4(Gal β 1-3)GlcNAc β -sp3	(Ab)2-3,4GN	+		+	+	+
260	Gal β 1-3(Fuc β 1-4)GlcNAc β -sp3	bLeA	+		+	+	+
261	Gal β 1-4(Fuc β 1-3)GlcNAc β -sp3	bLeX	+		+	+	+
262	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal β -sp4	Tbb-A	+		+	+	+
263	(GalNAc β -PEG ₂) ₃ -b-DD	ANb-cluster	+		+	+	+
264	Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	Ab4'LN	+		+	+	+
266	Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	P1	+		+	+	+
267	GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp3	GlcNAc3'Le ^c	+		+	+	+
268	GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β -sp3	Fa6Ch2	+		+	+	+
269	Gal β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4	Gal3'Lac			+	+	+
270	Gal β 1-4Gal β 1-4Glc β -sp4	Gal4'Lac			+	+	+
271	Gal β 1-6Gal β 1-4Glc β -sp4	Gal6'Lac			+	+	+
272	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Cit	3'SL-Cit			+	+	+
273	Fuc β 1-2Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	Fb2LN			+	+	+
274	GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	ANa3'LN			+	+	+
275	GalNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	ANb3'LN			+	+	+
276	GlcNAc β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	GN4'LN-C3			+	+	+
277	GalN(Gc) α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -sp3	NGcAtri			+	+	+
278	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal β -sp3	Fs-3			+	+	+
279	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3GalNAc α -sp3	LeCa3Tn			+	+	+
280	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3GalNAc α -sp3	LeC3Tn			+		+
281	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β -sp3	Htype4			+		+
288	3-O-Su-Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3	3'SuLeX	+	+	+	+	+
289	Neu5Ac α 2-6(Gal β 1-3)GalNAc α -sp3	6SiaTF	+	+	+	+	+
290	Neu5Ac α 2-6(Gal α 1-	A3a(Sia)Tn	+	+	+	+	+

	3)GalNAc α -sp3						
291	Neu5Ac β 2-6(Gal β 1-3)GalNAc α -sp3	b6SiaTF	+	+	+	+	+
292	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -sp3	Sia3"TF	+	+	+	+	+
293	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp3	3'SL	+	+	+	+	+
294	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4	3'SL-Gly	+	+	+	+	+
295	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc β -sp2	6'SL-C2	+	+	+	+	+
296	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc β -sp4	6'SL-Gly	+	+	+	+	+
297	Neu5Ac β 2-6Gal β 1-4Glc β -sp2	b6'SL	+	+	+	+	+
298	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	3'SLN	+	+	+	+	+
299	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp3	3'SiaLeC	+	+	+	+	+
300	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	6'SLN	+	+	+	+	+
302	Neu5Ac β 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	b6'SLN	+	+	+	+	+
303	Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	3'SLN(Gc)	+		+	+	+
304	Neu5Gc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	6'SLN(Gc)	+	+	+	+	+
305	Neu5Gc β 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	b6'SLN(Gc)	+	+	+	+	+
306	9-Nac-Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	9Nac-6'SLN	+	+	+	+	+
307	KDN α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp2	KDN3'LeC	+	+	+	+	+
308	KDN α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	KDN3'LN	+	+	+	+	+
309	Neu5Ac α 2-6(Neu5Ac α 2-3)GalNAc α -sp3	Sia2-3,6Tn	+	+	+	+	+
310	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -O(CH ₂) ₃ NH-amide-Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	(3'SLN) ₂	+	+	+	+	+
315	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4-(6-O-Su)GlcNAc β -sp3	3'SLN6Su	+	+	+	+	+
316	Fuc α 1-2(6-O-Su)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	6'SuHtype2			+	+	+
318	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp3	6'SLN6Su	+	+	+	+	+
319	Neu5Ac α 2-3(6-O-Su)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	3'SLN6'Su	+	+	+	+	+
320	4-O-Su-Neu5Ac α 2-3(6-O-Su)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	3'SLN6',4"S u2	+	+	+	+	+
321	(Neu5Ac α 2-8) ₃ -sp3	(Sia)3	+	+	+	+	+
322	(Neu5Ac α 2-8) ₃ β -sp3	(Sia)3b	+	+	+	+	+
323	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-3GlcNAc β -sp3	6'SiaLeC	+		+	+	+
324	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-3(6-O-Su)GlcNAc β -sp3	6'SiaLeC6S u	+		+	+	+
325	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Ala	3'SL-Ala	+		+	+	+
326	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Ile	3'SL-Ile	+		+	+	+
327	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Nle	3'SL-Nle	+		+	+	+
328	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Phe	3'SL-Phe	+		+	+	+
329	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Trp	3'SL-Trp	+		+	+	+
330	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Val	3'SL-Val	+		+	+	+
331	Neu5Gc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp3	3'SiaLeC(Gc)	+		+	+	+
332	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-	3'SL-Asn	+		+	+	+

	Asn						
333	Neu5Gc α 2-3Gal β 1-3(6-O-Su)GlcNAc β -sp3	3'SiaLeC(Gc)6Su	+		+	+	+
334	Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp3	3'SLN(Gc)6Su	+		+	+	+
335	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(6-O-Su)GlcNAc β -sp3	3'SiaLeC6Su	+		+	+	+
336	α Kdo-(2 \rightarrow 8)- α Kdo-(2 \rightarrow 4)- α Kdo-sp11	A128			+	+	+
337	GalNAc α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	ANa4'LN			+	+	+
338	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-3GalNAc α -sp3	6'SiaTF			+	+	+
339	Neu5Ac β 2-6Gal β 1-3GalNAc α -sp3	6'bSiaTF			+	+	+
340	Gal α 1-3(Neu5Ac β 2-6)GalNAc β -sp3	b6SiaTab			+	+	+
341	Neu5Ac α 2-3-(6-O-Su)Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	6'Su3'SLN			+	+	+
342	Neu5Ac α 2-3(6-O-Su)Gal β 1-3GalNAc α -sp3	6'Su3'SiaTF			+	+	+
343	Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp2	3'SL(Gc)			+		+
344	Neu5Ac β 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	b3'SLN			+		+
359	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GlcNAc β -sp3	Btype1	+	+	+	+	+
360	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	Btype2	+	+	+	+	+
361	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	Btype2-C2	+	+	+	+	+
362	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GalNAc α -sp3	Btype3	+	+	+	+	+
363	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GalNAc β -sp3	Btype4	+	+	+	+	+
364	Gal α 1-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -sp3	aGalLeX	+	+	+	+	+
365	Gal α 1-4(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	Aa4'(Fa2')LN	+	+	+	+	+
366	GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GlcNAc β -sp3	Atype1	+	+	+	+	+
368	GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	Atype2	+	+	+	+	+
369	GalNAc α 1-4(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	ANa4'(Fa2')LN	+	+	+	+	+
370	GalNAc β 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	ANb3'(Fa2')LN			+	+	+
371	Fuca1-2Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β -sp3	LeB	+	+	+	+	+
372	Fuca1-2Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -sp3	LeY	+	+	+	+	+
373	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β -sp3	Galili4	+	+	+	+	+
374	Gal α 1-3(Gal α 1-4)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	Aa2-3',4'LN	+	+	+	+	+
376	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4	LNT	+	+	+	+	+
377	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp2	LeCb3'LeC	+	+	+	+	+
378	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	LeCa3'LN	+	+	+	+	+
379	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	LeC3'LN	+	+	+	+	+
380	Gal β 1-3GlcNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	LeCa6'LN	+	+	+	+	+

