

УДК 547.917; 577.114; 571.27

РЕПЕРТУАР АНТИГЛИКАНОВЫХ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ДИНАМИКА В ПЕРВЫЙ ГОД ЖИЗНИ^{*,**}

© 2019 Н.Р. Хасбиуллина^{1,2***}, Н.В. Шилова², М.Е. Новаковский², А.Ю. Нокель², О. Бликст³, Л.О. Кононов¹, Ю.А. Книрель¹, Н.В. Бовин²

¹ Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, 119991 Москва, Россия; электронная почта: n.khasbiullina@mail.ru; crosbreed@list.ru

² Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

³ Университет Копенгагена, T422 1871, Фредериксберг, Дания

Поступила в редакцию 23.11.2018

После доработки 18.03.2019

Принята к публикации 19.03.2019

Репертуар антигликановых антител в периферической крови был изучен с помощью гликоципа, содержащего 487 гликановых антигенов: фрагментов гликанов млекопитающих (N- и O-цепи гликопротеинов и гликолипидов), а также полисахаридов бактерий. Образцы сывороток крови были получены от детей в возрасте 3, 6 и 12 месяцев. Дети были разделены на четыре группы в соответствии с типом питания: грудное молоко (ГМ), стандартная молочная смесь (СС), смеси на основе глубоко (ГГС) и частично (ЧГС) гидролизованного белка. В течение первого года жизни разнообразие антигликановых IgG уменьшалось; IgG материнского происхождения могут иметь более длительный период циркуляции в кровотоке новорожденных. В то же время, содержание IgM в 3 и 6 месяцев было незначительным, но существенно возрастало в период между 6 и 12 месяцами. Репертуар антигликановых антител детей в возрасте 12 месяцев отличается от материнского, а также от репертуара неродственных доноров; в частности, отсутствием антител к дисахариду Galβ1-3GlcNAc (Le^C), который обнаруживается практически у всех здоровых людей. Примечательно, что репертуар IgM детей, питавшихся грудным молоком, значительно уступал остальным трем группам, получавшим искусственные молочные смеси.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: естественные антитела, гликаны, полисахариды, бактерии, гликоцип, питание новорожденных, врожденный иммунитет.

DOI: 10.1134/S0320972519060034

Согласно общим представлениям, антитела образуются в процессе иммунизации организма чужеродными антигенами; уровень антител и их аффинность напрямую зависят от присутствия иммуногена. В то же время, накоплен обширный экспериментальный материал об антителах, уровень которых не меняется в течение жизни, а их аффинность константна [1, 2]. Эти

иммуноглобулины, в отличие от первых – адаптивных, получили название естественных антител (ЕАТ). Являясь частью системы врожденного иммунитета, ЕАТ выполняют различные функции – защиты от патогенов, клиренса метаболитов, надзора за трансформированными клетками, а также регуляторную функцию [3–7]. В числе антигенов, к которым направлены ЕАТ, обнаруживаются все классы биомолекул, что объясняется всеобъемлющим значением защитных процессов, в которых эти антитела участвуют [3, 4]. С точки зрения происхождения ЕАТ, особый интерес представляет ранний возраст организма, т.к. иммунная система ребенка имеет особый статус: несмотря на очень раннее начало развития иммунитета в онтогенезе, функционально после рождения он является незрелым; ребенок получает иммуноглобулины G (IgG) из кровеносной системы матери, а иммуноглобулинов M (IgM) в его крови практически нет [8–12].

Принятые сокращения: ЕАТ – естественные антитела, ГМ – грудное молоко, СС – стандартная молочная смесь, ГГС – смеси на основе глубоко гидролизованного белка молока, ЧГС – смеси на основе частично гидролизованного белка молока.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ18-328, 29.04.2019.

** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer ([Link.springer.com](http://link.springer.com)), том 84, вып. 6, 2019.

