

ІМУНОГЛОБУЛІНИ МОЛОЗИВА ЯК МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ ДОКЛІНІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ АВТОІМУННИХ ПОРУШЕНЬ У ПОРОДІЛЬ

Ю. Я. Кім¹

М. О. Старикович¹

Р. О. Білий¹

Н. Р. Скорохід¹

Л. Б. Янів²

Р. С. Стойка¹

¹Інститут біології клітини НАН України, Львів

²Львівський обласний перинатальний центр

E-mail: kit@cellbiol.lviv.ua

З метою виявлення нових молекулярних маркерів автоімунних порушень у породіль проаналізовано антигенну специфічність, каталітичну і цитотоксичну активність імуноглобулінів, одержаних із молозива 25 клінічно здорових породіль осадженням цих білків 50% -м сульфатом амонію. Встановлено, що препарати імуноглобулінів суттєво відрізняються між собою за цитотоксичною активністю щодо лейкемічних Т-клітин лінії Jurkat, здатністю гідролізувати плазмідну ДНК та гістон H1, а також за вмістом авто-АТ до дволанцюгової ДНК та гістонів. Зроблено висновок про те, що функціональні властивості імуноглобулінів молозива залежать від індивідуальних особливостей стану гуморального імунітету у породіль. Ці властивості можуть бути використані для комплексного визначення пов'язаних із вагітністю та пологами ранніх автоімунних порушень у жінок.

Ключові слова: молозиво здорових породіль, імуноглобуліни, цитотоксична активність, каталітична активність, рівень авто-АТ.

Імунна система ссавців не тільки забезпечує захист організму від впливу шкідливих чинників довкілля, але й задіяна у регуляції біологічних функцій, які визначають його гомеостаз [1]. У підтриманні гомеостазу важливу роль відіграють антитіла (АТ), спрямовані як до чужорідних антигенів, так і до антигенів власного організму (авто-АГ). Антитіла, які взаємодіють з авто-АГ, мають назву аутологічних антитіл (авто-АТ) [1,2]. Авто-АТ виявлено як в організмі клінічно здорових людей, так і в осіб з автоімунними захворюваннями [3]. У клінічно здорових людей авто-АТ представлені, головним чином, низькоафінними поліспецифічними імуноглобулінами класу М або високоспецифічними низькоафінними імуноглобулінами класу G (антиідіотипні АТ), що залучені до регуляції імунної відповіді [3, 4]. У пацієнтів з автоімунними захворюваннями виявлено високоспецифічні авто-АТ класу IgG, які можуть безпосередньо брати участь

у розвитку автоімунних захворювань [5]. Визначення вмісту цих авто-АТ у сироватці крові людей було використано для діагностики різних автоімунних захворювань, а також для прогнозування розвитку хвороби [6].

Масштаби пошуку молекулярних маркерів автоімунних порушень у людини значно розширилися після відкриття каталітично активних авто-АТ, здатних каталізувати гідроліз авто-АГ [7]. Каталітично активні антитіла, які називають натуральними абзимами, можна класифікувати за їхньою субстратною специфічністю на низькоспецифічні та високоспецифічні. Низькоспецифічні абзими, що здатні гідролізувати ДНК, РНК та синтетичні олігонуклеотиди, було виявлено у сироватці крові хворих на автоімунні та деякі інші захворювання, а також у молоці й молозиві клінічно здорових жінок [8]. Вони отримали назву ДНК-зимів. Окрім каталітичної активності, характерною ознакою ДНК-зимів є висока цитотоксична

активність їх щодо пухлинних і трансформованих клітин та активованих лімфоцитів людини [9, 10]. Оскільки у сироватці крові клінічно здорових людей ДНК-зими не виявлено, їхня присутність в організмі людей свідчить про порушення, що можуть призводити до розвитку автоімунних захворювань [8, 11].

Прикладом високоспецифічних каталітичних авто-АТ є абзими із протеолітичною активністю, що отримали назву протабзимів [8]. Каталітична активність протабзимів, виявлених у сироватці крові людей з автоімунними захворюваннями, спрямована переважно на гідроліз авто-АГ, задіяних у розвитку того чи іншого захворювання. Наприклад, у хворих на гострий алергічний тироїдит антитиреоглобулінові авто-АТ здатні гідролізувати тиреоглобулін. У хворих на алергічний міокардит виявлено авто-АТ, які гідролізують міозин, а у хворих на розсіяний склероз — авто-АТ з гідролізуючою активністю щодо основного білка мієліну [12]. Вузька субстратна специфічність робить протабзими перспективними молекулярними маркерами у прогнозуванні розвитку автоімунних захворювань [8].

Відомо, що зміни в гормональному та імунному статусі жінок, пов'язані з вагітністю, пологами та лактацією, можуть призводити до розвитку автоімунних захворювань [13]. Унаслідок порушення автоімунної толерантності в організмі жінки з'являються високоспецифічні авто-АТ та абзими, визначення вмісту яких може бути корисним для прогнозування виникнення автоімунних захворювань.

Оскільки лактація є частиною репродуктивного циклу жінки, функціональна активність імуноглобулінів молозива та молока може відображати індивідуальні особливості стану її гуморального імунітету. У молозиві людини присутні усі класи імуноглобулінів [14]. Серед імуноглобулінів молока виявлено високоафінні та поліреактивні авто-А, а також абзими з різною каталітичною активністю [15, 16, 17]. Подібно до авто-АТ та абзимів сироватки крові вони можуть функціонувати як фактори імунного захисту або як патогенні чинники. Окрім того, функціональна активність імуноглобулінів може реалізуватися через взаємодію їх із білками молока, здатними впливати на проліферацію, диференціацію та апоптоз клітин різного типу [14]. Утворення комплексів із цими білками може змінювати функціональну активність імуноглобулінів та активність самих комплексуювальних білків.