381	Galβ1-3GlcNAcβ1-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	LeC6LN	+	+	+	+	+
382	Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ-sp3	aGM1	+	+	+	+	+
383	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp4	LNnT	+	+	+	+	+
384	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	LN3'LN-C2	+	+	+	+	+
386	Galβ1-4GlcNAcα1-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	LNα6LN	+	+	+	+	+
387	Galβ1-4GlcNAcβ1-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	LN6LN	+	+	+	+	+
388	Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-sp3	LN6TF	+	+	+	+	+
389	GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ-sp3	Gb4	+	+	+	+	+
390	(Glcα1-4) ₄ β-sp4	(Ga4)4b	+	+	+	+	+
392	GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GalNAcα-sp3	A(type 3)	+		+	+	+
394	GlcNAcβ1-4(GlcNAcβ1-3)Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	GN2-3',4LN	+	+	+	+	+
395	GlcNAcβ1-6(GlcNAcβ1-3)Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	Tk	+	+	+	+	+
396	(GlcNAcβ1) _{3-3,4,6} -GalNAcα-sp3	GN3-3,4,6Tn	+	+	+	+	+
397	Galβ1-3GlcN(Fm)β1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	LeC(Fm)b3'LN	+	+	+	+	+
398	Galβ1-3GlcN(Fm)β1-3Galβ1-3GlcNAcβ-sp3	LeC(Fm)3'LeC	+		+	+	+
399	Galβ1-3GlcNAcα1-3Galβ1-3GlcNAcβ-sp2	LeCa3'LeC-C2	+		+	+	+
401	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-3GlcNAcβ-sp3	Le ^c 3'Le ^c	+		+	+	+
402	GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galα1-4GlcNAcβ-sp3	Atria4GN	+		+	+	+
403	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp2	LeC3'LN	+		+	+	+
404	GalNAcα1-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-sp3	ANaLeX			+	+	+
405	Galα1-3(Fuca1-2)Galα1-4GlcNAcβ-sp3	Btria4GN			+	+	+
406	GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galα1-3GalNAcβ-sp3	Atria3AN			+	+	+
407	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcα-sp4	LNnTa			+		+
408	GlcNAcβ1-4(GlcNAcβ1-3)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	GN2-3',4LN-C3			+		+
419	3-O-SuGalβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	(3'SuLN)3'LN	+	+	+	+	+
420	4-O-SuGalβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	(4'SuLN)3'LN	+	+	+	+	+
421	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcα-sp4	LNTa	+	+	+		
423	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-sp3	SiaLeX	+	+	+	+	+
425	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucβ1-3)GlcNAcβ-sp3	bF-SiaLeX	+	+	+	+	+
426	Neu5Acα2-3Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ-sp3	SiaLeA	+	+	+	+	+
428	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fuca1-3)(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3	SiaLeX6Su	+	+	+	+	+
429	Neu5Acα2-3(6-O-Su)Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-sp3	SiaLeX6'Su	+	+	+	+	+

431	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(2-O-Su-Fuca1-3)GlcNAc β -sp3	SiaLeX2" ^u S	+	+	+	+	+
432	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(3-O-Su-Fuca1-3)GlcNAc β -sp3	SiaLeX3" ^u S	+	+	+	+	+
433	Neu5Ac α 2-6(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3)GalNAc α -sp3	Sia2-3',6TF	+	+	+	+	+
434	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4	GD3	+	+	+	+	+
435	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(2-O-Su-Fuca1-3)(6-O-Su)GlcNAc β -sp3	SiaLeX6,2" ^u Su2	+	+	+	+	+
436	4-O-Su-Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuca1-3)(6-O-Su)GlcNAc β -sp3	SiaLeX6,4" ^u Su2	+	+	+	+	+
437	GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GalNAc β -sp3	A(type 4)	+		+	+	+
438	Fuc β 1-2Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -sp3	LeYbF			+	+	+
440	Neu5Ac β 2-6(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	bSia6'Htype2			+	+	+
441	Neu5Ac α 2-6(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	Sia6'Htype2			+	+	+
479	Fuca1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4	Htype1Lac	+	+	+	+	+
480	Fuca1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	Htype1LN	+	+	+	+	+
481	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4	Galili5	+	+	+	+	+
482	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β -sp3	BLeB			+	+	+
483	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -sp3	BLeY	+	+	+	+	+
484	GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β -sp3	ALeB			+	+	+
485	Gal β 1-4GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	Ab4ANa3'(Fa2')LN	+	+	+	+	+
489	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	LN3'(GN6')LN	+	+	+	+	+
491	GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -sp3	ALeY			+	+	+
492	(Glc α 1-6) β -sp4	(Ga6)5b	+	+	+	+	+
493	(GlcNAc β 1-4) β -sp4	Ch5	+	+	+	+	+
495	Man α 1-6(Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-3)Man β -sp4	(Ma)5b	+	+	+	+	+
496	Fuca1-2Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4	LeBLac	+	+	+	+	+
498	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	(LNb3')3	+	+	+	+	+
499	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	LN2-3',6'LN	+	+	+	+	+
501	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -sp4	Gb5	+		+	+	+
502	(Glc α 1-6) β -sp4	(Ga6)6b	+	+	+	+	+
503	(GlcNAc β 1-4) β -sp4	Ch6	+	+	+	+	+
504	(A β 1-4GN β 1-2Ma1) ₂ -3,6-M β 1-4GN β 1-4GN β -sp4	9-OS	+	+	+	+	+
505	(GN β 1-2Ma1) ₂ -3,6-M β 1-4GN β 1-4GN β -sp4	7-OS	+	+	+	+	+
506	Araf β 1-2Araf α 1-5(Araf β 1-2Araf α 1-3)Araf α 1-5Araf α -O(CH ₂) ₂ NHCOCH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₆ NH ₂	Araf6	+		+	+	+

507	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -sp3	Fs-5				+	+	+
508	GalNAc β 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3	ALeYb				+	+	+
509	Gal β 1-3GalNAc β 1-4(Neu5Ac α 2-3)Galb1-4Glc β -sp4	GM1				+	+	+
510	Man α 1-6(Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-3)Man α -sp4	Man5a				+	+	+
527	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	3'SLN-LN	+	+		+	+	+
528	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β -sp3	SiaLeX3A	+	+		+	+	+
529	Neu5Ac α 2-6(Gal β 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4	LSTb	+	+		+	+	+
530	(Neu5Ac α 2-3Gal β 1) _{2-3,4} -GlcNAc β -sp3	(Sia3A) _{2-3,4} GN	+	+		+	+	+
531	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -sp2	GD2	+	+		+	+	+
534	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	6'SLN-LN	+			+	+	+
535	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -sp4	GD2-Gly	+			+	+	+
536	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4	LSTa	+			+	+	+
538	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -sp4	MFLNH III	+			+	+	+
539	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -sp4	MFLNH I	+			+	+	+
540	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6(Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -sp4	MSMFLNnH	+			+	+	+
541	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6(Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -sp4	DFLNH (a)	+			+	+	+
542	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -sp4	MF(1-3)iLNO	+			+	+	+
546	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc α -sp4	LSTda				+		+
547	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc α -sp4	LSTaa				+		+
548	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	6'SLN-LN-C2				+		+
625	(GlcA β 1-3GlcNAc β 1-4) ₁₁₋₁₂ -NH ₂ -ol	HyalU(11-12)-ol	+			+	+	+
627	(Sia α 2-6A β 1-4GN β 1-2M α 1) _{2-3,6} -M β 1-4GN β 1-4GN β -sp4	11-OS	+	+		+	+	+
630	(GlcA β 1-3GlcNAc β 1-4) ₂₀ -NH(p-C ₆ H ₄)CH ₂ CH ₂ NH ₂	HyalU20-ol				+	+	+
631	(GlcA β 1-3GlcNAc β 1-4) ₃₈ -NH(p-C ₆ H ₄)CH ₂ CH ₂ NH ₂	HyalU38-ol				+	+	+
632	(GlcA β 1-3GlcNAc β 1-4) ₁₃ -NH(p-C ₆ H ₄)CH ₂ CH ₂ NH ₂	HyalU13-ol				+	+	+
633	(Neu5Ac α 2-8) _n -NH(p-C ₆ H ₄)CH ₂ CH ₂ NH ₂	(Neu5Ac α 2-8) _n						
800	GlcNAc α 1-4GlcNAc β -sp3	GNa4GN	+			+	+	+
801	GalNAc α 1-3GalNAc(fur) β -sp3	Fs(f)-2	+			+	+	+
802	Gal β 1-3GalNAc(fur) β -sp3	Tbb(f)				+	+	+
804	[Gal β 1-4GlcNAc β -OCH ₂ CH ₂] ₂ NH	LN_dimer				+	+	+
805	GalNAc β 1-4(6-O-Bn)GlcNAc β -sp3	6'Bn-LacdiNAc				+	+	+