*** Адресат для корреспонденции.

Общепринято, что ЕАТ формируются в значительной степени под влиянием микрофлоры кишечника, поэтому изучение связи между формирующимся иммунитетом, питанием и микробным сообществом представляет большой интерес [13–15]. Однако модельные организмы, в частности, мыши, у которых состав микробиоты имеет свои существенные особенности, являются не вполне адекватной моделью для изучения ЕАТ человека [16, 17]. Для того, чтобы оценить, насколько существенным может быть влияние пищи новорожденного на его иммунитет, мы исследовали динамику репертуаров антител детей в возрасте 3, 6 и 12 месяцев, получавших четыре различных варианта питания. Патогенные микроорганизмы существенно отличаются от млекопитающих структурой гликоконъюгатов, поэтому неудивительно, что ЕАТ против углеводных эпитопов составляют значительную, если не доминирующую часть этих иммуноглобулинов [18–20], что позволяет на основании изучения антигликановых ЕАТ делать заключения общего характера. В то же время, делать обобщения на основании изучения всего лишь нескольких антител рискованно из-за индивидуальных особенностей (здесь достаточно упомянуть антитела, направленные к аллоантигенам, в первую очередь, антигенам групп крови), поэтому данное исследование генезиса ЕАТ основано на сравнении репертуаров ЕАТ с помощью довольно представительного набора гликанов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гликочипы были произведены в соответствии с описанной ранее методикой [21] с использованием N-гидроксисукцинимид-активированной поверхности («Schott Nexterion», Германия), на которую в процессе печати ковалентно привязывали 341 различных синтетический аминоспейсерированный гликан, а также 146 бактериальных O-полисахаридов. Библиотека гликанов включает антигены групп крови, опухолеассоциированные антигены, фрагменты N- и O-связанных гликопротеинов и гликолипидов, а также гликаны, нетипичные для млекопитающих; бактериальные полисахариды, большая часть из которых представляет собой углеводную часть липополисахаридов (ЛПС). Использовались синтетические гликаны чистотой >95%, синтезированные, в основной массе, в лаборатории углеводов ИБХ 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 РАН, Москва, Россия). Гликаны в концентрациях 50 мкМ и 10 мкг/мл для олиго- и полисахаридов соответственно, были напечатаны в 6–12 повторах. Полный список гликанов содержится в дополнительных материалах (табл. S1 в Приложении). Два гликочипа из каждой произведенной партии были проанализированы с использованием стандартного образца комплексного иммуноглобулинового препарата КИП («Имуногем», Россия) в концентрации 1 мг/мл с последующей визуализацией вторичными антителами и флуоресцентно-мечеными реагентами: конъюгированными с биотином антителами козы против человеческих иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA («Thermo Fisher Scientific», США) в концентрации 10 мкг/мл и затем стрептавидином, меченым Alexa Fluor 555 («Thermo Fisher Scientific», США) в концентрации 1 мкг/мл. В экспериментальной работе использовали гликочипы, для которых внутри- и межслайдовые корреляции результатов составляли >0,9. После печати гликочипы блокировали в течение 90 мин при 25 °С блокирующим буфером (100 мМ борная кислота, 25 мМ этанол-амин, 0,2% (v/v) Tween 20 («Sigma-Aldrich», США), pH 8,5; затем чипы промывали водой качества milli-Q («Медиана-фильтр», Россия) и высушивали воздухом на центрифуге Galaxy Mini-Array («VWR International», Корея). Блокированные чипы хранили при –20 °С. Перед началом работы с образцами сывороток крови чипы инкубировали с буфером PBS («Sigma-Aldrich», США) с добавлением 0,1% (v/v) Tween 20 (буфер № 1) в инкубационной камере («Simport», Канада) в течение 15 мин при 25 °С. Затем буфер сливали с поверхности чипа, а оставшуюся жидкость удаляли с помощью фильтровальной бумаги Whatman («Sigma-Aldrich», США). Сыворотку крови человека разводили (1 : 15) в PBS с добавлением 1% (w/v) БСА («Sigma-Aldrich», США) и 0,1% (v/v) Tween 20 (буфер № 2). Разведенную сыворотку наносили на поверхность гликочипа, равномерно распределяли и инкубировали в инкубационной камере в течение 90 мин при 37 °С и постоянном перемешивании (движение платформы камеры со скоростью 32–36 об/мин). По окончании стадии инкубации с сывороткой крови чипы промывали последовательно буфером № 1 и № 3 (PBS с добавлением 0,01% (v/v) Tween 20), а затем наносили смесь вторичных антител: флуоресцентно меченых (Alexa Fluor 555) антител козы против человеческих иммуноглобулинов IgG и флуоресцентно меченных (Alexa Fluor 647) антител козы против человеческих иммуноглобулинов IgM («Thermo Fisher Scientific», США) в концентрации 8 мкг/мл каждого в буфере № 2 и инкубировали еще 1 ч при 37 °С и

постоянном перемешивании; затем промывали последовательно буфером № 1, буфером № 3 и водой Milli-Q; высушивали воздухом на центрифуге Galaxy Mini-Array. Чипы сканировали на флуоресцентном сканере ScanArray Gx («Perkin-Elmer», США) при длинах волн 543 и 635 нм; полученные изображения анализировали с использованием программного обеспечения ScanArray Express 4.0. Полученные данные далее обрабатывали с помощью Microsoft Excel. Флуоресцентные сигналы, выраженные в относительных флуоресцентных единицах (RFU, relative fluorescent units) по каждому из гликанов, напечатанных в 6–12 повторах, были рассчитаны, как медиана значений каждого повтора. Отклонения медианы рассчитывали по квартилям (Q1 и Q3). Значимыми считали сигналы, превышающие значение фона в пять раз.

Сыворотки крови детей в возрасте 3, 6 и 12 месяцев и их матерей, а также здоровых взрослых доноров были получены стандартным способом забора из локтевой вены с информированного согласия доноров или их законных представителей, в соответствии с принятой в Хельсинки Декларацией об этике медицинских исследований, а также с одобрения этического комитета Университета Фронтера (Темуко, Чили), предоставившего образцы сывороток крови детей и их матерей. Выбор доноров осуществляли в соответствии со стандартными клиническими критериями; были исключены доноры с хроническими и инфекционными заболеваниями, а также с патологиями вынашивания плода (для женщин).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разнообразие антигликановых IgG и IgM в течение первого года жизни. С помощью гликоципа были изучены репертуары антител детей, у каждого из которых кровь забирали три раза – в 3, 6 и 12 месяцев, а также у их матерей – сразу после родов. Дети были разделены по типу питания на четыре группы (по пять детей в каждой): грудное молоко (ГМ), стандартная молочная смесь (СС), смеси на основе частично (ЧГС) и глубоко (ГГС) гидролизованного белка молока.

