



УДК 577.112.083:577.112.4:577.151.05

ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОДІЇ ВУГЛЕВОДНИХ ЛАНЦЮГІВ СЕКРЕТОРНИХ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ КЛАСУ А МОЛОЗИВА ПОРОДІЛЬ ІЗ ЛЕКТИНАМИ

М. О. Старикович¹, Ю. Я. Кім¹, Л. Б. Янів², В. О. Антонюк¹, Р. С. Стойка¹

¹Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна
e-mail: kit@cellbiol.lviv.ua

²Львівський обласний перинатальний центр
вул. Дж. Вашингтона, 6, Львів 79010, Україна

Досліджували індивідуальні особливості вуглеводних ланцюгів sIgA молозива людини по їхній взаємодії із лектинами. Препарати sIgA отримували із молозива 23-х породіль шляхом 3-разового осадження сульфатом амонію 50% насичення. Для визначення особливостей будови вуглеводних детермінант sIgA молозива породіль був проведений лектино-дот аналіз із використанням набору з 44 лектинів відомої вуглеводної специфічності. Взаємодію вуглеводних детермінант окремих ланцюгів sIgA із лектинами досліджували методом вестерн-блот аналізу. Встановлено, що sIgA молозива клінічно здорових породіль містять вуглеводні групи, до складу яких входять N-ацетил-D-глюкозамін, сіалова кислота, D-маноза. Виявлено індивідуальні відмінності взаємодії вуглеводних детермінант sIgA породіль із лектинами. Зроблено припущення, що ці відмінності характеризують певні особливості будови вуглеводних ланцюгів даних імуноглобулінів, які можуть визначати індивідуальну чутливість організму матері та дитини до патогенної мікрофлори.

Ключові слова: секреторні імуноглобуліни А, молозиво породіль, вуглеводні детермінанти, лектини, лектино-дот аналіз, вестерн-блот аналіз.

ВСТУП

Відомо, що у новонароджених дітей гуморальний імунітет щодо чужорідної мікрофлори не розвинутий і реалізується через секреторні IgA (sIgA) материнського молока [1, 2]. Ці імуноглобуліни продукуються у відповідь на дію чужорідних антигенів на лімфатичну систему кишківника і бронхів. Крім того, вони мають високу антибактерійну й антивірусну активність, забезпечуючи захист слизових оболонок людини від дії патогенних чинників [3, 4]. sIgA є складним молекулярним комплексом, який побудований зі секреторного компонента (SC) і двох молекул IgA (pIgA),

зв'язаних між собою сполучним (J) ланцюгом. [5]. У людини відомо два ізотипи IgA (IgA1 і IgA2) і два алотипи IgA2-IgA2m(1) і IgA2m(2) [5]. Поліпептиди sIgA різних ізо-типів і алотипів є глікозильованими [6]. Ізотипи IgA1 і IgA2 містять консервативні N-глікозильні залишки, розташовані на важких ланцюгах молекули імуноглобуліну. Алотипи IgA2 додатково містять два консервативних N-глікозильних залишки, розміщених на доменах C α 1 і C α 2 важких ланцюгів. Секреторний компонент молекули sIgA є також глікозильованим і містить 7 N-глікозильних залишків, які становлять 25 відсотків від загальної молекулярної маси білка. Молекула IgA1 також має 9 ділянок, які можуть містити O-глікозильні залишки вуглеводів і розташовані у пролін-збагаченому шарнірному регіоні.

Вуглеводні ланцюги молекул sIgA мають спорідненість до деяких білків патогенної мікрофлори і, завдяки цьому, відіграють важливу роль у забезпеченні пасивного імунітету щодо бактерійних і вірусних інфекцій [6–11]. Адгезія патогенних мікроорганізмів до плазматичної мембрани клітин епітелію слизових оболонок людини відбувається через лектиноподібні рецептори. При цьому молекули sIgA за рахунок вуглеводних детермінант можуть зв'язувати мікроорганізми і продукти їхнього метаболізму (токсини), а також блокувати їхню взаємодію з епітеліальними клітинами шлунково-кишкового тракту дитини, сприяючи виведенню патогенних чинників із організму [4, 7]. Наприклад, зв'язування патогенного штаму *Escherichia coli*, здатного викликати сепсис і менінгіт у новонароджених, блокується залишками сіалових кислот вуглеводних ланцюгів молекул sIgA, а фукозильні залишки олігосахаридних детермінант секреторного компонента молекул sIgA конкурують за зв'язування *Helicobacter pylori* із глікопротеїнами плазматичної мембрани клітин слизової оболонки шлунка [8]. Спорідненість вуглеводних груп sIgA до манозоспецифічних лектинів *Escherichia coli* і до токсину A *Streptococcus pneumoniae* також передбачає участь цих імуноглобулінів в елімінаванні патогенних чинників із організму людини [9–11]. Отже, sIgA можуть відігравати важливу роль у забезпеченні вродженого імунітету людини.