Наведені вище аргументи свідчать про те, що функціональна активність імуноглобулінів молозива може вказувати на зміни у гуморальному імунітеті породіль. Ці властивості можуть бути використані для комплексного визначення пов'язаних із вагітністю та пологами ранніх автоімунних порушень у жінок. У роботі наведено результати аналізу антигенної специфічності, цитотоксичної та каталітичної активності препаратів імуноглобулінів, одержаних із молозива 25 клінічно здорових породіль.

Матеріали і методи

Препарати Ig із молозива породіль

Зразки молозива (2 мл) отримували у Львівському обласному пренатальному центрі МОЗ України. Для виділення антитіл (АТ) молозиво центрифугували протягом 20 хв при 2000 g, після чого відділяли ліпідну та клітинну фракції. Препарати Ig одержали триразовим переосадженням білків молозива 50%-м сульфатом амонію [18]. Для цього до 0,5 мл молозива додавали краплями 0,5 мл насиченого розчину сульфату амонію і осаджували Ig центрифугуванням при 2 000 g упродовж 5 хв. Осад розчиняли в об'ємі 0,5 мл дистильованою водою і повторно осаджували Ig 50%-м сульфатом амонію. Після триразового переосадження фракції Ig протягом 18 год діалізували проти забуференого фосфатного розчину (ЗФР) (0,01 M Na₂HPO₄, 0,01 M NaH₂PO₄, 0,145 M NaCl, pH 7,4). Концентрацію білка у препаратах визначали за методом Лоурі [19]. Білковий склад отриманих препаратів аналізували електрофорезом у градієнті концентрації ПААГ (6–17,5%) у присутності 0,1% SDS [20]. Препарати Ig зберігали при –20 °C у присутності 10%-го гліцеролу (Sigma, США).

Вплив препаратів Ig на ріст клітин у культурі

У роботі використовували лейкомічні Т-лімфоцити людської лінії Jurkat, одержані з колекції Інституту експериментальної патології, онкології та радіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (Київ). Клітини культивували у флаконах Карреля у середовищі RPMI-1640 (Sigma, США) у присутності 10%-ї ембріональної сироватки (Sigma, США) та 50 мкг/мл гентаміцину (Sigma, США) до досягнення клітинами субконфлюентного стану. Для дослідів висівали $6,5 \cdot 10^5$ клітин у 96-лункові планшети і після 2 год інкубації у лунки додавали Ig у кінцевій концентрації 0,7 мг/мл та інкубували

упродовж 24 год. Для визначення життєздатності клітин використовували тест із фарбуванням мертвих клітин 0,1%-м водним розчином трипанового синього.

Вміст АТ зі спорідненістю до ДНК та гістонів

Для визначення вмісту антитіл зі спорідненістю до дволанцюгової ДНК (анти-дДНК АТ) та гістонів (антигістонови АТ) у препаратах Ig застосовували метод імуноферментного аналізу (ІФА). Антигенами слугували ДНК тимуса теляти (Sigma, США) та препарат тотальних гістонів із тимуса теляти (люб'язно наданий д.б.н. М. Д. Луциком). На полістироловому 96-лунковому планшеті сорбували ДНК (10 мкг/мл) або гістони (2 мкг/мл) упродовж 16 год при 4 °С. Препарати Ig розводили у співвідношенні 1:40 у буфері А (1%-й бичачий сироватковий альбумін у ЗФР) і в об'ємі 200 мкл вносили у лунки із сорбованими антигенами. Інкубацію проводили протягом 2 год при 37 °С, після чого лунки тричі промивали буфером А. У лунки вносили кон'югат білка А з пероксидазою хрому (Sigma, США) у розведенні 1 : 500, інкубували 1 год при 37 °С, після чого промивали буфером А. Як субстрат пероксидазної реакції використовували діамінобензидин. Реакцію зупиняли 1 М ортофосфорною кислотою. Оптичну густину розчину визначали при довжині хвилі 492 нм на спектрофотометрі NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, США). Рівень авто-АТ у лунках вираховували за величиною оптичного поглинання розчину забарвлених продуктів пероксидазної реакції. Визначення проводили у трьох паралельних дослідах. Статистичне опрацювання результатів здійснювали за допомогою комп'ютерної програми OriginPro 7.0.

Каталітична активність препаратів Ig

Каталітичну активність препаратів Ig досліджували за їхньою здатністю гідролізувати плазмідну ДНК та гістон Н1.

Топоізомеразну активність препаратів Ig визначали, як описано [21]. Як субстрат використовували плазмідну рВR 322 (Fermentas, Литва). Для аналізу аліквоти Ig у кількості 5 мкг інкубували із 3 мкг плазмідної ДНК у 20 мМ трис-НСl, 75 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂ упродовж 1 год при 37 °С. Продукти реакції розділяли електрофорезом у 1%-му гелі агарози у трис-борат-ЕДТА буфері, рН 8,6, у присутності 0,001%-го етидію броміду. Гель фотографували при ультрафіолетовому освітленні.

Протеазну активність препаратів Ig визначали згідно [22]. Для цього 5 мкг Ig інкубували із 5 мкг гістону Н1 протягом 2 год при 37 °С у 10 мМ трис-НСl, рН 8,0. Білки розділяли електрофорезом у 12% ПААГ за присутності 0,1% SDS, гелі зафарбовували Coomassie R-250.