В течение первого года жизни разнообразие IgG уменьшается. Для IgM характерна противоположная тенденция: в возрасте 3 и 6 месяцев антигликановые IgM практически не обнаруживаются, но в возрасте 12 месяцев репертуар антител этого класса разнообразен и сопоставим со взрослыми индивидами. На рис. 1 представлены изменения в репертуарах антигликановых антител классов IgG и IgM, которые наблюдали

у детей в течение первого года жизни. Каждый столбец диаграммы показывает общее количество антигенов, с которыми связывались антитела. Данные по неродственным донорам представлены для сравнения: в связи с тем, что беременные и кормящие женщины характеризуются физиологическим иммунодефицитом [22, 23], оценить полноту или, напротив, недостаточность репертуара антигликановых антител у детей, сравнивая только с их матерями, было бы не адекватно.

Репертуары IgM в группах детей, получавших различные варианты питания. Тенденции к уменьшению разнообразия антигликановых IgG и появлению антигликановых IgM только к 12 месяцам характерны для всех детей, чьи сыворотки крови были исследованы в рамках данной работы, независимо от того, какую пищу они получали в течение первого года жизни. В возрасте 3 и 6 месяцев IgM у детей практически не обнаруживаются, а в 12 месяцев репертуар антигликановых антител этого класса сопоставим по разнообразию со взрослым человеком (рис. 1). Следует отметить, что между бактериальными полисахаридами, к которым есть антитела, не обнаруживается ни структурного, ни родового сходства; по-видимому, появление антител к ним индивидуально. На рис. 2 представлен список гликанов, демонстрирующий максимальные сигналы связывания с IgM в сыворотках крови детей в возрасте 12 месяцев.

Сравнение групп детей, получавших в течение первого года жизни различные варианты питания, показало, что группа детей, питавшихся смесями на основе частично гидролизованного белка (ЧГС), характеризуется наибольшим разнообразием и сходством с репертуаром взрослого человека. В таблице представлено такое сравнение по олигосахаридам, а в табл. S2 Приложения – по полисахаридам. Табл. S3 Приложения содержит данные по всем флуоресцентным сигналам для IgM, связывающихся с гликанами в сыворотках крови детей, их матерей и неродственных доноров.

Отметим, что почти все гликаны (отмеченные в таблице), к которым у детей в возрасте 12 месяцев нет антител, структурно родственны дисахариду Le^C (Galβ1-3GlcNAcβ). Такая же закономерность была описана нами ранее для антител анти-Le^C взрослых доноров [24, 25].

Репертуары IgG в группах детей, получавших различные варианты питания. Данные по связыванию IgG представлены в табл. S4 Приложения. Две причины побудили нас отказаться от подробного представления и обсуждения этих данных: 1) ЕАТ принадлежат преимущественно к IgM, 2) невозможно дискриминировать IgG

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	8	82				
40	16	9	63	23	17	27	44				
88	37	40	76	40	28	26	47				
59	36	14	61	34	12	99	83				
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				
84	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	19	71				
3	1	21	4	4	19	104	86				
4	49	19	3	12	27	143	57				
4	5	23	5	9	34	99	111				
4	2	10	5	3	7	27	97				
13	6	90	2	14	94	115	90				
2	1	31	3	6	26	186	111				
2	3	2	3	5	4	72	56				
6	2	2	2	3	1	34	63				
3	16	199	2	20	141	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	17	1	7	78	38	48				
3	8	108	2	5	81	66	85				
12	13	99	5	9	86	18	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
221	131	212	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

Рис. 1. 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. ОС – олигосахариды, ПС – полисахариды, 3 м, 6 м, 12 м – возраст детей (в месяцах) на момент забора крови; ГМ – грудное молоко, СС – стандартная молочная смесь, ГТС – смеси на основе глубоко гидролизованного белка молока, ЧТС – смеси на основе частично гидролизованного белка молока