Клінічні спостереження свідчать про те, що у людини проявляється індивідуальна чутливість до дії патогенної мікрофлори. Оскільки слизові оболонки людини формують первинний бар'єр захисту організму від патогенних чинників, можна припустити, що одним із факторів індивідуальної чутливості людини до дії патогенних мікроорганізмів можуть бути відмінності у ступені глікозилювання молекул sIgA, а також особливості будови вуглеводних детермінант цих імуноглобулінів.

Метою даної роботи було дослідити індивідуальні особливості взаємодії вуглеводних ланцюгів sIgA молозива породіль із 44 лектинами, які мають відмінності у структурі цих ланцюгів.

МЕТОДИ І МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Отримання сумарних фракцій імуноглобулінів із молозива породіль.

Зразки молозива (2 мл) отримували відповідно до договору про науково-методичну співпрацю у Львівському обласному перинатальному центрі МОЗ України. Для виділення імуноглобулінів (Ig) молозиво центрифугували протягом 20 хв при 2000 g, після чого відділяли ліпідну та клітинну фракції. Препарати Ig отримували триразовим переосадженням білків молозива сульфатом амонію 50% насичення [12]. Для цього до 0,5 мл молозива додавали краплями 0,5 мл насиченого розчину сульфату амонію й осаджували Ig центрифугуванням при 2000 g упродовж 5 хв. Осад розчиняли в 0,5

мл дистильованої води й Ig повторно осаджували 50%-м сульфатом амонію. Після триразового переосадження фракції Ig діалізували протягом 18 год проти забуференого фізіологічного розчину (ЗФР) (0,01 М Na_2HPO_4 , 0,01 М NaH_2PO_4 , 145 М NaCl , рН 7,4). Концентрацію білка у зразках вимірювали на спектрофотометрі NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, США).

Білковий склад отриманих препаратів АТ аналізували електрофорезом у градієнті концентрації поліакриламідного гелю (ПААГ) (6–17,5%) за присутності 0,1% додецилсульфату натрію (SDS) [13]. Препарати Ig зберігали при -20°C за присутності 10% гліцерину (Sigma, США).

Лектинодот-аналіз вуглеводних детермінант поліпептидів sIgA. Для визначення особливостей будови вуглеводних детермінант sIgA молозива породіль було розроблено спеціальну тест-систему. На нітроцелюлозні мембрани наносили по 2 мкл лектинів на точку, робоча концентрація яких становила 5 мкг/мл. Мембрани інкубували при 4°C упродовж 18 год у буфері А (3% бичого сироваткового альбуміну (BSA) у ЗФР у присутності 10 мМ MgCl_2 , 10 мМ CaCl_2). Після цього мембрани двічі промивали ЗФР. Досліджувані препарати Ig розводили у ЗФР до концентрації 30 мкг/мл та інкубували з мембранами упродовж 1 год при 37°C . Відмивали мембрани розчином 0,05% Tween-20 у ЗФР упродовж 1 год при 23°C . У подальшому мембрани інкубували у розчині (1:4000) протеїну А, кон'югованого з пероксидазою хрому, упродовж 1 год при 37°C . Мембрани промивали 3 рази у ЗФР і зв'язування імуноглобулінів з лектинами визначали за забарвленням у розчині діамінобензидин/ H_2O_2 . Напівкількісну оцінку здійснювали за інтенсивністю забарвлених плям.

Вестерн-блот аналіз препаратів sIgA. sIgA молозива породіль розділяли за допомогою вертикального денатуруючого електрофорезу в ПААГ згідно з методом, запропонованим Леммлі [13]. Концентрація поліакриламідну в концентруючому гелі становила 4%, а в розділяючому – 12%. У лунки гелю вносили 30 мкг білка. Електрофорез проводили у Tris-гліциновому буфері, рН 8,3 (25 мМ Tris, 192 мМ гліцину, 0,1% SDS) протягом 3–4 год, на приладі Mini-PROTEAN II (BioRad, Швеція). Молекулярну масу білків визначали, використовуючи набір білкових маркерів з відомою молекулярною масою (Fermentas, Литовська Республіка).

Перенесення білків із ПААГ на нітроцелюлозну мембрану проводили в апараті Mini Trans-Blot Cell (BioRad, Швеція) при напрузі 100 В протягом 90 хв у буфері для переносу (0,192 М гліцин, 0,1% ДСН, 20% метанол, 0,025 М Tris, рН 8,3).

Для визначення специфічності вуглеводних детермінант sIgA, після переносу білків з гелю, нітроцелюлозну мембрану блокували 0,1% розчином BSA у ЗФР впродовж 1 год при 23°C . Мембрану промивали тричі розчином 0,05% Tween-20 у ЗФР. Мембрани інкубували з кон'югатами лектин-пероксидаза хрому (5 мкг/мл) протягом 1 год при 37°C , тричі промивали у ЗФР і положення вуглеводних груп sIgA виявляли за фарбуванням розчином діамінобензидин/ H_2O_2 .