Імуноцитохімічний аналіз препаратів Ig проводили, як описано [23], із деякими модифікаціями. Клітини лінії Jurkat попередньо промивали ЗФР, щоб видалити культуральне середовище, готували цитологічні мазки, фіксували їх метанолом протягом 90 с і висушували при кімнатній температурі. Після цього мазки інкубували із препаратами Ig (розведення 1:75) при 4 °С упродовж ночі. Після інкубації мазки промивали ЗФР двічі по 10 хв та інкубували з міченими FITC IgG кози, специфічними до Н-ланцюгів IgA людини (Sigma, США) у розведенні 1 : 50 протягом 1,5 год при 37 °С. Мазки промивали ЗФР, фарбували флуоресцентним барвником DAPI (1 мкг/мл) протягом 1 хв, знову промивали ЗФР, дистильованою водою і фотографували під мікроскопом Мікмед К-2-12 (ЛЮМО, РФ) при відповідних довжинах хвилі збудження та емісії для виявлення флуоресценції.

Результати та обговорення

Препарати імуноглобулінів (Ig) одержували із молозива 25 клінічно здорових породіль триразовим переосадженням білків молозива за умов 50%-го насичення сульфату амонію. Концентрація білка у цих препаратах коливалася від 1 мг/мл до 16 мг/мл і в середньому становила 2–3 мг/мл. Результати електрофорезу за денатурувальних умов показали, що досліджувані препарати Ig складаються переважно з поліпептидів із мол. масою 80, 62, та 25 кДа (рис. 1), які відповідають важким (H) та легким (L) ланцюгам імуноглобулінів класу IgM та sIgA [14]. У складі препаратів Ig виявлено також інші білки з мол. масою 50, 30 та 14 кДа. Є підстави припустити, що цими білками є важкі ланцюги IgG, бета-казеїн та лактоальбумін. Останні два білки містяться у значній кількості у молоці людини і, очевидно, виділяються спільно з імуноглобулінами під час осадження білків молозива сульфатом амонію. На відміну від сироватки крові, у молозиві та молоці людини відзначено високий вміст димерної форми секреторного IgA (sIgA) [14, 17]. У свою чергу, sIgA є надмолекулярним комплексом, який складається із Н- і L-ланцюгів IgA (62, 25 кДа),

секреторного компонента (80 кДа) та J-ланцюгів (14 кДа). Виявлення цих поліпептидів свідчить про те, що препарати Ig, одержані із молозива породіль осадженням сульфатом амонію, збагачені секреторним IgA.

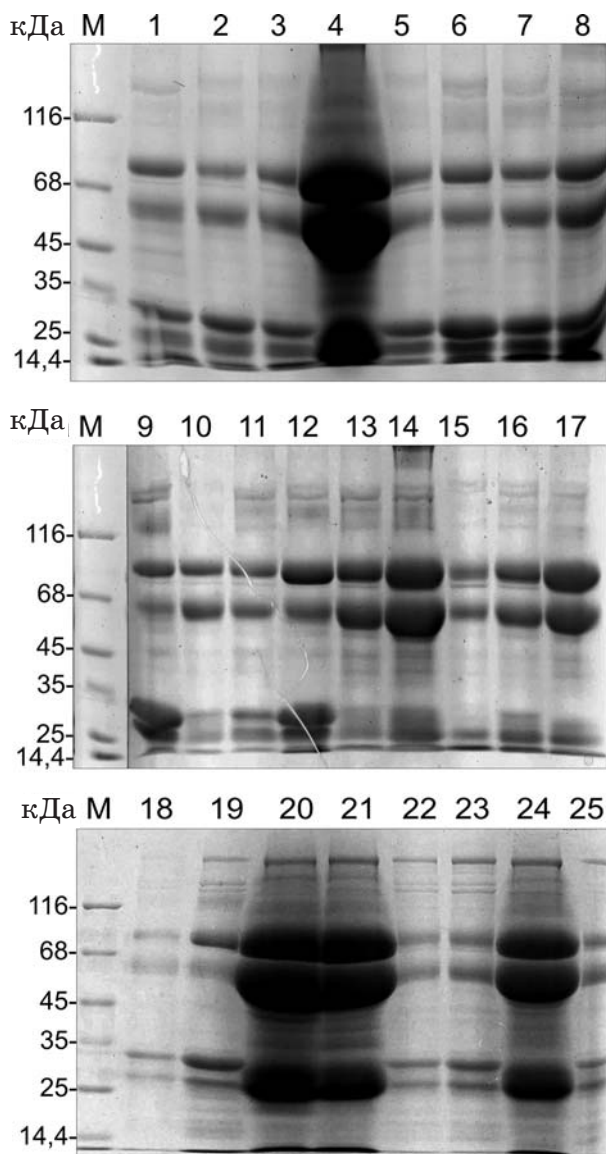


Рис. 1. Аналіз препаратів Ig електрофорезом у градієнті (6–17,5%) ПААГ за присутності 0,1% SDS:

1–25 — препарати Ig молозива породіль;
 М — стандарти молекулярної маси білків

Наступним етапом роботи було дослідження препаратів Ig на цитотоксичну та каталітичну активність, а також на присутність у них авто-АТ зі спорідненістю до дволанцюгової ДНК і гістонів. Раніше нами було встановлено, що Ig, виділені із сироватки крові клінічно здорових людей та хворих на розсіяний склероз, різняться за їхнім впливом на ріст лейкемічних клітин *in vitro*

[24]. Головна відмінність полягала в тому, що Ig клінічно здорових людей мали вищу цитотоксичну активність щодо Т-лейкемічних клітин людини порівняно з Ig хворих на розсіяний склероз. При цьому слід зазначити, що деякі з препаратів Ig, виділених із сироватки крові хворих переважно із важкою формою, були здатні стимулювати проліферацію лейкемічних клітин. На основі отриманих результатів було зроблено висновок про те, що зміни цитотоксичної активності Ig сироватки крові щодо лейкемічних клітин можуть бути характерною ознакою аутоімунних порушень у хворих на розсіяний склероз [24].