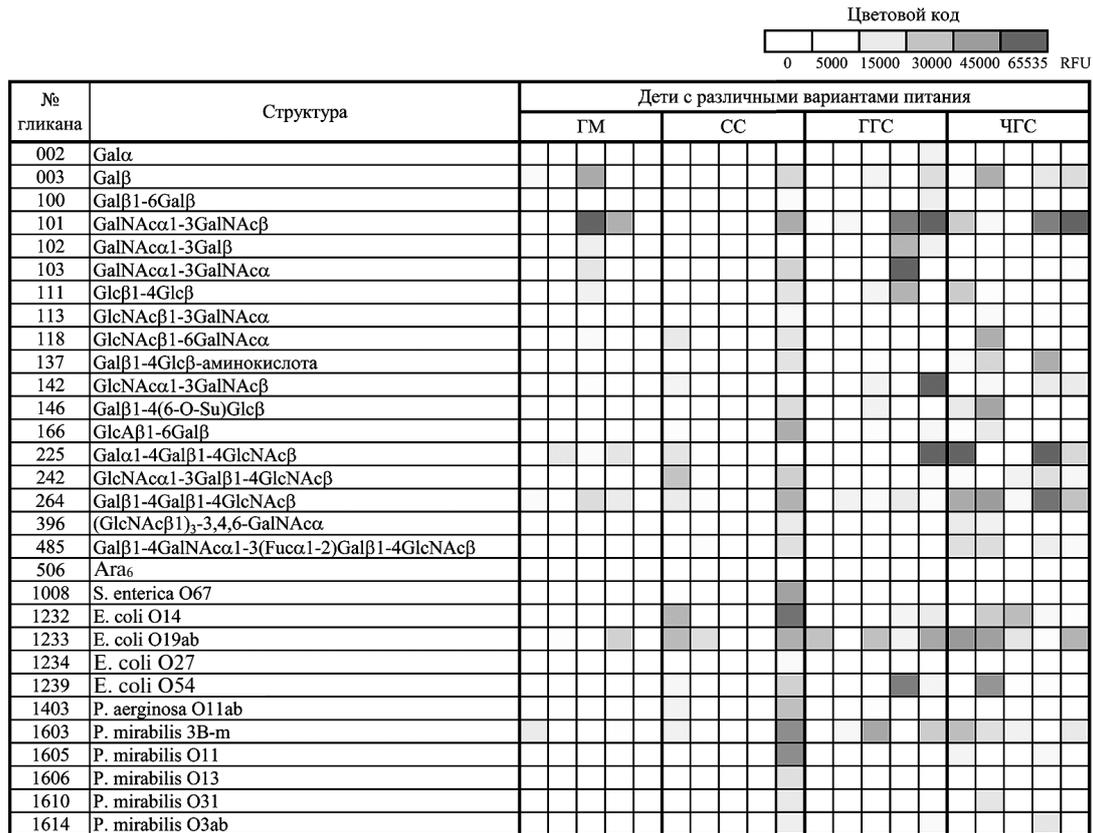


Рис. 2. Гликаны, демонстрирующие максимальные сигналы связывания с IgM в сыворотках крови детей в возрасте 12 месяцев, получавших различные варианты питания. Данные представлены в виде цветовой карты, где более яркому цвету соответствует более высокий флуоресцентный сигнал. ГМ – грудное молоко, СС – стандартная молочная смесь, ГГС – смеси на основе глубоко гидролизованного белка молока, ЧГС – смеси на основе частично гидролизованного белка молока

детей и их матерей, т.к. антитела этого класса способны пересекать плацентарный барьер в период внутриутробного развития [26].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

К моменту рождения В-клеточная система иммунитета является морфологически сформированной. Напротив, функциональная зрелость развивается в течение довольно продолжительного периода времени после рождения, завершаясь почти в подростковом возрасте [9, 27]. Однако наиболее существенные с точки зрения становления иммунной системы события, согласно сегодняшним представлениям, происходят в течение первого года жизни [13–15]. Генезис ЕАТ изучали на модельных системах, но к результатам этого рода работ нужно относиться с осторожностью, так как репертуар ЕАТ животных (в том числе мышей) существенно отличается от человеческого [16, 17]. Кроме того, существенным отличием между человеком и другими млекопитающими является проницаемость эпителия кишечника для иммуноглобули-

нов: материнские IgG грызунов, телят и кошек проникают с молоком в кровотоки вскармливаемого потомства. А для человека процесс передачи IgG от матери к ребенку заканчивается в момент их физического разделения, т.е. сразу после родов [28].

Первые месяцы жизни ребенка характеризуются т.н. физиологической (иными словами, естественной и обоснованной потребностями организма) иммуносупрессией, которая характеризуется сниженным количеством нейтрофилов и провоспалительных цитокинов [29, 30]. На первый взгляд, организм ребенка может показаться беззащитным, но на деле такое положение вещей оказывается оправданным, так как обеспечивает, во-первых, возможность формирования толерантности к антигенам нормальной микрофлоры, а также к антигенам пищи; а во-вторых, – равномерность развития иммунитета по мере ознакомления с антигенами окружающей среды [31–33]. По мере того, как происходит медленное наращивание антительного иммунитета, роль защиты выполняют белки острой фазы, которые способны за короткое время обеспечить неспецифическую защиту при

Сравнение репертуаров IgM детей в возрасте 12 месяцев и здоровых взрослых доноров