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Загальна характеристика препаратів Ig молозива породіль. Результати електрофорезу у поліакриламідному гелі за денатуруючих умов показали, що досліджувані препарати Ig містять поліпептиди молекулярною масою 80, 62, та 25 кДа (рис. 1), які відповідають секреторному компоненту (SC), важким (H) і легким (L)

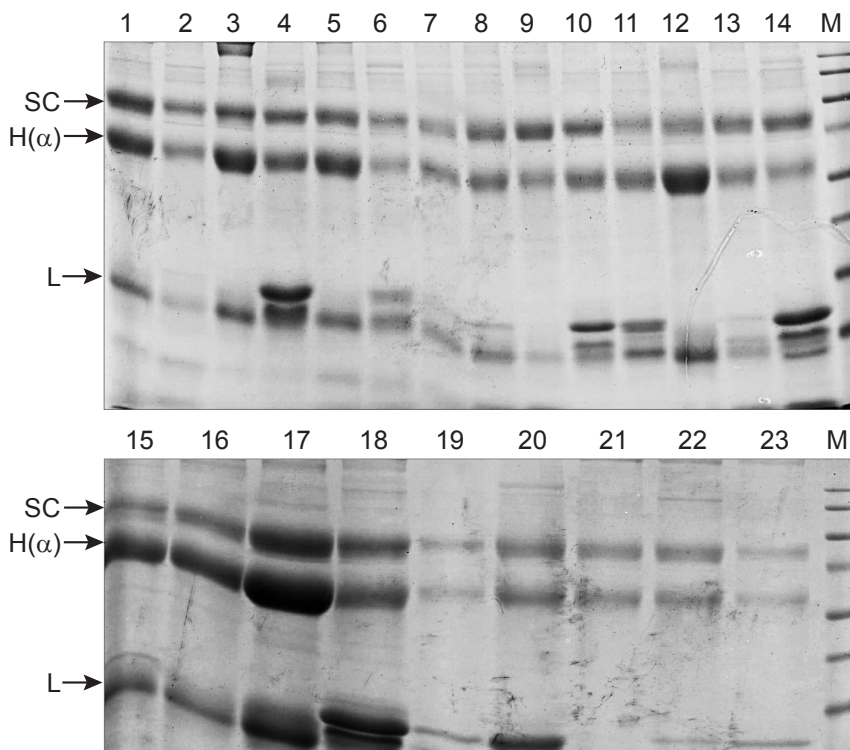


Рис. 1. Електрофорез у градієнті концентрації ПААГ (6–17,5%) у присутності 0,1% SDS, зразків sIgA отриманих із молозива породіль.

1–23 – препарати Ig молозива породіль. М – стандарти молекулярних мас білків

Fig.1. Electrophoresis in gradient (6–17,5%) PAAG in the presence of 0,1% SDS of the preparations of sIgA obtained from colostrum.

1–23 – sIgA preparations of different donors. M – molecular mass markers of proteins

ланцюгам імуноглобулінів класу sIgA [5]. Виявлення цих поліпептидів вказує на те, що препарати Ig, отримані із молозива породіль триразовим осадженням сульфатом амонію, містять секреторний IgA достатньої чистоти. У подальшому ці препарати було використано для аналізу олігосахаридних детермінант sIgA.

Характеристика вуглеводних ланцюгів sIgA молозива породіль. Для характеристики вуглеводних детермінант sIgA було розроблено тест-систему, яка базується на використанні лектинів рослинного і тваринного походження, які вибірково взаємодіють із олігосахаридами певного складу і будови [14, 15]. Основою цієї тест-системи є лектино-дот аналіз, який застосовують для визначення антигенної специфічності антитіл [16]. На нітроцелюлозну мембрану наносили зразки 44 лектинів, характеристику яких наведено у табл. 1. Спорідненість sIgA щодо лектинів визначали за допомогою кон'югатів Protein A-HRP, як описано у розділі „Методи і матеріали”. Для контролю за неспецифічною взаємодією мембрану інкубували безпосередньо з цим білком. Встановлено, що кон'югат Protein A-HRP зв'язується з ConA, PFA-f, PFA-c, AIL, ACA (рис. 2, а плями 4A, 4C, 4D, 5E, 5F). У подальшому ці дані було враховано при аналізі взаємодії лектинів з препаратами антитіл. На рис. 2, б,