Беручи до уваги ці результати, було досліджено, як впливають Ig молозива породіль на ріст людських лейкемічних Т-клітин лінії Jurkat. Цитотоксичний ефект Ig визначали за співвідношенням кількості живих і мертвих клітин у культурі порівняно з контролем. Встановлено, що більшість препаратів Ig індукують загибель лейкемічних клітин *in vitro* (рис. 2). При цьому 11 препаратів Ig із 25 досліджених пригнічували ріст клітин більш ніж на 80% від контрольного рівня. Два препарати характеризувалися цитотоксичним ефектом на нижчому рівні (50–60%), ніж у попередніх 11 препаратів, у восьми препаратів він був незначним (20–25%), а в одного препарату — у межах контролю. Як видно із рис. 2, препарати №19 та №25, на відміну від інших препаратів, характеризувалися здатністю стимулювати проліферацію лейкемічних Т-лімфоцитів лінії Jurkat. Отже, результати проведених нами досліджень свідчать про те, що препарати Ig, одержані з молозива породіль, суттєво відрізняються між собою щодо дії на лейкемічні Т-клітини лінії Jurkat. Оскільки низький рівень або відсутність цитотоксичної активності Ig є характерною ознакою хворих на розсіяний склероз, можна припустити, що стан гуморального імунітету породіль, у яких Ig молозива мають подібні властивості, зазнав певних аутоімунних порушень.

Характерною ознакою аутоімунних порушень в організмі людини є поява високоспецифічних авто-АТ. Відомо, що в патогенезі багатьох аутоімунних захворювань значну роль відіграють авто-АТ зі спорідненістю до ядерних антигенів — дволанцюгової ДНК (дДНК) та гістонів [6]. Ми дослідили препарати Ig на присутність анти-дДНК АТ та антигістонових АТ за допомогою ІФА. Як позитивний контроль застосовували препарати IgG сироватки крові хворих на

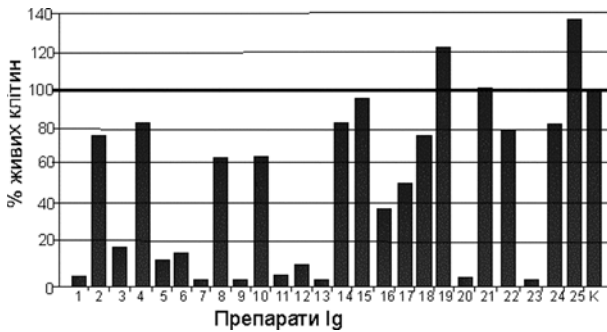


Рис. 2. Рівень виживання Т-клітин лінії Jurkat під впливом препаратів Ig (1–25), очищених із молозива породіль. К — контроль (за відсутності Ig)

розсіяний склероз, а як негативний — препарати IgG сироватки крові клінічно здорових донорів. Було встановлено, що вміст анти-дДНК АТ в усіх препаратах Ig молозива породіль, окрім препарату Ig №4, суттєво не відрізнявся від вмісту анти-дДНК АТ у препаратах IgG, виділених із сироватки крові здорових донорів (рис. 3). Вміст анти-дДНК АТ у препараті № 4 був достовірно вищим, ніж у інших препаратах АТ, хоча й був нижчим, ніж у препаратах IgG, виділених із сироватки крові хворих на розсіяний склероз.

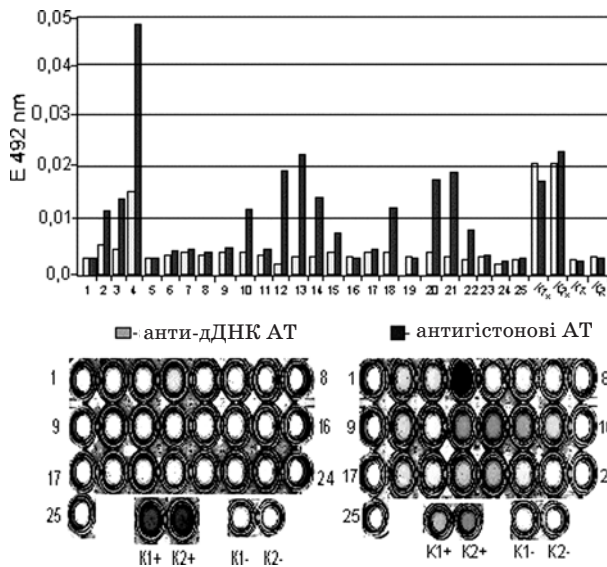


Рис. 3. Імуноферментний аналіз (ІФА) відносного вмісту авто-АТ зі спорідненістю до дволанцюгової ДНК (анти-дДНК АТ) та гістонів (антигістонові АТ) у препаратах Ig.