№ гликана	Структура	Группы детей, получавших различное питание			
		ГМ	СС	ЧГС	ГГС
020	Rha α	+	++	++	+++
080	Gal α 1-3GlcNAc β	++	+++	+	++++
243	GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	++	+++	++	+++++
399	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β	+	+	+++	++
103	GalNAc α 1-3GalNAc α	++	++	+++++	++++
102	GalNAc α 1-3Gal β	+	++	+++	+++++
142	GlcNAc α 1-3GalNAc β	+	+++	+++	+++++
101	GalNAc α 1-3GalNAc β	+++	++	+++++	+++++
251	GlcNAc β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β	++	+++	+++	+++
074	Fuc β 1-3GlcNAc β	+	+	-	-
140	Gal α 1-3GalNAc(fur) β	-	-	+	-
398	Gal β 1-3GlcN(Fm) β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β	+	+	+	++
118	GlcNAc β 1-6GalNAc α	+	+++	-	+++++
331	Neu5Gc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β	+	+	-	-
307	KDN α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β	+	-	-	-
055	3-O-Su-GlcNAc β	+	+	-	++
256	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-4)GalNAc α	++	++	+++	+++
267	GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β	+	+++	-	-
264	Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β	++++	+++	+++++	+++++
085	Gal β 1-3GlcNAc β	+	-	-	-
246	GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α	-	++	-	-
401	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β	+	-	-	-
378	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	+	+	+++	+++
397	Gal β 1-3GlcN(Fm) β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	+	+	-	-
081	Gal α 1-4GlcNAc β	-	++	+	+++
375	Gal α 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	+	++	+++	++++
082	Gal α 1-4GlcNAc β	-	+	+	-
072	Fuc α 1-3GlcNAc β	-	++	-	-
019	ManNAc β -Gly	++	++	++	+++++
113	GlcNAc β 1-3GalNAc α	-	+++	+++	+++++
149	GlcNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β	++	++	+	++
117	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Gly	+	++	-	++++
382	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β	-	-	+++	-
164	GlcA β 1-3GlcNAc β	-	++	-	-
380	Gal β 1-3GlcNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β	-	-	-	-
161	6-O-Su-Gal β 1-3GlcNAc β	+	-	-	-
073	Fuc α 1-4GlcNAc β	-	++	-	-
263	(GalNAc β -PEG) $_3$ - β -Lys-Lys	++	++	++	++++
299	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β	+	-	-	-
010	GlcNAc β	-	+	-	-

Примечание. Таблица представляет 40 олигосахаридов, сигналы связывания которых с антителами имеют максимальную интенсивность у взрослых доноров (гликаны сортированы по убыванию значения сигнала; для 10 доноров рассчитана медиана значений сигналов). В правой части таблицы представлены сигналы связывания антител с этими гликанами в сыворотках крови детей в возрасте 12 месяцев, получавших различные варианты питания. Наличие значимого сигнала связывания для каждого ребенка обозначено как «+». Связывание антител с гликанами, выделенными в таблице серым цветом, практически отсутствует у детей.

травмах и инфекциях, а также компоненты материнского молока, такие как антимикробные пептиды. В общем можно сказать, что в первое время после рождения основная работа выполняется врожденной ветвью иммунитета. Распознавание антигенов, которое осуществляется антиген-презентирующими клетками, также имеет свои особенности в связи с возрастом. Так, для новорожденных отмечается снижение продукции ФНО α (фактор некроза опухоли-альфа), ИФН γ (интерферон-гамма) и ИЛ-12 (интерлейкин-12), в то время как ИЛ-10 (интерлейкин-10) и ИЛ-6 (интерлейкин-6) секретируются в полной мере [34, 35].

Гликаны микроорганизмов находятся в числе антигенов, наиболее значимых для раннего возраста и развития иммунной системы, т.к. в отличие от пептидных антигенов, они могут распознаваться, во-первых, без формирования комплекса с белками главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), и, во-вторых, напрямую В-клетками, которые в таком случае сами выступают в роли антигенпрезентирующих клеток благодаря особенностям строения В-клеточного рецептора (BCR). При этом количество самого антигена может влиять на иммунный ответ со стороны В-клеток – малое количество гликана не способно активировать В-клетку, т.к. молекуле BCR для передачи сигнала внутрь клетки требуется одновременно связать множество копий данного антигена [36–39].

Антигликановые антитела являются удобным объектом для изучения общих принципов формирования ЕАТ. Во-первых, их репертуар весьма широк [19, 40], и значительная его часть (то есть, фактически все *не алло*-антитела) воспроизводится от человека к человеку; во-вторых, для их идентификации существует удобный инструмент – гликочип [41–43]. Мы исследовали сыворотки крови здоровых доношенных детей, а также их матерей и дополнительно 10 здоровых взрослых доноров. Последние были необходимы для адекватного сравнения детей и взрослых, т.к. уровень (а возможно и репертуар) антител беременных и недавно родивших женщин понижен [22, 23].

При исследовании антигликановых антител класса G с помощью гликочипа обнаружилось, что в период 3–12 месяцев жизни разнообразие IgG и сигналы связывания с гликанами гликочипа снижаются (рис. 1), эта тенденция отмечается как для олигосахаридов, часто встречающихся фрагментов гликопротеинов и гликолипидов млекопитающих, так и для полисахаридов инфекционных бактерий. Наблюдаемое в возрасте 3 месяца максимальное разнообразие иммуноглобулинов класса G отвечает репертуа-

ру антител материнского происхождения; в течение следующих нескольких месяцев, вплоть до года, их разнообразие уменьшается; это согласуется с литературными данными [44, 45]. Однако, имеется одно существенное противоречие. Известно [46], что период полужизни IgG составляет 23–25 суток, а это значит, что выявляемые нами антитела, циркулирующие в крови ребенка в возрасте 3 месяцев, или не относятся к материнским, или их время циркуляции в крови детей существенно больше, чем считалось. Мы предполагаем, что переданные внутриутробно, они могут иметь более длительный период циркуляции в крови ребенка, чем обычные IgG. По предположениям некоторых исследователей, антитела беременных характеризуются рядом особенностей, в частности, измененным гликозилированием [47, 48], а оно влияет на длительность циркуляции иммуноглобулина. Более длительная циркуляция, к тому же, обеспечивает выполнение иммунной защиты в период до появления собственных IgM; пролонгированный период жизни материнских IgG также может обеспечивать необходимые условия для формирования толерантности к собственным антигенам и антигенам бактерий микрофлоры.