Таблиця 1. Характеристика використаних лектинів

Table 1. Characteristics of utilized lectins

Абревіатура	Походження	Вуглеводна специфічність
RCA-120	Аглютинін насіння рицини звичайної	D-галактоза
ML-1	Листя омели білої	D-галактоза
SBA	Насіння сої	D-галактоза
LVFA	Плодові тіла хряща – молочника пергаментного	D-галактозовмісні олігосахариди
VSA	Насіння вики посівної	D-глюкоза, D-маноза
PSL	Насіння гороху	D-глюкоза, D-маноза
ConA	Насіння канавалії меченосної	D-глюкоза, D-маноза
LCL	Насіння сочевиці	D-глюкоза, D-маноза
LTA	Насіння тетрагонолобуса пурпурового	L-фукоза
PFA-f	Ікра окуня	L-фукоза
LLA	Ікра судака	L-фукоза
LABA	Кора золотого дощу звичайного	L-фукоза
LASA	Насіння золотого дощу звичайного	L-фукоза
SRA	Кора бузини червоної	N-ацетил-D-галактозамін
SIA	Насіння софори японської	N-ацетил-D-галактозамін
RCA-60	Токсин насіння рицини звичайної	N-ацетил-D-галактозамін
HPL	Виноградний слимак	N-ацетил-D-глюкозамін
RPBA	Кора білої акації	N-ацетил-D-глюкозамін
CABL-2	Кора карагана деревоподібного	N-ацетил-D-глюкозамін
DSA	Насіння дурману	N-ацетил-D-глюкозамін
SBA	Насіння сої	N-ацетил-D-глюкозамін
CNFA	Плодові тіла грузлика димчастого	N-ацетил-D-глюкозамін
LSFA	Плодові тіла трутовика сірчано-жовтого	N-ацетиллактозамін
SNA	Кора бузини чорної	N-ацетиллактозамін, лактоза
STA	Бульби картоплі	α -N-ацетилглюкозамін
UDA	Кореневище кропиви	α -N-ацетилглюкозамін
PAA	Корінь фітолаки американської	α -N-ацетилглюкозамін
LBA	Насіння квасолі лімської	α -метил-N-ацетил-D-галактозамін
PHA-P	Фітогемаглютинін квасолі звичайної	β ,1-4-глюкозо-N-ацетил- β -маноза
PHA-E	Еритроглютинін квасолі звичайної	β ,1-4-глюкозо-N-ацетил- β -маноза
AIL	Насіння хлібного дерева	β -D-галактопіранозид>> α -D-галактопіранозид
PNA	Насіння арахісу	Антиген Томсона-Фріденрайха
ACA	Насіння щиріці хвостатої	Антигени Томсона-Фріденрейха
PMRL⁺	Кореневища купини багатоквіткової	Олігомери манози
HNA	Цибулини амариліса	Олігомери манози
LVA	Цибулини білоцвіту весняного	Олігомери манози
CVA	Цибулини крокуса весняного	Олігомери манози
NPA	Цибулини нарциса несправжнього	Олігомери манози
GNA	Цибулини підсніжника білосніжного	Олігомери манози
CHA	Деревний равлик	Сіалова кислота
WGA	Зародки пшениці	Сіалова кислота, N-ацетил-D-глюкозамін
PMRL⁻	Кореневища купини багатоквіткової	Сіалова кислота, хітобіоза
EEL	Кора бруслини європейської	Фукозовмісні олігосахариди
PFA-c	Ікра окуня	Целобіоза

Примітки: (>>) – має значно більшу афінність.

Note: (>>) – has better affinity.

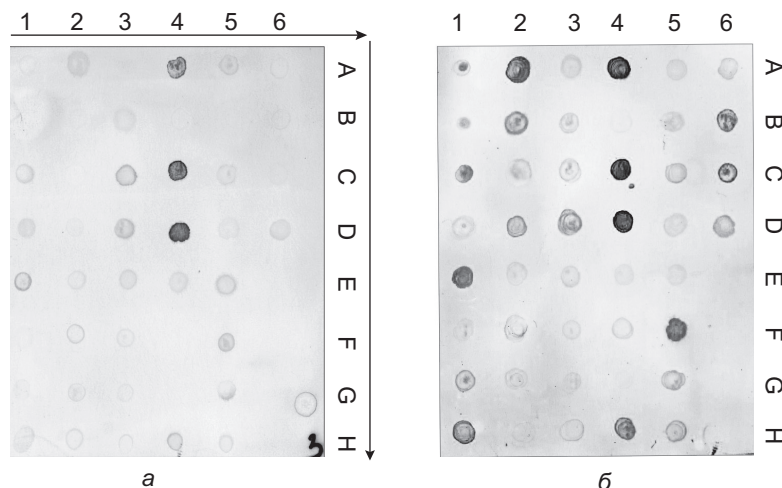


Рис. 2. Лектино-дот аналіз із використанням імуноглобулінів молозива породіль і лектинів відомої вуглеводної специфічності:

а – 0 контроль, мембрана інкубована лише з розчином білка А, кон'югованого із пероксидазою хрому. *б* – мембрана типового досліді оброблена препаратом імуноглобуліну (№ 21) з наступною візуалізацією білком А, кон'югованого із пероксидазою хрому. Стрілками вказано порядок нанесення лектинів (1А-Н (табл. 2, лектини № 1–8); 2А-Н (табл. 2, лектини № 9–16); 3А-Н (табл. 2, лектини № 17–24) тощо)