На діаграмі показано співвідношення вмісту авто-АТ у препаратах Ig, визначеного за величиною оптичного поглинання забарвлених продуктів пероксидазної реакції: 1–25 — препарати Ig молозива породіль; K1+, K2+ — препарати Ig сироватки крові хворих на розсіяний склероз; K1–, K2– — препарати Ig сироватки крові клінічно здорових донорів

На відміну від анти-дДНК АТ, антигістонові АТ було виявлено у складі 12 препаратів Ig молозива породіль (рис. 3). При цьому у шести препаратах рівень їх був близьким або перевищував рівень антигістонових АТ, виявлених у препаратах IgG сироватки крові хворих на розсіяний склероз. Найвищим вмістом антигістонових АТ характеризувався препарат № 4, де рівень антигістонових АТ у 2,5 раза перевищував рівень їх у препаратах IgG сироватки крові хворих на розсіяний склероз. Варто зазначити, що, на відміну від інших препаратів Ig, молозиво породіль №4 окрім антигістонових АТ містило також анти-дДНК АТ. Присутність авто-АТ із різною специфічністю у молозиві жінки дає підстави припустити, що в її організмі можуть відбуватися зміни в імунному статусі, а отже в подальшому це може призводити до виникнення аутоімунних або алергічних захворювань.

Важливою характеристикою авто-АТ є їхня каталітична активність щодо авто-АГ. Встановлено, що ДНК-гідролізуючі антитіла (ДНК-зими) присутні у крові хворих на аутоімунні та деякі інші захворювання, однак їх не виявлено у крові клінічно здорових людей. ДНК-зими було знайдено у сироватці крові пацієнтів з аутоімунними захворюваннями (системний червоний вівчак, ревматоїдний артрит, аутоімунний тироїдит, розсіяний склероз та ін.), а також у хворих на СНІД, променеву хворобу та деякі лімфопроліферативні захворювання (В-лімфолейкози) [8, 25]. ДНК-гідролізуючі антитіла ізотипів sIgA та IgG було також виявлено у молоці та молозиві клінічно здорових породіль [17]. Частота, з якою ці абзими трапляються у молозиві, та взаємозв'язок їх з аутоімунними порушеннями у породіль залишаються малодослідженими.

Ми провели аналіз ДНК-гідролізуючої активності препаратів Ig молозива породіль. Відомо, що ДНК-зимам притаманна топоізомеразна активність щодо надспіралізованої ДНК плазмиди [26]. ДНК-зими, подібно до топоізомераз, каталізують розриви в одній із двох ниток ДНК, що призводить до утворення релаксованої форми ДНК плазмиди. Оскільки ці дві форми ДНК мають різну електрофоретичну рухливість, їх можна розділити електрофорезом у гелі агарози. Було встановлено, що препарати Ig №4, 8, 18 та 21 гідролізують надспіралізовану плазмідну ДНК подібно до ДНК-зимів, виділених із сироватки крові пацієнтів з аутоімунними захворюваннями (рис. 4). В інших препаратах Ig топоізомеразну активність не виявлено.

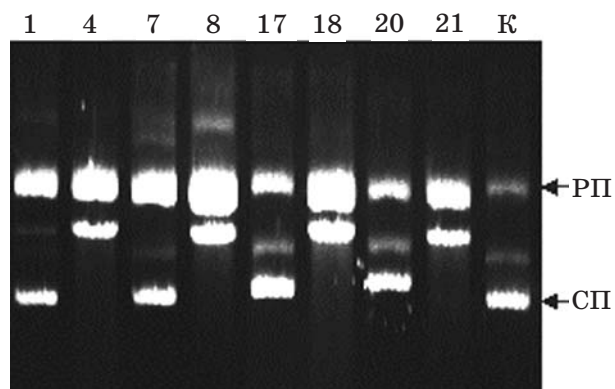


Рис. 4. Гідроліз плазмідної ДНК під впливом препаратів Ig молозива породіль: 3, 7, 17, 20 — препарати Ig, у яких топоізомеразна активність відсутня; 4, 8, 18, 21 — препарати Ig, яким притаманна топоізомеразна активність; К — плазміда рBR322. Стрілками вказано положення на гелі релаксованої (РП) та надспіралізованої (СП) форм плазмідної ДНК

Іншим типом абзимів, присутність яких в організмі свідчить про аутоімунні порушення, є протеїнгідролізувальні ауто-АТ (протабзими). Протабзидами класів sIgA і IgG, що здатні гідролізувати бета-казеїн жіночого та коров'ячого молока, було виявлено у молоці клінічно здорових жінок і в сироватці крові хворих на СНІД [27, 28]. Нами було встановлено, що високоочищені препарати sIgA, виділені з молозива породіль, гідролізують гістон H1 [29]. Антитіла класу IgG із подібною субстратною специфічністю також було знайдено у сироватці крові хворих на розсіяний склероз (дані не опубліковано). Одержані результати вказують на те, що абзими, які гідролізують гістон H1, подібно до інших протабзимів, можуть слугувати маркерами аутоімунних порушень в організмі людини. У даній роботі встановлено, що препарати Ig № 4 та № 21 гідролізують гістон H1 (рис. 5). Іншим препаратам не притаманна каталітична активність щодо цього білка.