806	Gal α 1-6Glc α -sp3	Aa6Ga				+	+	+
808	Gal α 1-6Glc β -sp3	Aa6G-C3				+	+	+
809	GalNAc β 1-3GalNAc α -sp3	ANb3ANa				+	+	+
810	GalNGc α 1-3GalNAc α -sp3	core5Gc				+	+	+
811	3,6-O-Me ₂ -Glc β 1-4(2,3-O-Me ₂)Rha β -O(<i>p</i> -C ₆ H ₄)-OCH ₂ CH ₂ NH ₂	KN05097				+	+	+
812	Gal β 1-4Glc α -sp4	Laca				+	+	+
813	Gal β 1-3GalNGc α -sp3	TFGc				+	+	+
814	Man α 1-6Man α -sp4	Ma6Ma				+	+	+
815	Gal α 1-4GalNAc α -sp3	Aa4ANa				+		+
816	Gal β 1-4GalNAc α -sp3	Ab4ANa				+		+
817	GalNAc β 1-4GalNAc α -sp3	ANb4ANa				+		+
818	GalNAc α 1-4GalNAc α -sp3	ANa4ANa				+		+
819	Glc β 1-4GalNAc α -sp3	G4ANa						+
820	GlcNAc β 1-4GalNAc α -sp3	GN4ANa						+
850	Gal β 1-3(6-O-Su)GalNAc α -sp3	6SuTF				+	+	+
851	Gal α 1-3(6-O-Su)GalNAc α -sp3	6SuTaa				+	+	+
852	GlcNAc β 1-4-[HOOC(CH ₃)CH]-3-O-GlcNAc α -sp4	GN-aMur				+	+	+
853	6-O-Su-Gal α 1-3GalNAc α -sp3	6'SuTaa				+	+	+
854	(6-O-Su)Neu5Ac α 2-3Gal β -sp3	Sia3A6'Su				+		+
855	(O-Su) ₄ Glc α 1-4(O-Su) ₃ Glc β -spacer	MaltSu7						+
1001	-4Qui3N α 1-3Rha α 1-4Gal β 1-3(Glc β 1-4)GalN α 1-	S. enterica O28deAc	+			+	+	+
1002	-2Rib-ol5-P-6Gal α 1-3FucNA α 1-3GlcN β 1-	S. enterica O47deAc	+			+	+	+
1003	-4(Fuca1-3)GalN α 1-6ManN α 1-3Fuca1-3(Glc β 1-4)Gal β 1-	S. enterica O16deAc	+			+	+	+
1004	-2Fuca1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-3GlcNAc α 1-	S. enterica O13	+			+	+	+
1005	-4Qui3NAc α 1-3Rha α 1-4Gal β 1-3(Glc β 1-4)GalNAc α 1-	S. enterica O28	+			+	+	+
1006	-4(Fuca1-3)GalNAc α 1-6Man2(20%)Ac3(40%)Ac4(20%)Ac α 1-3Fuca1-3(Glc β 1-4)Gal β 1-	S. enterica O16	+			+	+	+
1007	-2(Gal α 1-4)Gal α 1-3ManNAc β 1-6Gal β 1-3GlcNAc β 1-	S. enterica O17	+			+	+	+
1008	-3Gal/2(30%)Ac β 1-3Gal α 1-	S. enterica O67	+			+	+	+
1009	-3(S-3HOBu1-2Ala1-4)Qui4N β 1-6GlcNAc α 1-3QuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-	S. enterica O58	+			+	+	+
1010	-2Man β 1-4Glc α 1-3QiuNAc α 1-3GlcNAc α 1-	S. enterica O41	+			+	+	+
1011	-3(GalNAcA6NH α 1-2)Rha α 1-2Rha α 1-3Rha α 1-2Rha α 1-3GlcNAc β 1-	S. enterica O62	+			+	+	+
1012	-2(Fuc3NFoa1-3)Man β 1-3Glc β 1-3GlcNAc β 1-	S. enterica O60	+			+	+	+
1013	-4Man α 1-2Man α 1-2Man β 1-3GalNAc α 1-	S. enterica O18	+			+	+	+
1014	-2Gal β 1-3GlcNAc α 1-4Rha α 1-3GlcNAc β 1-	S. enterica O59	+			+	+	+
1015	-3(ManNAc β 1-2)Rha α 1-2Rha α 1-2Gal α 1-3GlcNAc β 1-	S. enterica O42	+			+	+	+
1016	-2Rib β 1-4Gal β 1-4GlcNAc α 1-4Gal β 1-3GlcNAc α 1-	S. enterica O52	+			+	+	+
1017	-3GlcNAc β 1-3(Man β 1-4)Gal α 1-4Rha α 1-	S. enterica O11	+			+	+	+
1018	-6Glc α 1-4(GlcNAc β 1-3)Gal β 1-3GalNAc α 1-3GlcNAc β 1-	S. enterica O51	+			+	+	+
1019	-2Glc α 1-6Glc α 1-4(GlcNAc β 1-3)Gal α 1-3GlcNAc β 1-	S. enterica O44	+			+	+	+
1020	-7Neu5Ac α 2-3FucNA α 1-	S. enterica	+			+	+	+

	3GlcNAc6Acβ1-	O21					
1021	-3(GlcNAcβ1-2)Rhaα1-2Rhaα1-4Glcα1-3GalNAcβ1-	S. enterica O57	+		+	+	+
1022	-3(Ser2Ac1-4)Qui4Nβ1-3Rib/β1-4GalNAcα1-3GlcNAcα1-	S. enterica O56	+		+	+	+
1023	-3(Galβ1-4)Galβ1-4(GlcNAcβ1-2)Glcβ1-3GalNAcβ1-	S. enterica O38	+		+	+	+
1024	-3(Rha2(%)Ac3(%)Ac4(%)Acα1-4GalAα1-2)Rhaα1-4Glcα1-2Rhaα1-3GlcNAcβ1-	C. sakazakii G2356 O2	+		+	+	+
1025	-3FucNAcα1-4(GlcNAcβ1-2)GalAα1-3FucNAcα1-3GlcNAcβ1-	C. sakazakii G2592 O7	+		+	+	+
1026	-2(Glcα1-4)Glcβ1-2Fuc3NRHbβ1-6GlcNAcα1-4GalNAcα1-3(Glcα1-6)GlcNAcβ1-	C. sakazakii G2594 O4	+		+	+	+
1027	-4Qui3NAcα1-3Rhaα1-6GlcNAcα1-4GlcAβ1-3(Glcβ1-4)GalNAcα1-	C. sakazakii G2726 O3	+		+	+	+
1201	-4(Colα1-3)(Colα1-6)Glcα1-4Galα1-3GlcNAcβ1-	E. coli O11	+		+	+	+
1202	-2Galβ1-3FucNAcα1-3GlcNAcβ1-	E. coli O15	+		+	+	+
1203	-2Manα1-2(Glcα1-4)Manβ1-3GlcNAcα1-6Manα1-	E. coli O44	+		+	+	+
1204	-2(S-3HOBu1-4)Qui4NA1-4GalNAcβ1-4Rhaα1-3GlcNAc6(30%)Acβ1-	E. coli O49	+		+	+	+
1205	-3(GlcNAcβ1-2)Rhaα1-2Rhaα1-4Glcα1-3GalNAcβ1-	E. coli O51	+		+	+	+
1206	-3Fuc/2(50%)Acβ1-3-6dmanHepβ1-	E. coli O52	+		+	+	+
1207	-2-DRha4NAcα1-3Fucα1-4Glcβ1-3GalNAcα1-	E. coli O57	+		+	+	+
1208	-4(R-Lac2-3Rhap2Acα1-3)Manβ1-4Manα1-3GalNAcβ1-	E. coli O58	+		+	+	+
1209	-4Quip3NAcα1-3Rhaα1-4Galβ1-3GalNAcα1-	E. coli O71	+		+	+	+
1210	-6Manα1-2(Glcα1-4)Manα1-2(Glcα1-3)Manβ1-3GlcNAcα1-	E. coli O73	+		+	+	+
1211	-2(Gal/α1-4)Galα1-3ManNAcβ1-6Gal/β1-3GlcNAcβ1-	E. coli O85	+		+	+	+
1212	-3)Fucα1-3Xlu/β1-	E. coli O95	+		+	+	+
1213	-3(Glcα1-2)Rhaα1-2Rhaα1-2Rhaα1-3(Glcα1-2)Rhaα1-	E. coli O99	+		+	+	+
1214	-4-8eLeg5Ac7Aca2-6Galα1-3FucNAcα1-3GlcNAcα1-	E. coli O108	+		+	+	+
1215	-4(GlcpNAcβ1-3)GalNAcα1-2Glcα1-4L-IdoAα1-3GalNAcβ1-	E. coli O112ab	+		+	+	+
1216	-3Rib-ol5-P-6Galα1-3FucNAma1-3GlcNAcβ1-	E. coli O118	+		+	+	+
1217	-2(RhaNAc3NFob1-3)Manβ1-3Galα1-4Rhaα1-3GlcNAcα1-	E. coli O119	+		+	+	+
1218	-3(S-3HOBu1-2DA1-4)Qui4Nβ1-6GlcNAcα1-3LQuiNAcα1-3GlcNAc6(30%)Acα1-	E. coli O123	+		+	+	+
1219	-2(Glcα1-3)Manα1-3Fucα1-3GalNAcα1-4(Galβ1-3)GalNAcβ1-	E. coli O125	+		+	+	+
1220	-2Fuc3(65%)Ac4(35%)Acα1-2Galβ1-3GalNAcα1-3GalNAcα1-	E. coli O127	+		+	+	+
1221	-4(GalNAcβ1-3)Galα1-6Glcβ1-3GalNAcβ1-	E. coli O130	+		+	+	+
1222	-3Rhaα1-3Rhaα1-2Glcα1-	E. coli O148	+		+	+	+