Fig. 2. Lectin-dot analysis of slgA preparation by using lectins with known carbohydrate specificity.

a – membrane was incubated only with solution of protein A-horseradish peroxidase conjugate (control). *b* – membrane was incubated in the presence of the preparation of slgA of donor N21 followed by its treatment with protein A-horseradish peroxidase conjugate. Arrows indicate the position of lectins applied onto the membrane (1 A-H (tabl. 2 lectins N1–8), 2 A-H (tabl. 2 lectins N9–16), 3 A-H (tabl. 2 lectins N17–24), respectively)

представлено типову лектинограму препарату slgA № 21, який, головним чином, зв'язується із лектинами CHA, PSL, RCA-60, PHA-e, PHA-p, ML-1, LVFA (найбільш забарвлені плями 1С, 1Е, 1Н, 2А, 2В, 6В, 6С) та HPL, WGA, BSA, RCA-120, LCL, HNA, PMRL+, LSFA (менш забарвлені плями 1А, 1В, 1Г, 2D, 3В, 3D, 6D).

Результати обстеження зразків молозива 23-х клінічно здорових породіль наведено в табл. 2. Аналіз цих результатів свідчить, що імуноглобуліни молозива клінічно здорових породіль, головним чином, зв'язуються із лектинами, специфічними щодо вуглеводних залишків N-ацетил-D-глюкозаміну, сілової кислоти, D-манози. При цьому спостерігали значну різноманітність імуноглобулінів щодо інтенсивності зв'язування з лектинами із подібною вуглеводною специфічністю.

Спорідненість лектинів до вуглеводних ланцюгів глікопротеїнів визначається не лише складом цих ланцюгів (вміст тих чи інших вуглеводів), але й їх просторовою будовою [14, 15]. Отримані дані дозволяють припустити, що секреторні імуноглобуліни породіль виявляють суттєві індивідуальні відмінності у будові вуглеводних ланцюгів.

Відомо, що у молекулі slgA усі 4 поліпептиди є глікозилітованими [6]. Тому було важливо дослідити, які саме поліпептиди цих імуноглобулінів є найбільш варіабельними за будовою вуглеводних детермінант. Для дослідження було вибрано більше 3 препаратів Ig молозива породіль. Аналіз здійснювали за допомогою вестерн-блоту з використанням кон'югатів лектин-пероксидаза хрому [17]. Встановлено, що лектин насіння сої (SBA), специфічний до D-галактози і N-ацетил-D-галактозаміну, та лектин зародків пшениці (WGA) зі спорідненістю до N-ацетил-D-

Таблиця 2. Характеристика вуглеводної специфічності sIg, отриманих із молозива породіль

Table 2. Characteristics of carbohydrate determinants of sIgA isolated from colostrum of parturient women

		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	HPL			++	++			+	+	+	+		+	+	+			+					+	+	+
2	WGA			+	+	+		+	+	+	+		+	+		+		+	+		+		+		
3	CNA		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	+		++	+	+
4	STA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	PSL			++	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	++	+
6	SBA					++																			
7	VSA													+										+	
8	RCA60										+			+				+					+	++	+
9	PHA-E			++	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+
10	PHA-P			+	+	+					+	+		+				+				+	++	+	
11	LBA										+								+						
12	RCA120			+	+	+	+		+	+	+	+	+	+			+		+	+	+	+	+	+	+
13	SRA																								
14	GNA																								
15	CNFA																								
16	LVA																								
17	UDA						+																		
18	LCA		+	+	+						+	+											+	+	
19	HHA		+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	RMRL+			++	++		+	+	++	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	RMCL-																								
22	NPA																								
23	PAA																								
24	CVA																								
25	ConA	+																							
26	DSA																								
27	PFA-f	+																							
28	PFA-0	+																							
29	EEL																								
30	LTA																								
31	LLA					+						+													
32	LABA		+	+				+	+		+	+		+				+			+		+		+
33	LASA					+					+														
34	SBA																								
35	PNA																								
36	CABL-2																								
37	ACA	+																							
38	AIL	+																							
39	RPSA			+	++	+					+														
40	SJA		+	+	+	+					+		+	+				+							
41	SNA																								
42	ML-1					+				+	+													++	
43	LVFA																							++	
44	LSFA							+	+	+	+													+	

Примітка: 0 – контроль, 1–23 – зразки Ig молозива породіль, () – відсутність, (+) – низький, (++) – високий рівень взаємодії sIg з відповідним лектином.

Note: 0 is control, 1–23 sIgA from the colostrums of clinically healthy parturient women, () is absence, (+) – low, (++) is a high level of interaction of sIg with lectins.