Враховуючи ту обставину, що препарати Ig були недостатньо очищені від домішок інших білків молозива, не можна виключити, що каталітична активність деяких із цих препаратів може бути наслідком дії домішок ензимів молока. Підвищений вміст ауто-АТ зі спорідненістю до ДНК та гістонів у складі каталітично активних препаратів Ig №4 і №21 свідчить на користь присутності в них абзимів. Відсутність ауто-АТ зі спорідненістю до дволанцюгової ДНК у складі препаратів Ig № 8, 18, 21 не виключає можливості функціонування ДНК-зимів. Відомо, що, на відміну від протабзимів, ДНК-зими

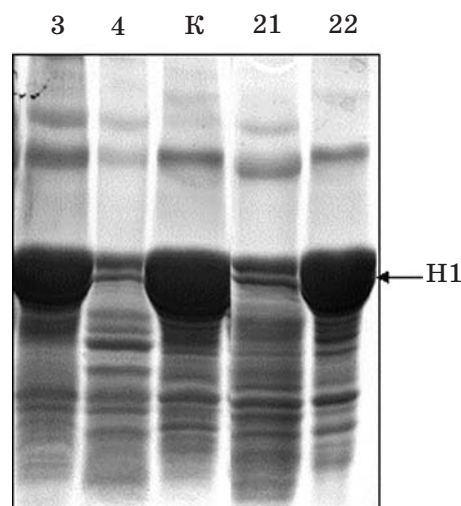


Рис. 5. Гідроліз гістону H1 під впливом препаратів Ig молозива породіль: 3, 22 — препарати Ig, у яких протеолітична активність відсутня; 4, 21 — препарати Ig, здатні гідролізувати гістон H1; К — гістон H1. Стрілкою вказано положення на гелі гістону H1

не є вузькоспецифічними щодо субстратів і крім ДНК вони можуть також гідролізувати синтетичні олігонуклеотиди та різні типи РНК [7, 26]. Тому не виключено, що ДНК-зими каталітично активних препаратів Ig №4, 8, 21 є ауто-АТ зі спорідненістю до одноланцюгової ДНК або РНК.

У табл. 1 подано узагальнені результати дослідження антигенної специфічності, цитотоксичної та каталітичної активності препаратів Ig молозива породіль. Як впливає із результатів цього аналізу, функціональна активність Ig молозива двох породіль (№4 і №21) суттєво відрізняється від функціональної активності Ig інших породіль. Спільною ознакою для породіль №4 і №6 є:

- високий вміст секреторних імуноглобулінів класу А;
- низька (або відсутня) цитотоксична активність щодо людських лейкоцитних Т-клітин лінії Jurkat;
- наявність антигістонових АТ;
- топоізомеразна та протеолітична активність.

Наведена сукупність ознак свідчить про те, що стан гуморального імунітету цих породіль відрізняється від стану інших породіль, і причиною цих змін можуть бути аутоімунні процеси, пов'язані з вагітністю та пологами. В анамнезі цих породіль виявлено суттєві відхилення від норми, зокрема перебіг вагітності у них супроводжувався загрозою переривання вагітності, токсикозом, набряками кінцівок, що певною мірою

Таблиця 1. Характеристика функціональної активності препаратів Ig, виділених із молозива породіль

Донори молозива № п/п	Цитотоксична активність Ig	Мітогенна активність Ig	Вміст анти-ДНК АТ	Вміст анти-гістонових АТ	Топоізомеразна активність Ig	Протеолітична активність Ig щодо гістону H1
1	+++					
2	+			+		
3	+++			+		
4	+		+	+++	+	+++
5	+++					
6	+++					
7	+++					
8	+				+	
9	+++					
10	+			+		
11	+++					
12	+++			++		
13	+++			++		
14	+			+		
15	+					
16	++					
17	++					
18	+			+	+	
19		++				
20	+++			++		
21		+		++	++	+++
22	+					
23	+++					
24	+					
25		+++				

Примітка: «+» — низький, «++» — середній, «+++» — високий рівень прояву функціонального маркера у препаратах Ig.

підтверджує припущення щодо розвитку аутоімунних порушень.

Важливою ознакою аутоімунних порушень у людини є поява у сироватці крові ауто-АТ до внутрішньоклітинних аутоантигенів [23]. Враховуючи ту обставину, що sIgA є головним компонентом фракції Ig молозива людини, було проведено дослідження спорідненості sIgA-антитіл препаратів Ig до антигенів Т-клітин лінії Jurkat. Використано препарати Ig породіль №4, 20, 21, 24, у яких вміст sIgA, згідно з даними, наведеними на рис. 1, був найвищим. Для виявлення sIgA застосовували FITC-мічені IgG кози, моноспецифічні до Н-ланцюгів sIgA людини. Відомо, що ауто-АТ зі спорідненістю до

нуклеопротейнів ядра можуть слугувати діагностичними маркерами розвитку деяких аутоімунних захворювань [6, 23]. Для визначення положення ядер фіксовані клітини лінії Jurkat фарбували флуоресцентним барвником DAPI. Встановлено, що у препаратах Ig №4, 21 і 24 присутні ауто-АТ класу IgA зі спорідненістю до біоструктур Т-клітин лінії Jurkat (рис. 6). У препараті Ig породіллі № 20 ауто-АТ класу sIgA з подібною антигенною специфічністю не виявлено. Накладання фазово-контрастних та флуоресцентних зображень клітин дозволило продемонструвати, що антигени ауто-sIgA антитіл препаратів Ig №4 містяться у ядрі клітин і, ймовірно, є компонентами

хроматину. Водночас антигени авто-sIgA антитіл препаратів Ig № 21 і № 24 розміщені головним чином у цитоплазмі та плазматичній мембрані Т-клітин лінії Jurkat.