	3GlcNAc α 1-						
1223	-3(S-Lac2-4)GlcNAc β 1-2Rha α 1-2Rha α 1-3(Glc β 1-2)Rha α 1-3GlcNAc β 1-	E. coli O150	+		+	+	+
1224	-2Rib-ol5-P-6Gal α 1-3FucNA α 1-3(GlcNAc β 1-4)GlcNAc β 1-	E. coli O151	+		+	+	+
1225	-8(D-Ala1-7)Leg5Ac α 2-4GlcA β 1-3GlcNAc β 1-	E. coli O161	+		+	+	+
1226	-4(Fuc α 1-3)GlcNAc6(30%)Ac α 1-4GlcA α 1-3Fuc α 1-3GlcNAc β 1-	E. coli O168	+		+	+	+
1227	-2Gal β 1-4Man β 1-4Gal α 1-3GlcNAc β 1-	E. coli O40					+
1228	-2)Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β 1-3GalNAc β (1-	E. coli O86_B7			+	+	+
1230	Escherichia coli O10a10b	E. coli O10a10b	+		+	+	+
1231	-2Glc β 1-6GlcNAc α 1-3FucNA α 1-3GlcNAc β 1-	E. coli O12	+		+	+	+
1232	Gal α 1-2Gal α 1-2(Gal β 1-4)Glc α 1-3Glc α 1-/inner core-lipid A/	E. coli O14	+		+	+	+
1233	-2Rha α 1-2Rha α 1-2Rha α 1-2Glc α 1-3GlcNAc6Ac α 1-	E. coli O19ab	+		+	+	+
1234	Escherichia coli O27	E. coli O27	+		+	+	+
1235	-4(Rha α 1-2Fuc α 1-3)Man α 1-3Fuc α 1-3GlcNAc β 1-	E. coli O36	+				+
1236	-4(D-Gro1-P-O-3)GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc β 1-	E. coli O37	+				+
1237	-3(R-3HOBu1-4)Qui4N β 1-4(Gal α 1-3)Man α 1-4Rha α 1-3GlcNAc α -	E. coli O39			+	+	+
1238	-3Gal α 1-3(GlcA β 1-4)Fuc α 1-4GlcNAc β 1-3Fuc α 1-3GlcNAc β 1-	E. coli O41	+		+	+	+
1239	Escherichia coli O54	E. coli O54	+		+	+	+
1240	Escherichia coli O62	E. coli O62	+		+	+	+
1241	Escherichia coli O81	E. coli O81	+		+	+	+
1242	-4GlcA β 1-4(GlcNAc β 1-2)GlcA β 1-3GlcNAc α 1-	E. coli O30			+	+	+
1243	-4(Rha α 1-2Fuc α 1-3)Man α 1-3Fuc α 1-3GlcNAc β 1-	E. coli O36			+	+	+
1244	Escherichia coli O37	E. coli O37			+	+	+
1245	-2Gal β 1-4Man β 1-4Gal α 1-3GlcNAc β 1-	E. coli O40			+	+	+
1246	-4(D-aThr3(70%)Ac2-6)GlcA β 1-6Gal β 1-6Glc β 1-3GalNAc6(15%)Ac β 1-	E. coli O46			+	+	+
1247	-6(Rha α 1-3)Man α 1-2(Glc α 1-3)Man α 1-2Man α 1-2Man β 1-3GlcNAc α 1-	E. coli O68			+	+	+
1248	GlcNAc α 1-2Glc α 1-2Glc α 1-3(Gal α 1-6)Glc α 1-/inner core-lipid A/	E. coli O100			+	+	+
1249	Escherichia coli O102	E. coli O102			+	+	+
1250	-3(Rha α 1-4)GlcA α 1-2Rha α 1-2Rha α 1-2Gal α 1-3GalNAc β 1-	E. coli O120			+	+	+
1251	-2Rha α 1-2Rha α 1-3Rha2Ac α 1-3(Glc α 1-6)GlcNAc β 1-	E. coli O135			+	+	+
1252	-3(Gal α 1-2Rha α 1-4)Gal β 1-4Glc α 1-4GlcA α 1-3GalNAc β 1-	E. coli O140			+	+	+
1253	-2Rib β 1-4Gal β 1-4GlcNAc α 1-4Gal β 1-3GlcNAc α 1-	E. coli O153			+	+	+
1254	-2(ManNAc α 1-3)Rha α 1-3Rha α 1-3Rha α 1-3GalNAc α 1-	E. coli O154			+	+	+
1255	-2Rha4NAc α 1-3Fuc α 1-4Glc β 1-3GalNAc α 1-	E. coli O157			+	+	+

1256	-4(Rha α 1-3)(Glc α 1-6)Glc α 1-3GalNAc α 1-3GalNAc β 1-	E. coli O158			+	+	+
1257	-2Man β 1-4GlcA β 1-3LQuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-	E. coli O163			+	+	+
1258	-4ManNAc3NAcA β 1-2Rha α 1-3Rha β 1-4GlcNAc α 1-	E. coli O180			+	+	+
1259	Escherichia coli O84-deAc	E. coli O84deAc			+	+	+
1301	-3(Qui3NFoa1-4)GalA6NH2 α 1-4GalNAc α 1-4Gal α 1-3GalNAc β 1-	P. alcalifaciens O3			+	+	+
1302	Providencia alcalifaciens O3_2 capsular polysaccharide	P. alcalifaciens O3 CPS			+	+	+
1303	-4GlcNAc β 1-3GlcA α 1-4GlcNAc α 1-3Rha2Ac β 1-	P. alcalifaciens O7			+	+	+
1304	-2Glc β 1-6Gal α 1-6GalNAc α 1-4(Glc β 1-3)GalNAc α 1-3GalNAc α 1-	P. alcalifaciens O9			+	+	+
1305	Providencia rustigianii O11 capsular polysaccharide	P. rustigianii O11 CPS			+	+	+
1306	-4(GlcNAc β 1-2Glc β 1-2)(GlcNAc β 1-3)Gal β 1-3GalNAc α 1-4Gal β 1-3GalNAc β 1-	P. alcalifaciens O12			+	+	+
1307	-4(D-GroA1NH2(2-P-3))GalNAc β 1-4Gal β 1-3FucNAc4N β 1-	P. alcalifaciens O22			+	+	+
1308	-3(Dhpa2-4Man β 1-4)Gal α 1-4GalNAc β 1-3GalNAc β 1-	P. alcalifaciens O31			+	+	+
1309	-4Qui3NFo β 1-3Gal α 1-3GlcA β 1-3GalNAc β 1-	P. alcalifaciens O40			+	+	+
1310	-3GlcA β 1-4(Glc α 1-3)Fuc α 1-4Fuc α 1-2Glc β 1-3GlcNAc α 1-	P. alcalifaciens O46deAc			+	+	+
1311	-3Man α 1-2Fuc α 1-2GlcA4Ac β 1-3GalNAc α 1-	P. alcalifaciens O48			+	+	+
1312	-4Glc β 1-3Gal α 1-4GalNAc β 1-4(L-Ser2-6)GlcA β 1-3GalNAc β 1-	P. alcalifaciens O60			+	+	+
1401	GalNAc α 1-4GlcNAc3NAcA β 1-3DFucNAc α 1-3QuiNAc β 1-3Rha α 1-3(Glc α 1-6)Glc β 1-3(Glc α 1-4)(L-Ala1-2)GalNa(P-6)1-3L-gro-manHepp7Cma1-3(P-2)(P-4)L-gro-manHep α 1-5Kdo α	P. aeruginosa O1(F4)	+		+	+	+
1402	-3Rha α 1-4LGalNAcA α 1-3QuiNAc α 1-	P. aeruginosa O10ac(F5)	+		+	+	+
1403	-2LGlc β 1-3FucNAc α 1-3DFucNAc β 1-	P. aeruginosa O11ab	+		+	+	+
1404	-2Rha α 1-3Rha α 1-4GalNAcA3Ac α 1-3QuiNAc β 1-	P. aeruginosa O13ab	+		+	+	+
1405	Rha α 1-3Rha α 1-4GalNAcA α 1-3QuiNAc β 1-3Rha α 1-3(Glc α 1-6)Glc β 1-3(Glc α 1-4)(L-Ala1-2)GalNa1-3(P-6)L-gro-manHep7Cma1-3(P-2)(P-4)L-gro-manHep α 1-5Kdo α	P. aeruginosa O13ac	+		+	+	+
1406	Glc α 1-6Glc β 1-3(Rha α 1-6Glc α 1-	P.	+		+	+	+