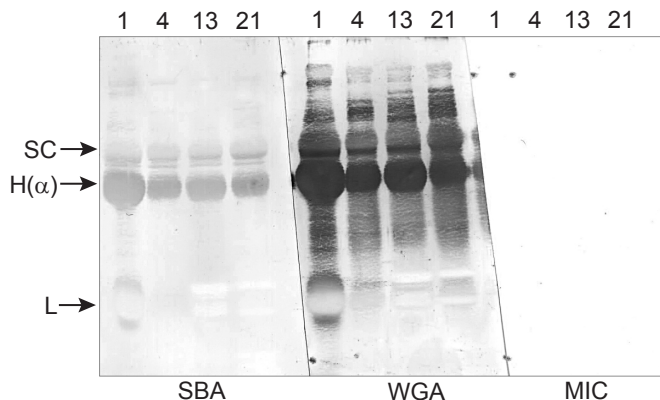


Рис. 3. Вестерн-блот аналіз sIgA, отриманих із молозива породіль, із використанням кон'югатів лектин-пероксидаза хропу:

SBA – лектин сої, WGA – лектин зародків пшениці, MIC – лектин міцени. 1, 4, 13, 21 – препарати імуноглобулінів. Стрілками вказано розміщення поліпептидів sIgA на мембрані. SC – секреторний компонент, H(α) – важкі ланцюги, L – легкі ланцюги

Fig. 3. Western-blot analysis of carbohydrate chains of colostrum sIgA by using lectin – horseradish peroxidase conjugates.

SBA – soybean lectin, WGA – wheat germ agglutinin, MIC – mycena lectin. 1, 4, 13, 21 – different sIgA preparations. Arrows show the position of polypeptides of sIgA on the membrane: SC – secretory component, H(α) – heavy chains, L – light chains

глюкозаміну та сіалової кислоти, головним чином, зв'язуються зі секреторним компонентом і важкими ланцюгами sIgA (рис. 3). У той же час, лектин міцени, що володіє спорідненістю до складних тетра-антенних залишків олігосахаридів, не зв'язувався з жодним із поліпептидів sIgA.

Дещо інший розподіл вуглеводних груп спостерігали в sIgA, коли для аналізу використовували лектини насіння гороху (PSL) і вики (VSA), що володіють спорідненістю до олігосахаридів, у складі яких містяться залишки D-манози та N-ацетил-D-глюкозамін. Як видно з рис. 4, PSL має спорідненість, головним чином, до секреторного компонента і легких ланцюгів, а VSA – лише до секреторного компонента sIgA. У випадку використання PSL спостерігали суттєві відмінності щодо зв'язування лектину з легкими ланцюгами sIgA молозива окремих породіль.

Для перевірки специфічності зв'язування лектинів з поліпептидами sIgA було досліджено зв'язування лектину PSL за присутності й відсутності конкурентного інгібітора – D-манози (рис. 5). Встановлено, що за присутності 100 мМ D-манози відбувається повне інгібування зв'язування цього лектину із важкими ланцюгами і часткове інгібування його взаємодії зі секреторним компонентом sIgA. Отримані результати свідчать про те, що у зв'язування лектину PSL із важкими ланцюгами sIgA залучені залишки D-манози. Часткове інгібування зв'язування секреторного компонента sIgA з лектином за присутності 100 мМ D-манози може вказувати на високу спорідненість лектину гороху до манозильних залишків цього поліпептиду, проте для остаточного підтвердження цього припущення необхідно провести додаткове дослідження.

Отримані нами результати свідчать, що sIgA молозива окремих породіль відрізняються за спорідненістю до лектинів, що може бути пов'язано з особливостями

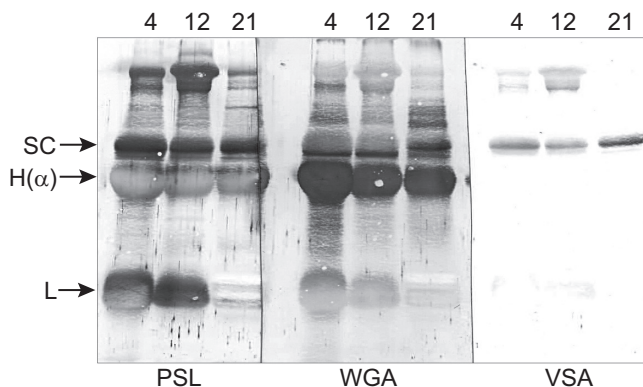


Рис. 4. Вестерн-блот аналіз sIgA, отриманих із молозива породіль:

PSL – лектин гороху, WGA – лектин зародків пшениці, VSA – лектин вики. 4, 12, 21 – препарати імуноглобулінів. Стрілками вказано розміщення поліпептидів sIgA на мембрані. SC – секреторний компонент, H(α) – важкі ланцюги, L – легкі ланцюги

Fig. 4. Western-blot analysis of carbohydrate chains of colostrum sIgA by using lectin - horseradish peroxidase conjugates.