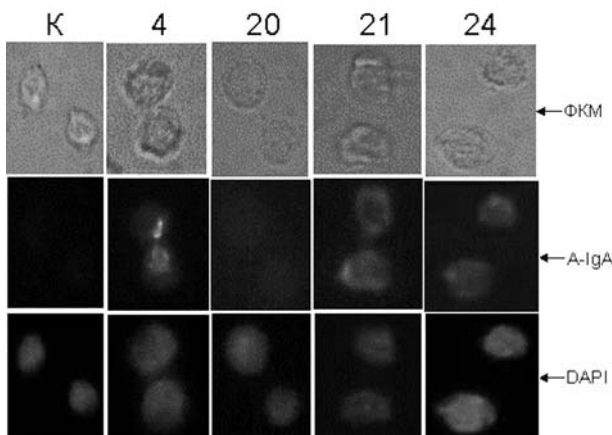


Рис. 6. Аналіз антигенної специфічності секреторних IgA препаратів Ig молозива породіль щодо лейкоцитних Т-клітин лінії Jurkat:
 К — клітини, не інкубовані з препаратами Ig (контроль);
 4, 21 — клітини, інкубовані з Ig препаратів №4 та 21;
 ФМК — фазово-контрастна мікроскопія препаратів клітин;
 A-IgA — флуоресцентна мікроскопія препаратів клітин після оброблення їх FITC-міченими IgG кози, специфічними до Н-ланцюгів IgA людини;
 DAPI — флуоресцентна мікроскопія препаратів клітин, зафарбованих DAPI

Аналіз результатів проведених досліджень дає підстави зробити висновок про те, що функціональні властивості імуноглобулінів молозива можуть відображати індивідуальні особливості стану гуморального імунітету у породіль. Проте отримані результати поки що не дозволяють однозначно стверджувати, які саме характеристики антитіл молозива — цитотоксичність, спорідненість до автоантигенів чи каталітична активність — можуть слугувати маркерами у ранній діагностиці автоімунних порушень у породіль. Щоб відповісти на це запитання, потрібно провести комплексне дослідження стану здоров'я ширшої вибірки породіль, яких за сумою виявлених нами ознак можна віднести до групи ризику.

Автори висловлюють подяку д.б.н. М. Д. Луцику за надані ним препарати гістонів. Роботу виконано за фінансової підтримки спільного проекту НАН України та Сибірського відділення Російської АН.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Поletaев А. Г.* Иммунологический гомункулус (иммункулус) в норме и при патологии // Биохимия. — 2002. — Т. 67, №5. — С. 721–730.
2. *Mackay I. R.* Autoimmunity: Paradigms of Burnet and complexities of today // Immun. Cell. Biol. — 1992. — V. 70, N3. — P. 159–171.
3. *Avrameas S.* Natural autoantibodies. From horror autotoxicus to gnōthi seauton // Immunol. Today. — 1991. — V. 12, N5. — P. 154–159.
4. *Bouvet J.-P., Dighitro G.* From natural polyreactive autoantibodies to a la Carte monoreactive antibodies to infection agents: is it a small world after all? // Infection and Immunity. — 1998. — V. 66, N1. — С. 1–4.
5. *Dawson K., Bell D.* Production and pathogenic effect of anti-DNA antibodies: relevance to antisense research // Antisense Res. Devel. — 1991. — V. 1, N4. — С. 351–360.
6. *Kurien B. T., Scofield R. H.* Autoantibody determination in the diagnosis of systemic lupus erythematosus // Scan. J. Immunol. — 2006. — V. 64, N3. — P. 227–235.
7. *Невинский Г.А., Каньшикова Т.Г., Бунева В.Н.* Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии // Биохимия. — 2002. — Т. 65, №11. — С. 1473–1487.
8. *Gabibov A., Ponomarenko N., Tretyak E. et al.* // Catalytic autoantibodies in clinical autoimmunity and modern medicine // Autoimm. Rev. — 2006. — V. 5, N5. — P. 324–330.
9. *Сучков С. В.* Сравнительное исследование каталитических (ДНК-гидролизующих) и цитотоксических свойств анти-ДНК аутоантител // Бюл. эксперим. биол. мед. — 2001. — Т. 131, №4. — С. 420–423.
10. *Kozyr A. V., Sashchenko L. P., Kolesnikov A. V. et al.* Anti-DNA autoantibodies reveal toxicity to tumor cell lines // Immunol. Lett. — 2002. — V. 80, N1. — P. 41–47.
11. *Gabibov A.* Antibody catalysis: Biochemistry, immunology, pathology // Ibid. — 2006. — V. 103, N1. — P. 1–2.
12. *Nevinsky G., Bunetva N.* Catalytic antibodies in healthy humans and patients with autoimmune and viral diseases // J. Cell. Mol. Med. — 2003. — V. 7, N3. — P. 265–276.
13. *Cervera R., Font J., Balasch J.* Pregnancy outcome in systemic lupus erythematosus:

- good news for the new millennium // *Autoimmun. Rev.* — 2002. — V. 1, N6. — P. 354–359.
14. *Каньшикова Т. Г., Бунева В. А., Невинский Г. А.* Биологические функции молока человека и его компонентов // *Успехи совр. биологии.* — 2002. — Т. 122, №3. — С. 259–271.
15. *Quan C. P., Berneman A., Pires R., Bouvet J. P.* Natural polyreactive secretory immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infection in humans // *Infect. Immun.* — 1997. — V. 65, N10. — P. 3997–4004.
16. *Кит Ю. Я., Семенов Д. В., Каньшикова Т. Г. и др.* Секреторные иммуноглобулины А молока человека обладают сродством к олигонуклеотидам и нуклеиновым кислотам // *Биохимия.* — 1999. — Т. 64, №1. — С. 52–59.
17. *Кит Ю. Я., Стойка Р. С.* Каталітично активні антитіла (абзими) молока людини // *Укр. біохім. журн.* — 2007. — Т. 79, №2. — С. 5–16.
18. *Иммуноглобулины* / Под ред. Г. Леитмена и Р. Гуда. — М.: Мир, 1981. — С. 212–230.
19. *Lowry O. H., Rosebrough N. J* // Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — V. 193, N1. — P. 265–270.
20. *Laemmly U. K.* A cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* — 1970. — V. 227, N5259. — P. 2244–2750.
21. *Nevinsky G. A., Kanyshkova T. G., Semenov D. V. et al.* Secretory immunoglobulin A from healthy human mothers' milk catalyzes nucleic acid hydrolysis // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2000. — V. 83, N1–3. — P. 115–129.
22. *Polosukhina D. I., Buneva V. N., Doronin B. M. et al.* Hydrolysis of myelin basic protein by IgM and IgA antibodies the sera of patients with multiple sclerosis // *Med. Sci. Monit.* — 2005. — V. 11, N8. — P. 266–272.
23. *Herrington C. S., McGee J. O. D.* *Diagnostic Molecular Pathology.* — Oxford.: IRL Press, 1992. — 536 p.
24. *Старикович М. А., Кит Ю. Я., Хавунка М. Я. и др.* Цитотоксическая активность иммуноглобулинов плазмы крови клинически здоровых людей и больных рассеянным склерозом // *Цитокины и воспаление.* — 2006. — Т. 5, №4. — С. 26–31.
25. *Nevinsky G. A., Buneva V. N.* Catalytic antibody in healthy humans and patients with autoimmune and viral diseases // *J. Cell Mol. Med.* — 2003. — V. 7, N3. — P. 265–276.
26. *Nevinsky G. A., Buneva V. N.* Human catalytic RNA- and DNA-hydrolyzing antibodies // *J. Immunol. Methods.* — 2002. — V. 269, N1–3. — P. 235–249.
27. *Odintsova E. S., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Casein-hydrolyzing activity of sIgA antibodies from human milk // *J. Mol. Recognit.* — 2005. — V. 18, N5. — P. 413–421.
28. *Одинцова Е. С., Харитонова М. А., Барановский А. Г. и др.* Протеолитическая активность IgG антител из крови больных синдромом приобретенного иммунодефицита человека // *Биохимия.* — 2006. — Т. 71, №3. — С. 320 — 332.
29. *Кит Ю. Я., Стойка Р. С.* Каталітично активні антитіла (абзими) молока людини і деякі механізми регуляції їх активності // *Матеріали ІХ Укр. біохім. з'їзду, 24–27 жовтня 2006 р., Харків.* — Т. 1. — 20 с.

**ИММУНОГЛОБУЛИНЫ МОЛОЗИВА
КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ
ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
АУТОИМУННЫХ НАРУШЕНИЙ
У РОЖЕНИЦ**

*Ю. Я. Кит¹, М. О. Старикович¹,
Р. О. Бильий¹, Н. Р. Скорохид¹,
Л. Б. Янив², Р. С. Стойка¹*

¹Институт биологии клетки
НАН Украины, Львов

²Львовский областной перинатальный центр

E-mail: kit@cellbiol.lviv.ua

С целью выявления новых молекулярных маркеров аутоимунных нарушений у рожениц проведен анализ антигенной специфичности, каталитической и цитотоксической активности иммуноглобулинов, полученных из молозива осаждением 50%-м сульфатом аммония. Установлено, что препараты иммуноглобулинов существенно различаются по цитотоксической активности относительно лейкомиических Т-клеток линии Jurkat, способности гидролизовать плазмидную ДНК и гистон H1, а также по содержанию ауто-АТ к двухцепочной ДНК и гистонам. Сделан вывод о том, что функциональные свойства иммуноглобулинов молозива зависят от индивидуальных особенностей состояния гуморального иммунитета рожениц. Эти свойства могут быть использованы для комплексного определения ранних аутоимунных нарушений у женщин, связанных с беременностью и родами.

Ключевые слова: молозиво здоровых рожениц, иммуноглобулины, цитотоксическая активность, каталитическая активность, уровень ауто-АТ.

**IMMUNOGLOBULINS OF COLOSTRUM
AS NOVEL MOLECULAR MARKERS
OF PRECLINICAL DIAGNOSTICS
OF AUTOIMMUNE DISORDERS
IN PARTURIENT WOMEN**

*Yu. Ya. Kit¹, M. O. Starykovych¹,
R. O. Bilyy¹, N. R. Skorohyd¹,
L. B. Yanyv², R. S. Stoika¹*

¹Institute of Cell Biology of National
Academy of Sciences of Ukraine, Lviv

²Lviv Regional Perinatal Center

E-mail: kit@cellbiol.lviv.ua

Analysis of antigen specificity, catalytic and cytotoxic activity of colostrum immunoglobulins was carried out in order to detect novel molecular markers of autoimmune disorders. Immunoglobulins were isolated from parturient women colostrums by precipitation with 50% ammonium sulfate. It was shown that preparations of immunoglobulins possessed significantly different cytotoxic activity towards Jurkat leukemia T-cells, various hydrolyzing ability towards plasmid DNA and histone H1, and also differed by content of auto-antibodies to double-stranded DNA and histones. We concluded that functional properties of colostrums immunoglobulins depended on individual peculiarities of parturient women humoral immunity. These properties can be used for complex detection of early autoimmune disorders linked with pregnancy and delivery.

Key words: colostrum of healthy women, immunoglobulins, cytotoxic activity, catalytic activity, level of auto-AB.