Динамика изменения IgM в период 3–12 месяцев оказалась совсем иной, чем в случае IgG; в 3 и 6 месяцев их репертуар еще узок (рис. 1) по сравнению со взрослыми (антитела всегда выявлялись в одинаковых условиях). К 12 месяцам репертуар существенно расширяется. Известно, что иммуноглобулины M при нормально протекающей беременности и отсутствии внутриутробного инфицирования плода не способны проникать через плаценту от матери; продукция собственного IgM еще не достигает достаточного уровня, и потому, согласно литературным данным, количество антител данного класса у новорожденных не превышает 6–10% от уровня взрослого человека [44]. Отметим, что группа детей, питавшихся грудным молоком, отличается от трех других; репертуар ее антигликановых IgM менее всего соответствует «взрослому» уровню. Данное наблюдение на первый взгляд неожиданно, т.к. именно эти дети находятся в теснейшем контакте с матерью, т.е. в наиболее благоприятных условиях. Возможное объяснение заключается в том, что в грудном молоке содержатся пептиды, белки (включая те же иммуноглобулины) и гликаны (свободные и в виде гликоконъюгатов) [35, 49], обладающие противомикробной активностью и, таким образом, способные частично выполнять функцию иммуноглобулинов. Иными словами, разнообразие антител в этих условиях менее востребовано. И тогда ускоренный генезис ЕАТ в условиях

вскармливания искусственными смесями можно интерпретировать, как несвоевременный, и поэтому нежелательный. Впрочем, необходимо заметить, что обсуждаемая разница репертуаров не является ярко выраженной.

Максимальное разнообразие антител наблюдается в группе детей, питавшихся смесью, изготовленной на основе частично гидролизованного белка, т.е. содержащей в основном крупные пептиды, которые являются резервуаром антигенных детерминант. Последние могут быть мимотопами [50–54] в премировании В-лимфоцитов, продуцирующих антигликановые антитела.

Особо отметим отсутствие у всех 20 детей к возрасту 12 месяцев антител к Le^C, которые входят в группу топовых EAT (IgM) взрослых доноров, и которые найдены практически у всех проверенных (~150) [55] здоровых доноров. Эти антитела, по-видимому, играют роль надзора за появлением опухолевых клеток [56–58]; почему они полностью отсутствуют в раннем возрасте и в каком возрасте появляются, предстоит выяснить в будущем. В то же время, большинство других антигликановых мажорных EAT, таких как к Rha, Gal α 1-4(3)GlcNAc и GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β , у детей в возрасте 12 месяцев уже есть (таблица); более того, сигналы и встречаемость антител к GalNAc α 1-3GalNAc β (Fs-2, карциномы [59], № 101 на рис. 2) и Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β (меланома, № 264 [60]) у детей выше, чем сигналы и встречаемость других антител.

Таким образом, репертуар естественных антител к 12 месяцам еще только приближается к таковому у взрослого человека. Интересно, что появление некоторых антител, таких как анти-Le^C, «отложено» на более поздний возраст у всех без исключения изученных детей; это можно объяснить тем, что Le^C является не просто опухолевым, а онкоэмбриональным антигеном, что интересно было бы подтвердить экспериментально. Отметим также, что, судя по нашим результатам, время жизни материнских IgG в организме ребенка существенно более продолжительное, чем принято считать.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-0031 – Хасбиуллина Н.Р., Шилова Н.В., Бовин Н.В. – печать гликочипов и анализ образцов сывороток крови; грант № 14-14-01042 – Книрель Ю.А. – выделение бактериальных полисахаридов и исследование их структуры).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Сыворотки крови детей в возрасте 3, 6 и 12 месяцев и их матерей, а также здоровых взрослых доноров были получены с информированного согласия доноров или их законных представителей, в соответствии с принятой в Хельсинки Декларацией об этике медицинских исследований, а также с одобрения этического комитета Университета Фронтера (Темучо, Чили).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mouthon, L., Lacroix-Desmazes, S., Nobrega, A., Barreau, C., Coutinho, A., and Kazatchkine, M.D. (1996) The self-reactive antibody repertoire of normal human serum IgM is acquired in early childhood and remains conserved throughout life, *Scand. J. Immunol.*, **44**, 243–251, doi: 10.1046/j.1365-3083.1996.d01-306.x.
- Holodick, N.E., Rodriguez-Zhrubenko, N., and Hernandez, A.M. (2017) Defining natural antibodies, *Front. Immunol.*, **8**, 872, doi: 10.3389/fimmu.2017.00872.
- Boyden, S.V. (1966) Natural antibodies and the immune response, *Adv. Immunol.*, **5**, 1–28.
- Lutz, H.U. (2007) Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: an overview, *J. Autoimmun.*, **29**, 287–294, doi: 10.1016/j.jaut.2007.07.007.
- Shoenfeld, Y., and Toubi, E. (2005) Protective autoantibodies: role in homeostasis, clinical importance, and therapeutic potential, *Arthritis Rheum.*, **52**, 2599–2606, doi: 10.1002/art.21252.
- Vás, J., Gronwall, C., and Silverman, G.J. (2013) Fundamental roles of the innate-like repertoire of natural antibodies in immune homeostasis, *Front. Immunol.*, **4**, doi: 10.3389/fimmu.2013.00004.
- Boes, M. (2000) Role of natural and immune IgM antibodies in immune response, *Mol. Immunol.*, **37**, 1141–1149, doi: 10.1016/S0161-5890(01)00025-6.
- Swiatczak, B., and Cohen, I.R. (2015) Gut feelings of safety: tolerance to the microbiota mediated by innate immune receptors, *Microbiol. Immunol.*, **59**, 573–585, doi: 10.1111/1348-0421.12318.
- Dowling, D.J., and Levy, O. (2014) Ontogeny of early life immunity, *Trends Immunol.*, **35**, 299–310, doi: 10.1016/j.it.2014.04.007.
- Basha, S., Surendran, N., and Pichichero, M. (2014) Immune response in neonates, *Expert. Rev. Clin. Immunol.*, **10**, 1171–1184, doi: 10.1586/1744666X.2014.942288.
- Ben-Hur, H., Gurevich, P., Elhayany, A., Avinoach, I., Achneider, D.F., and Zusman, U. (2005) Transport of maternal immunoglobulins through the human placental barrier in normal pregnancy and during inflammation, *Int. J. Mol. Med.*, **16**, 401–407, doi: 10.3892/ijmm.16.3.401.
- Van de Perre, P. (2003) Transfer of antibody via mother's milk, *Vaccine*, **21**, 3374–3376, doi: 10.1016/S0264-410X(03)00336-0.
- Singh, R.K., Chang, H.W., Yan, D., Lee, K.M., Ucmak, D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, T.H., Bhutani, T., and Liao, W. (2017) Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health, *J. Transl. Med.*, **15**, 73, doi: 10.1186/s12967-017-1175-y.