PSL – peanut lectin, WGA – wheat germ agglutinin, VSA – vetch lectin. 4, 12, 21 – preparations of sIgA. Arrows show the position of polypeptides of sIgA on the membrane: SC – secretory component, H(α) – heavy chains, L – light chains

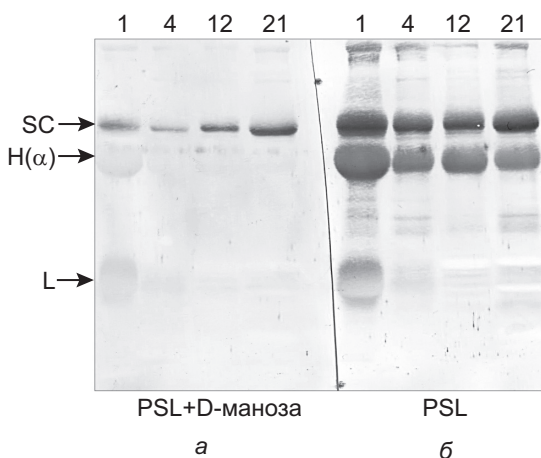


Рис. 5. Вестерн-блот аналіз sIgA, отриманих із молозива породіль, із кон'югатом лектин-пероксидаза хропу:

а – мембрану інкубували із кон'югатом PSL – пероксидаза хропу в присутності 10 мМ D-манози; б – мембрану інкубували із кон'югатом PSL – пероксидаза хропу у відсутності D-манози. 1, 4, 12, 21 – препарати імуноглобулінів.

Стрілками вказано розміщення поліпептидів sIgA на мембрані. SC – секреторний компонент, H(α) – важкі ланцюги, L – легкі ланцюги

Fig. 5. Western-blot analysis of carbohydrate chains of colostrum sIgA by using PSL – horseradish peroxidase conjugate in the presence or in the absence of the competitor. PSL – horseradish peroxidase conjugate:

а – the membrane was incubated in the presence of 10 mM D-mannose (competitor); б – the membrane was incubated in the absence of 10 mM D-mannose. Arrows show the position of polypeptides of sIgA on the membrane: SC – secretory component, H(α) – heavy chains, L – light chains

будови вуглеводних детермінант цих імуноглобулінів. Для більш детального з'ясування цих відмінностей необхідно провести структурний аналіз вуглеводних детермінант. При цьому означені відмінності можуть бути зумовлені індивідуальними особливостями синтезу вуглеводних залишків секреторних імуноглобулінів у людини.

Оскільки відомо, що вуглеводні детермінанти секреторних імуноглобулінів відіграють важливу роль у гуморальному захисті слизових оболонок людини від бактерійних і вірусних інфекцій, можна припустити, що особливості будови вуглеводних залишків секреторних імуноглобулінів людини можуть впливати на індивідуальну чутливість людини до інфекцій.

Подяки

Автори висловлюють подяку за допомогу в розробці лектин-ензимного тесту співробітникам відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України І. Магорівській, к.б.н. Р. Білому та к.б.н. Є. Філяку.

Робота здійснювалася за фінансової підтримки Західно-Українського біомедичного дослідницького центру (WUBMRC, 2008–2009 pp.) та спільного проекту НАН України і Сибірського відділення Російської АН.

1. **Immunology of breast milk**. Ed.: Pearay L., Ogra M.D., Delbert H., Dayton M.D. Raven Press. New York, 1979. 284 p.
2. *Taskalova-Hogenova H., Stepankova R., Hudcovic T. et al.* Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. **Immunol. Lett**, 2004; 93: 97–108.
3. *Каньшкова Т.Г., Бунева В.А., Невинский Г.А.* Биологические функции молока человека и его компонентов. **Успехи совр. биологии**, 2002; 122 (3): 259–271.
4. *Lamm M.E.* Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. **Annu Rev. Microbiol**, 1997; 51: 311–340.
5. **Иммуноглобулины**. Под ред. Г. Леитмена и Р. Гуда. М.: Мир, 1981. С. 212–230.
6. *Royle L., Roos A., Harvey D.J. et al.* Secretory IgA N- and O-Glycans provide a link between the innate and adaptive Immune Systems. **J. Biol.Chem**, 2003; 278 (22): 20140–20153.
7. *Schroten H., Stapper C., Plogmann R. et al.* Fab-independent antiadhesion effects of secretory immunoglobulin A on S-fimbriated *Escherichia coli* are mediated by sialyloligosaccharides. **Infect. Immun**, 1998; 66: 3971–3978.
8. *Sharon N, Ofek I.* Safe as mother's milk: carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. **J. Glycoconj**, 2000; 17: 659–64.
9. *Wold A. E., Mestecky J., Tomona M. et al.* Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. **Infect. Immun**, 1990; 58: 3073–3080.
10. *Arnold J. N.* Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease / J. N. Arnold, R.A. Dwek, P. M. Rudd, B. Sima // **Immunol. Lett**, 2006; 106 (3): 103–110.
11. *Nicholas J.* Oligosaccharide side chains on human secretory IgA serve as receptors for ricin / N. J. Mantis, S.A. Farrant, S. Mehta. **J. Immunol**, 2004; 172(6): 6838–6845.
12. *Брок И.* Получение препаратов иммуноглобулинов. В кн.: **Иммунологические методы** / Под ред. Г. Фримеля. М.: Медицина, 1970. С. 391–392.
13. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 15 (6): 680–685.
14. *Луцик М.Д., Панасюк Е.П., Луцик А.Д.* Лектини. Львів: Вища Школа, 1981. 152 с.
15. *Антонюк В.О.* **Лектини та їх сировинні джерела**. Львів: ПП „Кварт”, 2005. 554 с.
16. *Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М.* **Теория и практика иммуноферментного анализа**. Москва: Высшая школа, 1991. 287 с.
17. *Bilyy R., Kit Y. Y., Hellman U. et al.* In vivo expression and characteristics of novel alpha-D-mannose-rich glycoprotein markers of apoptotic cells. **Cell Biol. Int**, 2005; 29 (5): 1–9.