	4)GalNa1-3(P-6)L-gro- manHepα1-3(P-2)(P-4)L-gro- manHepα1-5(Kdoα2-4)Kdoα2- 6(P-4)GlcNβ1-6GlcNa1-P	aeruginosa O14					
1407	-2Rib/β1-3GalNAcα1-	P. aeruginosa O15	+		+	+	+
1408	Pseudomonas aeruginosa O2abc	P. aeruginosa O2abc	+		+	+	+
1409	-4ManNAc3NAmAβ1- 4LGuINAc3NAcAα1- 3DFucNAc4Nβ1-	P. aeruginosa O2ac	+		+	+	+
1410	-4ManNAc3NAmAβ1- 4LGuINAc3NAcAα1- 3DFucNAcβ1-	P. aeruginosa O2ac(F3)	+		+	+	+
1411	-4ManNAc3NAmAβ1- 4ManNAc3NAcAβ1- 3DFucNAcα1-	P. aeruginosa O2ad(F7)	+		+	+	+
1412	-4LGuINAc3NAmAα1- 4ManNAc3NAcAβ1- 3DFucNAc4Aα1-	P. aeruginosa O2adf	+		+	+	+
1413	-2LRha3Aα1-6GlcNAcα1- 4LGalNAcA3Aα1-3(S- 3HOBu1-4)QuiNAc4Nβ1-	P. aeruginosa O3(Habs 3)			+	+	+
1414	-2Rha3Aα1-6GlcNAcα1- 4LGalNAcAα1- 3QuiNAc4NSHbβ1-	P. aeruginosa O3ab			+	+	+
1415	-2Rhaα1-3FucNAcα1- 3FucNAcα1-3QuiNAcα1-	P. aeruginosa O4ab			+	+	+
1416	-2Rhaα1-3FucNAcα1- 3FucNAcα1-3DFucNAcα1-	P. aeruginosa O4ac	+		+	+	+
1417	-2Rhaα1-4GalNAcA3Aα1- 4GalNFoAα1-3QuiNAcα1-	P. aeruginosa O6(F1)			+	+	+
1418	-3R-3HOBu1-7Pse4Ac5Acβ2- 4DFucNAcα1-3QuiNAcβ1-	P. aeruginosa O9ad	+		+	+	+
1501	Proteus genomospecies 5/6 O79	P. genomospec ies 5/6 O79	+		+	+	+
1502	-3GalNAcβ1-4(L6dTalα1- 3)Manα1-3L6dTalα1-	A. hydrophila O34deAc			+	+	+
1503	-2Rhaα1-2Rhaα1-2Rhaα1- 4GalAα1-3GlcNAcα1-	E. cloacae G2277			+	+	+
1504	-3Rhaβ1-4(Glcα1-3)Rhaα1- 2Rhaα1-3Galα1-3DFucNAcα1-	E. cloacae G3421			+	+	+
1601	Proteus mirabilis 12B-r	P. mirabilis 12B-r	+		+	+	+
1602	-3(Rib1(50%)Ac-ol5-P-6)Galβ1- 4(GlcNAcβ1-2)Glcβ1- 3GlcNAcβ1-	P. mirabilis 1B-m	+		+	+	+
1603	-2Glcβ1-3L6dTal2(85%)Aα1- 3GlcNAcβ1-	P. mirabilis 3B-m	+		+	+	+
1604	-4(LAltpAα1-3)GalNAcα1- 3GalAα1-3GlcNAcα1-	P. mirabilis HJ 4320			+	+	+
1605	-3(Glcα1-6)GlcNAcβ1- 4(GlcNAcβ1-2)GlcAβ1-3(L- Thr2-6)GalAβ1-	P. mirabilis O11	+		+	+	+
1606	-3GlcNAcβ1-3(S,R-CetLys2- 6GalAα1-4)Galα1-	P. mirabilis O13	+		+	+	+
1607	GalNAcβ1-4GalNAcα1- 3GlcNAcα1-2Rib-ol	P. mirabilis O16	+		+	+	+
1608	-3GlcAβ1-4(Galα1-3)FucNAcα1-	P. mirabilis	+		+	+	+

	3GlcNAc α 1-	O23					
1609	-4(Lys2-6)GalA α 1-4Gal α 1-3(Ser-(2-6)GalA4Aca1-3GlcNAc β 1-	P. mirabilis O28	+		+	+	+
1610	-3LQuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-6(S-Lac-1-3)GlcNAc α 1-	P. mirabilis O31	+		+	+	+
1611	-2(Rib-ol5-P-3)Gal β 1-3GlcNAc α 1-3(EtN1-75%P-6)Glc β 1-3GlcNAc β 1-	P. mirabilis O33	+		+	+	+
1612	-2Fuc3N(R-3HOBu)4Ac β 1-6Glc3Aca1-4GlcA β 1-3GlcNAc α 1-	P. mirabilis O35			+	+	+
1613	-3(EtNAc1-P-6)GlcNAc α 1-3D-Asp2Ac4-4)Qui4N β 1-6Glc α 1-4GalA α 1-	P. mirabilis O38	+		+	+	+
1614	-6(GalA6(L-Lys) α 1-4)GalNAc β 1-4(Glc α 1-2)GlcA β 1-3GalNAc β 1-	P. mirabilis O3ab	+		+	+	+
1615	-4(GalA6(L-Thr)3Aca1-3)GalNAc β 1-3Rha β 1-4GlcNAc6Ac β 1-	P. mirabilis O58	+		+	+	+
1616	-4(GlcA α 1-3)FucNAc α 1-3GlcNAc β 1-	P. mirabilis O6	+		+	+	+
1617	-4(S,R-CetLys2-6)GlcA β 1-6GalNAc α 1-6GlcNAc β 1-3GlcNAc β 1-	P. mirabilis O60	+		+	+	+
1618	-6GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc α 1-	P. mirabilis OE	+		+	+	+
1701	-3GlcA β 1-4(Gal α 1-3)FucNAc α 1-3GlcNAc α 1-	P. penneri 107	+		+	+	+
1702	-3(Glc β 1-3GlcNAc4(S-Lac) β 1-2)Rha α 1-2Rha α 1-2Gal6Aca1-3GlcNAc β 1-	P. penneri 113	+		+	+	+
1703	-4(Glc α 1-2)GlcA3Ac β 1-3GlcNAc α 1-2(R-3HOBu1-3)Fuc3N β 1-6Glc4Aca1-	P. penneri 17			+	+	+
1704	-6GlcNAc3(S-Lac) α 1-3LQuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-	P. penneri 28	+		+	+	+
1705	-3Gal α 1-4GalNAc α 1-3FucNAc α 1-3(EtN1-P-6)GlcAc β 1-	P. penneri 31	+		+	+	+
1706	-6(S-Lac2-3)GlcNAc β 1-3Gal α 1-3GlcNAc6Ac β 1-	P. penneri 40	+		+	+	+
1707	-4(Glc α 1-3)Glc β 1-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4Rib-ol5-P-	P. penneri 75	+		+	+	+
1801	-3(EtN1-P-6)GlcNAc α 1-2(R-3HOBu1-3)Fuc3N β 1-6Glc α 1-4GlcA β 1-	P. vulgaris 32/57 O17	+		+	+	+
1802	-4(L-Ala2-6)GlcA β 1-3GalNAc β 1-4Glc β 1-3Gal α 1-4GalNAc β 1-	P. vulgaris 70/57 O44			+	+	+
1803	-4GalN6Aca1-3DFuc2Aca1-3(EtN1-P-6)GlcNAc β 1-3Gal α 1-	P. vulgaris O19ab	+		+	+	+
1804	-3GlcNAc β 1-3(Qui3NAc2(65%)Ac4Aca1-2)Rha β 1-4Rha α 1-4GlcA β 1-	P. vulgaris O22	+		+	+	+
1806	-4GlcA β 1-3GlcNAc β 1-2(R-3HOBu1-2L-Ala1-4)Qui4N β 1-3Gal α 1-	P. vulgaris O4	+		+	+	+
1807	-4Glc6(65%)Aca1-3GlcA4Ac β 1-3GlcNAc α 1-3GlcA4(87%)Ac β 1-	P. vulgaris O46	+		+	+	+
1808	-4Glc β 1-3GalNAc β 1-4GalNAc β 1-4Gal β 1-	P. vulgaris O65	+		+	+	+
1809	-4LQuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-4(LQuiNAc α 1-3)GalNAc α 1-4Gal α 1-P	P. vulgaris OX19	+		+	+	+
1810	-4Glc β 1-3GalNAc β 1-	P. vulgaris	+		+	+	+