14. Arrieta, M.C., Stiemsma, L.T., Amenyo, N., Brown, E.M., and Finlay, B. (2014) The intestinal microbiome in early life: health and disease, *Front. Immunol.*, **5**, 427, doi: 10.3389/fimmu.2014.00427.
15. Francino, M.P. (2014) Early development of the gut microbiota and immune health, *Pathogens*, **3**, 769–790, doi: 10.3390/pathogens3030769.
16. Bello-Gil, D., Khasbiullina, N.R., Shilova, N.V., Bovin, N.V., and Manez, R. (2017) Repertoire of BALB/c mice natural anti-carbohydrate antibodies: mice vs. humans difference, and otherness of individual animals, *Front. Immunol.*, **6**, 1449, doi: 10.3389/fimmu.2017.01449.
17. Vandamme, T.F. (2014) Use of rodents as models of human diseases, *J. Pharm. Bioallied. Sci.*, **6**, 2–9, doi: 10.4103/0975-7406.124301.
18. Khasbiullina, N.R., and Bovin, N.V. (2015) Hypotheses of the origin of natural antibodies: a glycobiologist's opinion, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 820–835, doi: 10.1134/S0006-297915070032.
19. Bovin, N.V. (2017) Natural antibodies to glycans, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 786–797, doi: 10.1134/S000629791-3070109.
20. Dotan, N., Altstock, R.T., Schwarz, M., and Dukler, A. (2006) Anti-glycan antibodies as biomarkers for diagnosis and prognosis, *Lupus*, **15**, 442–450, doi: 10.1191/0961203306lu23310a.
21. Blixt, O., Head, S., Mondala, T., Scanlan, C., Huflejt, M.E., Alvarez, R., Bryan, M.C., Fazio, F., Calarese, D., Stevens, J., Razi, N., Stevens, D.J., Skehel, J.J., van Die, I., Burton, D.R., Wilson, I.A., Cummings, R., Bovin, N., Wong, C.H., and Paulson, J.C. (2004) Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17033–17038, doi: 10.1073/pnas.0407902101.
22. Robinson, D.P., and Klein, S.L. (2012) Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis, *Horm. Behav.*, **62**, 263–271, doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.02.023.
23. Nair, R.R., Verma, P., and Singh, K. (2017) Immune-endocrine crosstalk during pregnancy, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **1**, 18–23, doi: 10.1016/j.ygcn.2016.03.003.
24. Chugh, M., Piskarev, V., Galanina, O., Khasbiullina, N., Kadam, P., Shilova, N., Pazynina, N., Dobrochaeva, K., Bhanushali, P., Kozlov, N., Tupitsyn, N., and Bovin, N. (2017) Glycoprotein CA19.9 specific monoclonal antibodies recognize sialic acid independent glycotopes, *Tumor Biol.*, **39**, doi: 10.1177/1010428317725434.
25. Obukhova, P., Piskarev, V., Severov, V., Pazynina, G., Tuzikov, F., Navakouski, M., Shilova, N., and Bovin, N. (2011) Profiling of serum antibodies with printed glycan array: room for data misinterpretation, *Glycoconj. J.*, **8**, 501–505, doi: 10.1007/s10719-011-9355-0.
26. Simon, A.K., Hollander, G.A., and McMichael, A. (2015) Evolution of the immune system in humans from infancy to old age, *Proc. Biol. Sci.*, **22**, 1821, doi: 10.1098/rspb.2014.3085.
27. Walkovich, K., and Connelly, J.A. (2016) Primary immunodeficiency in the neonate: early diagnosis and management, *Semin. Fetal. Neonatal. Med.*, **21**, 35, doi: 10.1016/j.siny.2015.12.005.
28. Borghesi, J., Mario, L.C., Rodrigues, M.N., Favaron, P.O., and Miglino, M.A. (2014) Immunoglobulin transport during gestation in domestic animals and humans – a review, *Open J. Anim. Sci.*, **4**, 323–336, doi: 10.4236/ojas.2014.45041.
29. Kollmann, T.R., Levy, O., Montgomery, R.R., and Goriely, S. (2012) Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly, *Immunity*, **37**, 771, doi: 10.1016/j.immuni.2012.10.014.
30. Erkeller-Yuksel, F.M., Deneys, V., Yuksel, B., Hannet, I., Hulstaert, F., Hamilton, C., Mackinnon, H., Turner Stokes, L., Munhyeshuli, V., Vanlangendonck, F., De Bruyere, M., Bach, B.A., and Lydyard, P.M. (1992) Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations, *J. Pediatr.*, **120**, 216–22, doi: 10.1016/S0022-3476(05)80430-5.