CHARACTERISTICS OF INTERACTION OF LECTINS WITH CARBOHYDRATE DETERMINANTS OF SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A (sIgA) ISOLATED FROM COLOSTRUM OF PARTURIENT WOMEN

M. O. Starykovych¹, Yu. Ya. Kit¹, L. B. Yaniv², V. O. Antonyuk¹, R. S. Stoika¹

*¹Institute of Cell Biology NAS of Ukraine
14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

*²Lviv Regional Perinatal Center,
6, G. Washington St., Lviv 79010, Ukraine*

Secretory immunoglobulin A (sIgA) contains glycoconjugates moieties which can be involved in humoral immunity providing antimicrobial defense. The aim of present work was to characterize carbohydrate moieties of sIgA isolated from human colostrum via their interaction with specific lectins. Preparations of sIgA were obtained from 23 colostrums samples of parturient women by 3-fold precipitation with in ammonium sulphate 50% saturation. In the study a panel of 44 lectins of known carbohydrate specificity was used immobilized onto nitrocellulose membrane. The panel was incubated with sIgA preparations and lectin-antibody complexes were detected by protein-A conjugated with horseradish peroxidase. Western-blot analysis was applied to characterize glycosylated polypeptides of sIgA isolated from colostrum of parturient women. sIgA from the colostrum of clinically healthy parturient women contained mainly carbohydrate moieties consisting of N-acetyl-D-glucosamine, sialic acid and D-mannose. Substantial differences in interaction of carbohydrate determinants of sIgA isolated from colostrum of individual parturient women with the lectines were found. It is proposed that such characteristics can define sensitivity of mother and child to the action of pathogenic microflora.

Key words: secretory immunoglobulin A (sIgA), colostrum parturient women, carbohydrate determinants, lectins, dot-blot (lectin-enzymatic) analysis, Western-blot analysis.

ОСОБЕННОСТИ ВЗАЕМОДЕЙСТВИЯ УГЛЕВОДНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ СЕКРЕТОРНЫХ ИМУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА А МОЛОЗИВА РОЖЕНИЦ С ЛЕКТИНАМИ

М. О. Старикович¹, Ю. Я. Кит¹, Л. Б. Янив², В. О. Антонюк¹, Р. С. Стойка¹

*¹Институт биологии клетки НАН Украины
ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина*

*²Львовский областной перинатальный центр
ул. Дж. Вашингтона 6, Львов, 79010, Украина*

Целью работы было исследовать индивидуальные особенности строения углеводных остатков sIgA молозива человека по взаимодействию с лектинами. Препараты sIgA получали из молозива 23-х рожениц 3-разовым осаждением сульфатом аммония 50% насыщения. Был проведен лектино-дот анализ, который за-

ключался в нанесении на нитроцеллюлозную мембрану 44-х лектинов известной углеводной специфичности и инкубации с препаратами sIgA с последующим выявлением комплексов лектин-антитело с помощью белка А, конъюгированного с пероксидазой хрена. Характер гликозирования полипептидов sIgA у отдельных рожениц определяли вестерн-блот анализом с использованием конъюгатов лектина с пероксидазой хрена. Установлено, что sIgA молозива клинически здоровых рожениц, главным образом, содержат углеводные остатки, в состав которых входят N-ацетилглюкозамин, сиаловая кислота, D-манноза. Были обнаружены существенные отличия в строении углеводных детерминант sIgA у отдельных рожениц. Сделано предположение, что особенности структуры этих детерминант могут влиять на индивидуальную чувствительность организма матери и ребенка к действию патогенной микрофлоры.

Ключевые слова: секреторные иммуноглобулины А, молозиво рожениц, углеводные детерминанты, лектины, лектино-дот анализ, вестерн-блот анализ.

Одержано: 26.03.2009