	4GalNAcβ1-4Galβ1-	TG251					
2001	-3(Rib/β1-4GlcAβ1-4)Galα1-6Manα1-2Manα1-3GalNAcβ1-	Sh. boydii type 10	+		+	+	+
2002	-3GlcNAcβ1-4GlcA3Acβ1-2(Rha3Aca1-3)Manα1-4Galβ1-	Sh. boydii type 12	+		+	+	+
2003	-6Galα1-4GlcAβ1-6Galβ1-4Galβ1-4GlcNAcβ1-	Sh. boydii type 14	+		+	+	+
2004	-4(GlcNAcβ1-3)GalNAca1-4Glcα1-4L-IdoAα1-3GalNAcβ1-	Sh. boydii type 15	+		+	+	+
2005	-4GlcAβ1-2(Galα1-3)Man6(50%)Acβ1-4Manβ1-3GlcNAcβ1-	Sh. boydii type 16	+		+	+	+
2006	-6(R-Lac2-4)Glcβ1-4GalNAca1-3GalNAcβ1-	Sh. boydii type 17	+		+	+	+
2007	-3Rhaβ1-4Rhaα1-2Rhaα1-2GalAα1-3GalNAca1-	Sh. boydii type 18	+		+	+	+
2008	-2Rib/β1-4GalAα1-3GlcNAca1-2(Gal/β1-3)Rhaα1-2Rhaα1-2Rib/β1-4GalAα1-	Sh. boydii type 2	+		+	+	+
2009	-3(GlcAβ1-4)Galα1-6Manα1-2Manα1-3GalNAcβ1-	Sh. boydii type 6	+		+	+	+
2010	-2Gal/β1-3GlcNAca1-8(3HOBu1-7)Pse5Ac2-6Galα1-6Glcα1-	Sh. boydii type 7	+		+	+	+
2011	-3GalNAca1-4GlcAβ1-3GlcNAcβ1-2GalAβ1-	Sh. boydii type 8	+		+	+	+
2012	-4Glcα1-4GlcAβ1-3GlcNAca1-3Rhaα1-	Sh. boydii type 9	+		+	+	+
2013	Shigella boydii type X	Sh. boydii type X	+		+	+	+
2101	-3Rhaα1-3Rhaα1-2Galα1-3GlcNAca1-	Sh. dysenteriae type 1	+		+	+	+
2102	-1D-Gro3-P-6Glcβ1-4(Glcα1-6Gal2(25%)Aca1-3)FucNAca1-3GlcNAcβ1-	Sh. dysenteriae type 11	+		+	+	+
2103	-3(R-Lac2-4Glcβ1-6Glcα1-4)Galβ1-6Gal/β1-3GalNAcβ1-	Sh. dysenteriae type 3	+		+	+	+
2104	-3GlcNAca1-3(Fuc3Ac4Aca1-4)GlcNAca1-4GlcAα1-3Fuca1-	Sh. dysenteriae type 4	+		+	+	+
2105	GalNAcA3Ac6NH2α1-4GalNAca1-3GlcNAc	Sh. dysenteriae type 7	+		+	+	+
2106	-4GlcAβ1-3GalNAcβ1-3(GlcNAcβ1-4Glcβ1-4)GalNAcβ1-	Sh. dysenteriae type 8	+		+	+	+
2107	-2Gal3,4(RPyr)β1-4Manβ1-4Galα1-3GlcNAcβ1-	Sh. dysenteriae type 9	+		+	+	+
2201	-3GlcNAcβ1-2Rhaα1-2Rhaα1-3(Glcα1-4)Rhaα1-	Sh. flexneri type 2a	+		+	+	+
2202	-3GlcNAcβ1-2(Glcα1-3)Rhaα1-2Rhaα1-3(Glcα1-4)Rhaα1-	Sh. flexneri type 2b	+		+	+	+
2203	-3GlcNAcβ1-2(Glcα1-3)Rhaα1-2Rhaα1-3Rha2Aca1-	Sh. flexneri type 3a	+		+	+	+
2204	-2Rhaα1-2Rhaα1-3Rha2Aca1-3GlcNAcβ1-	Sh. flexneri type 3b	+		+	+	+
2205	-3(Glcα1-6)GlcNAcβ1-2Rhaα1-2Rhaα1-3Rhaα1-	Sh. flexneri type 4a	+		+	+	+
2206	-3(Glcα1-6)GlcNAcβ1-2Rhaα1-2Rhaα1-3Rha2Aca1-	Sh. flexneri type 4b	+		+	+	+
2207	-3GlcNAcβ1-2Rhaα1-2(Glcα1-3)Rhaα1-3Rhaα1-	Sh. flexneri type 5a	+		+	+	+
2208	-3GlcNAcβ1-2(Glcα1-3)Rhaα1-2(Glcα1-3)Rhaα1-3Rhaα1-	Sh. flexneri type 5b	+		+	+	+

2209	-2Rha3(%)Ac4(%)Aca1-2Rhaa1-4GalAβ1-3GalNAcβ1-	Sh. flexneri type 6	+		+	+	+
2210	-2Rha3(60%)Ac4(30%)Aca1-2Rhaa1-4GalAβ1-3GalNAcβ1-	Sh. flexneri type 6b	+		+	+	+
2211	-3GlcNAcβ1-2(Glca1-3)Rhaa1-2Rhaa1-3Rhaa1-	Sh. flexneri type X	+		+	+	+
2212	-2Rhaa1-2Rhaa1-3Rhaa1-3GlcNAcβ1-	Sh. flexneri type Y	+		+	+	+
2213	-3Rhaa1-3(Glca1-4)GlcNAcβ1-2Rhaa1-2Rhaa1-	Sh. flexneri type 1a			+	+	+
2214	Shigella flexneri type 2c	Sh. flexneri type 2c			+	+	+
2215	-2(EtN1-P-3)Rhaa1-2Rhaa1-3Rhaa1-3(Glca1-6)GlcNAcβ1-	Sh. flexneri 4av			+	+	+
2216	Shigella flexneri type 5c	Sh. flexneri type 5c			+	+	+
2217	-2(Glca1-3)Rhaa1-2Rhaa1-3Rhaa1-3(Glca1-4)GlcNAcβ1-	Sh. flexneri type 1d			+	+	+
2218	Shigella flexneri type Ya	Sh. flexneri type Ya			+	+	+
2219	-2Rha3(%)Aca1-2Rhaa1-3Rhaa1-3GlcNAc6(%)Acβ1-	Sh. flexneri type Y_2			+	+	+
2220	-2(EtN1-P-3)Rhaa1-2(20%EtN1-P-3)Rhaa1-3Rhaa1-3GlcNAc6(45%)Acβ1-	Sh. flexneri type Yv			+	+	+
2221	-2(Glca1-3)Rhaa1-2(EtN1-P-3)Rhaa1-3Rhaa1-3GlcNAcβ1-	Sh. flexneri type Xv			+	+	+
2501	Streptococcus equi sp. hyaluronic acid sodium salt	S. equi sp. hyaluronic acid	+		+	+	+
2502	-4(2-O-Su)IdoAa1-4(6-O-Su)GlcNSua1-; -4GlcAβ1-4GlcNAca1-	Heparin			+	+	+
2601	Acetobacter methanolicus LPS	A. methanolicus LPS	+		+	+	+
3001	-3Glcβ1-	S. cerevisiae zymozan A	+		+	+	+
3002	-6Mana1-	Mannan			+	+	+
3301	-3Glcβ1-6Glcβ1-	Laminarin	+		+	+	+
3302	-3Glcβ1-	Laminaran	+		+	+	+
3401	-4Glcβ1-4Glcβ1-3Glcβ1-	bGlucan	+		+	+	+
3501	Rha:Ara:Gal:GalA 9:3:79:9, MW 900-2000 kDa	Galactan-1			+	+	+
3502	Rha:Ara:Gal:GalA 17:3:62:18, MW 100-400kDa	Galactan-2			+	+	+
8001	-2)Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GalNAcβ1-3GalNAcβ(1-LPS	E. coli O86_B7 LPS			+	+	+
8002	-3Rhaa1-3Rhaa1-2Glca1-3GlcNAca1- LPS	E. coli O148 LPS			+	+	+
8003	-4(Fuca1-3)GlcNAc6(30%)Aca1-4GlcAa1-3Fuca1-3GlcNAcβ1- LPS	E. coli O168 LPS			+	+	+
8004	-4(GalNAcβ1-3)Galα1-6Glcβ1-3GalNAcβ1- LPS	E. coli O130 LPS			+	+	+
8005	-2Rib-ol5-P-6Galα1-3FucNAma1-3(GlcNAcβ1-4)GlcNAcβ1- LPS	E. coli O151 LPS			+	+	+
8006	-3(Glca1-2)Rhaa1-2Rhaa1-2Rhaa1-3(Glca1-2)Rhaa1- LPS	E. coli O99 LPS			+	+	+
8007	-6Mana1-2(Glca1-4)Mana1-2(Glca1-3)Manβ1-3GlcNAca1- LPS	E. coli O73 LPS			+	+	+
8008	-3Rib-ol5-P-6Galα1-3FucNAma1-3GlcNAcβ1- LPS	E. coli O118 LPS			+	+	+

8009	-4(R-Lac2-3Rhap2Ac α 1-3)Man β 1-4Man α 1-3GalNAc β 1-LPS	E. coli O58 LPS			+	+	+
8010	-4(GlcpNAc β 1-3)GalNAc α 1-2Glc α 1-4L-IdoA α 1-3GalNAc β 1-LPS	E. coli O112ab LPS			+	+	+
8011	-3(S-Lac2-4)GlcNAc β 1-2Rha α 1-2Rha α 1-3(Glc β 1-2)Rha α 1-3GlcNAc β 1-LPS	E. coli O150 LPS			+	+	+
9001	-3Glc β 1-3Glc β 1-3(Glc β 1-6)Glc β 1-	Scleroglucan	+		+	+	+
9002	-3Glc β 1-	Curdlan	+		+	+	+
9003	-4GlcN(%)Ac β 1-	Chitosan	+		+	+	+

Обозначения:

sp1 = ol = aminoalditol

sp2 = C2 = -O(CH₂)₂NH₂

sp3 = C3 = -O(CH₂)₃NH₂

sp4 = Gly = -NHCOCH₂NH₂

sp5 = C8 = -O(CH₂)₃NH-CO(CH₂)₅NH₂

sp6 = NH(*p*-C₆H₄)CH₂CH₂NH₂ (as-aminoalditol)

sp7 = Ph = -OC₆H₄-*p*-NH₂

sp8 = PEG = -(OCH₂CH₂)₆NH₂

sp9 = Bn = -OCH₂C₆H₄-*p*-NHCOCH₂NH₂

sp10 = PEG2 = -(OCH₂CH₂)₂NH₂

sp11 = -OCH₂CH₂CH₂SCH₂CH₂NH₂

sp12 = PEG3 = H₂N-(CH₂CH₂O)₃-CH₂CH₂CO

LPS - lipopolysaccharide

sp0 = other spacers: Asn, Ser, C2Et (see details in the column "Spacered form of saccharide")

Ala = alanine

Arg = arginine

Asn = asparagine, NH-CO-CH₂CH(COOH)NH₂

Ile = iso-leucine

Nle = norleucine

Ser = serine, -OCH₂CH(COOH)NH₂

Trp = tryptophan

Phe = phenylalanine, -COCH(CH₂C₆H₅)NH₂

C2Et = -O(CH₂)₂NHEt

Cit = citrullin

A = Gal

AN = GalNAc

Ch = chito

F = L-Fuc

G = Glc

Gc = glycolyl

GN = GlcNAcb

R = Rha

i = iso

(fur, f) = furanose cycle

Fm = formyl

Lac = lactose

LN = N-acetyllactosamine

M = Man

MN = ManNAc

Malt = maltose

OS = oligosaccharide

P = phosphate

S = Sia = Neu5Aca

Su = sulfate

Tn = GalNAca

U = uronic acid

D-Fuc3NRHb = 3,6-dideoxy-3-[(*R*)-3-hydroxybutanoyl]-D-galactose

D-Xlu = D-*threo*-pent-2-ulose (D-xylulose)

8eLeg = 8-epilegionaminic acid

8-Leg = 8-legionaminic acid

L-Ido = L-iduronic acid

D-aThr = D-allothreonine

Dhpa = (2R,4R)-2,4-dihydroхурpentanoic acid

L-6dTal = 6-deoxy-L-talose

В приведенных химических формулах гликанов в соответствующих местах следует читать “a” как α , “b” как β .

Приложение 2

Таблица 1. Сигналы связывания антигликановых антител в сыворотках крови мышей, однократно подвергнутых гаважу остатками непереваренной пищи нестерильных мышей. Красным цветом отмечены сигналы выше 1500 RFU; М – медиана значений сигналов 8 повторов гликанов на гликочипе; 1Q и 3Q – интерквартильное отклонение. Номера гликанов соответствуют номерам Таблицы 1 Приложения 1.

Особь №	1			2			3			4		
	М	1Q	3Q									
011	164	98	21	2151	148	611	70	16	22	71	32	24
013	334	96	76	3716	472	237	448	217	44	193	55	31
019	125	40	15	467	61	38	54	16	9	6728	258	691
020	311	188	1153	14971	3225	1827	898	473	1262	305	291	165
026	62	24	23	155	97	9	7185	1389	2493	11	1	2
074	5385	540	422	115	21	95	73	19	23	26	11	13
075	55	14	31	698	57	107	43	10	31	3794	252	265
080	4393	423	475	169	20	82	49	12	8	398	61	169
115	34	12	14	2277	2021	241	241	98	32	118	42	31
117	105	14	30	6130	1049	1012	5797	443	375	3652	402	1052
123	59	11	11	85	36	14	27	4	4	2804	179	70
139	21	17	20	3405	3361	7712	871	675	430	4	1	7
153	135	33	20	2654	42	417	56	14	18	88	20	36
162	164	70	70	21553	3738	5660	45	17	50	108	55	25
166	52	11	23	120	29	13	30957	2878	5264	370	106	148
178	93	22	34	1950	187	455	68	26	75	127	68	33
179	106	17	32	2005	673	657	61	17	26	102	7	50
180	14	8	26	1610	1584	1859	23	7	4	7	3	3
195	17	14	19	1632	1248	947	13	3	5	5	1	4
256	263	136	64	8710	412	226	241	30	34	355	52	144
263	1274	675	237	203	101	42	108	28	9	4179	2042	412
362	10913	3757	676	18898	1483	1615	1067	60	97	597	37	74
364	1619	59	182	1506	30	69	1376	117	30	1353	47	76
392	11521	1278	3651	11578	426	2815	1220	136	80	932	93	206
396	486	26	16	5840	480	1894	334	9	45	1085	28	118
437	9523	438	1327	8155	224	1434	1516	65	107	717	91	37
503	195	27	42	3400	979	398	1745	521	113	1842	470	301
1002	141	14	11	169	88	72	120	12	38	1597	226	268
1004	4320	1141	803	6545	781	1488	888	113	106	1234	262	160
1008	7746	505	271	26749	1345	1112	360	27	27	2549	67	611
1009	1708	473	100	1031	283	268	68	4	6	267	32	19
1010	488	41	15	2168	239	197	3500	189	447	599	16	89
1013	163	8	27	303	62	33	92	25	15	7621	2005	223
1208	35927	437	1202	43580	1692	1125	13738	684	445	44000	3514	3415
1216	69	17	21	117	24	41	61	13	16	32204	2075	983
1217	1662	381	214	1005	175	118	988	122	14	728	35	174
1220	29080	2987	1849	35445	3838	2082	5218	951	568	5614	1325	1146
1222	1034	261	239	9367	1303	3298	10571	2964	2139	1715	513	191
1232	1688	310	210	175	37	36	11486	5009	1738	50	29	34
1233	226	74	19	6013	1009	223	6160	128	327	500	60	95
1407	35	7	8	2313	340	58	44	7	24	19	6	8
1416	228	21	20	10464	1609	1088	84	16	18	392	21	26
1418	107	20	30	174	14	3	1831	117	77	8907	237	161
1603	607	132	38	3931	332	170	127	29	18	76	29	19
1606	1299	979	385	1508	602	87	155	62	20	669	146	62
1610	1263	226	232	18771	2269	5012	508	144	76	494	209	40
1613	720	9	47	1350	143	73	400	11	24	3059	357	224
1614	727	13	18	225	40	119	187	21	52	1666	239	163
2006	316	48	22	13669	979	900	143	54	10	81	24	13
2007	99	11	12	9624	539	979	408	127	36	68	54	17
2101	2355	1998	831	9527	752	253	6119	1393	620	892	110	176
2105	1056	113	249	1610	127	108	266	66	15	269	90	35
2209	7485	3090	197	474	378	105	109	3	10	2219	83	362
2210	8763	1722	1183	874	100	288	79	3	1	1123	298	362

Таблица 2. Сигналы связывания антигликановых антител в сыворотках крови не стерильных лабораторных мышей. Красным цветом отмечены сигналы выше 1500 RFU; М – медиана значений сигналов 8 повторов гликанов на гликочипе; 1Q и 3Q – интерквартильное отклонение. Номера гликанов соответствуют номерам Таблицы 1 Приложения 1.

Особь №	1			2			3			4		
	М	1Q	3Q	М	1Q	3Q	М	1Q	3Q	М	1Q	3Q
001	238	55	76	5294	3953	931	400	223	250	1946	1117	250
017	400	119	38	186	65	69	286	44	30	2052	1367	120
019	252	138	134	422	168	276	946	512	228	1737	1025	571
020	1709	805	268	469	183	176	1231	419	294	1450	604	988
024	206	88	161	242	49	20	246	74	221	3322	1748	2636
038	322	24	25	698	530	535	370	109	855	2070	1412	2152
055	6034	2106	2880	5556	154	112	2641	335	703	4670	1114	4179
073	492	87	68	1975	105	115	158	1	7	540	219	62
094	166	57	36	496	374	1526	765	183	111	2888	1686	844
096	100	17	80	226	88	164	1618	1228	2094	3837	2276	1037
113	2202	396	358	80	13	10	628	322	696	520	364	913
115	281	123	112	2516	809	660	183	37	48	894	362	160
117	634	120	95	3704	723	812	166	58	59	1828	648	178
125	1680	362	348	15998	3283	2691	10880	4540	1948	7666	4597	1498
128	1144	61	106	2034	380	324	2027	131	927	1253	532	525
129	142	27	262	380	249	287	1316	518	270	2034	1412	2164
130	169	51	18	1950	343	318	322	40	108	599	110	207
131	570	93	126	3874	716	1152	1534	472	305	3060	846	518
154	923	11	211	510	148	308	1820	647	666	2250	177	386
168	4798	1830	776	255	37	44	170	10	6	194	28	42
169	641	158	100	931	99	21	1778	224	1021	1648	284	350
176	1278	194	700	418	48	90	3139	2381	1031	380	16	52
177	750	62	240	540	90	156	6980	695	843	4450	1321	1268
181	539	154	186	928	87	88	936	216	309	3673	1709	398
189	336	51	93	544	41	72	352	105	114	2857	357	824
192	157	20	29	1634	85	544	162	42	130	452	89	258
193	204	56	110	4937	220	304	109	11	37	166	32	21
198	252	78	529	341	50	91	154	44	22	1810	555	313
216	1356	210	138	1223	44	0	2160	1706	2164	363	197	582
217	5467	732	415	33880	1415	1386	5990	2258	626	43266	16936	6898
227	858	86	110	468	42	55	118	19	90	1721	231	247
233	265	170	448	408	141	66	144	28	20	3566	2763	2012
234	2506	1152	483	356	113	67	683	177	210	15906	5631	6181
240	367	88	203	1758	272	89	239	51	132	382	66	41
245	1201	344	184	8411	449	795	1190	703	383	2358	300	274
249	1849	192	391	255	98	121	7630	6280	5831	22325	1619	2350
250	1800	250	210	287	137	65	11943	3947	595	18576	4601	1611
251	2704	382	332	86	7	17	122	28	57	280	164	590
253	284	72	313	3491	199	240	1338	1010	535	1690	281	562
255	2258	168	80	156	51	78	163	47	48	268	40	28
256	328	98	62	616	80	42	130	56	146	6086	593	416
259	176	19	5	426	24	67	673	132	156	3393	1289	922
260	2753	145	176	287	80	17	214	35	130	328	58	17
261	262	102	72	517	43	43	2622	759	204	8050	2618	1022
264	149	79	121	52434	21924	13101	7086	1912	1432	30150	8032	3638
300	122	13	21	2140	100	129	105	21	25	112	12	24
304	116	40	186	2116	404	92	176	9	216	211	62	405
306	146	61	128	1816	626	364	227	59	30	357	159	198
319	774	185	35	609	71	71	2852	954	594	800	214	235
320	1122	284	200	2024	139	128	4614	2120	590	1120	164	183
329	1537	330	348	1442	128	139	1845	1464	972	1118	344	258
362	11714	777	2376	5568	275	147	1332	767	803	65535	7525	0
363	3880	1257	1426	344	72	487	529	46	80	9494	5013	1234
364	1872	72	75	1699	159	35	1384	175	41	1131	191	93

368	116	16	15	8434	344	316	3285	469	664	383	214	236
372	2909	249	666	142	33	67	122	8	35	70	6	92
380	670	308	228	5963	738	1325	1558	361	585	2816	1776	968
381	147	48	24	3953	969	544	2699	1376	665	2664	887	1282
386	8888	228	219	16605	1277	163	7840	2364	1749	10940	3376	1496
387	309	27	274	3992	342	560	1580	1136	939	2238	1617	1122
390	280	48	179	218	80	34	558	309	80	1797	178	131
392	8618	1891	1804	10288	447	254	3424	2463	1403	7320	720	1136
396	608	232	178	816	78	76	136	21	68	1820	191	229
399	110	33	206	1727	414	185	418	231	220	287	144	155
437	5980	418	161	6145	384	339	1592	1187	1050	6085	219	663
480	1899	353	47	2184	178	127	2307	419	392	1194	312	128
497	2973	1229	93	527	75	47	452	49	60	494	33	16
1004	2698	408	39	23668	2844	4856	2954	304	694	12210	1586	1529
1016	142	10	27	2110	169	652	310	94	439	218	163	189
1017	307	164	189	364	164	94	366	175	71	1592	1015	606
1023	184	31	31	3986	562	309	876	386	192	5944	3514	1421
1202	452	98	32	696	63	97	505	180	38	1516	566	808
1206	178	68	125	280	176	196	242	48	163	1880	1208	201
1208	63706	9186	1829	4290	374	300	5002	315	1406	24601	9179	2312
1210	132	39	220	268	142	348	320	72	161	1774	1168	520
1212	244	18	68	272	128	101	388	69	415	1854	1062	2677
1214	150	36	160	296	137	174	304	136	368	1867	1208	334
1218	270	93	169	342	70	165	390	95	659	2083	1235	316
1220	7418	2407	1397	16690	2861	4078	5641	1241	2043	26970	11004	3642
1222	1960	690	626	862	26	43	2608	1868	333	938	66	166
1232	176	36	59	65535	4198	0	7811	5839	910	34943	26848	4101
1408	86	14	413	326	83	683	472	171	1477	2212	866	1054
1410	420	282	250	834	281	172	528	335	634	1727	1122	4549
1606	182	105	141	354	24	124	1587	233	327	412	258	45
1610	7958	1900	552	1926	72	116	740	167	172	314	110	46
2003	272	93	75	1612	241	255	902	182	222	2715	1342	853
2004	287	147	52	2101	253	260	169	20	61	183	60	39
2006	616	216	475	2910	479	850	2812	1997	584	1090	248	472
2101	5032	1804	521	612	222	105	3180	1988	606	2339	1606	1945
2105	3956	1149	861	6289	254	945	870	550	310	936	246	158
2106	13386	5111	2111	98	47	32	302	150	28	214	17	86
2107	119	25	34	1896	260	348	192	35	148	230	96	93
2210	154	45	50	642	485	808	899	611	2551	1712	1184	322

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю свою искреннюю благодарность моему научному руководителю – заведующему лабораторией углеводов ФГБУН «Институт биоорганической химии им ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», доктору химических наук, профессору Бовину Николаю Владимировичу, а также старшему научному сотруднику лаборатории углеводов, кандидату химических наук, старшему научному сотруднику Шиловой Надежде Владимировне за представленную мне возможность работать в лаборатории, обучение новым методам исследования, постоянную поддержку и внимание. Выражаю благодарность доктору биологических наук, профессору, заведующему лаборатории иммунохимии ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства Филатову Александру Васильевичу и кандидату химических наук, заведующей лабораторией биологических микрочипов ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук Рубиной Алле Юрьевне за помощь в интерпретации части результатов работы. Выражаю благодарность заведующему лабораторией химии углеводов ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского, доктору химических наук, профессору Книрелю Юрию Александровичу за предоставление коллекции полисахаридов, которая использовалась в работе, а всему коллективу химиков-синтетиков лаборатории углеводов – за предоставленные для печати чипов гликаны.