31. Berni Canani, R., Gilbert, J.A., and Nagler, C.R. (2015) The role of the commensal microbiota in the regulation of tolerance to dietary allergens, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **15**, 243–249, doi: 10.1097/ACI.0000000000000157.
32. Wu, H.J., and Wu, E. (2012) The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity, *Gut Microbes*, **3**, 4–14, doi: 10.4161/gmic.19320.
33. Brandtzaeg, P. (2009) Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions, *Scand. J. Immunol.*, **70**, 505–515, doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02319.x.
34. Levy, O. (2007) Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates, *Nat. Rev. Immunol.*, **7**, 379–390, doi: 10.1038/nri2075.
35. Field, C.J. (2005) The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants, *J. Nutr.*, **135**, 1–4, doi: 10.1093/jn/135.1.1.
36. Viemann, D., Schlenke, P., Hammers, H.J., Kirchner, H., and Kruse, A. (2000) Differential expression of the B cell-restricted molecule CD22 on neonatal B lymphocytes depending upon antigen stimulation, *Eur. J. Immunol.*, **30**, 550–559, doi: 10.1002/1521-4141(200002)30:2<550::AID-IMMU550>3.0.CO;2-X.
37. Meffre, E., and Salmon, J.E. (2007) Autoantibody selection and production in early human life, *J. Clin. Invest.*, **117**, 598–601, doi: 10.1172/JCI31578.
38. Cooper, M.D. (2015) The early history of B cells, *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 191–197, doi: 10.1038/nri3801.
39. Kraus, M., Alimzhanov, M.B., Rajewsky, N., and Rajewsky, K. (2004) Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Ig alpha/beta heterodimer, *Cell*, **11**, 787–800, doi: 10.1016/j.cell.2004.05.014.
40. Bovin, N., Obukhova, P., Shilova, N., Rapoport, E., Popova, I., Navakouski, M., Unverzagt, C., Vuskovic, M., and Huflejt, M. (2012) Repertoire of human natural anti-glycan immunoglobulins. Do we have auto-antibodies? *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 1373–1382, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.02.005.
41. Jacob, F., Goldstein, D.R., Bovin, N.V., Pochechueva, T., Spengler, M., Caduff, R., Fink, D., Vuskovic, M.I., Huflejt, M.E., and Heinzelmann-Schwarz, V. (2012) Serum antiglycan antibody detection of nonmucinous ovarian cancers by using a printed glycan array, *Int. J. Cancer*, **1**, 138–146, doi: 10.1002/ijc.26002.
42. Kletter, D., Singh, S., Bern, M., and Haab, B.B. (2013) Global comparisons of lectin–glycan interactions using a database of analyzed glycan array data, *Mol. Cell. Proteomics*, **12**, 1026–1035, doi: 10.1074/mcp.M112.026641.
43. Gildersleeve, J.C., Wang, B., Achilefu, S., Tu, Z., Xu, M. (2012) Glycan array analysis of the antigen repertoire targeted by tumor-binding antibodies, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 6839–6843, doi: 10.1016/j.bmcl.2012.09.055.
44. Alkan Ozdemir, S., Ozer, E.A., Kose, S., Ilhan, O., Ozturk, C., and Sutcuoglu, S.J. (2016) Reference values of serum IgG and IgM levels in preterm and term newborns, *Matern. Fetal. Neonatal. Med.*, **29**, 972–976, doi: 10.3109/14767058.2015.1027680.
45. Madi, A., Hecht, I., Bransburg-Zabary, S., Merbl, Y., Pick, A., Zucker-Toledano, M., Quintana, F.J., Cohen, I.R., and Ben-Jacob, E. (2009) Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data, *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 14484–14489, doi: 10.1073/pnas.0901528106.
46. Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispen, T. (2014) IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, *Front. Immunol.*, **5**, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.
 47. Einarsdottir, H.K., Selman, M.H., Kapur, R., Scherjon, S., Koeleman, C.A., Deelder, A.M., van der Schoot, C.E., Vidarsson, G., and Wuhrer, M. (2013) Comparison of the Fc glycosylation of fetal and maternal immunoglobulin G, *Glycoconj. J.*, **30**, 147–157, doi: 10.1007/s10719-012-9381-6.
 48. Wuhrer, M., Stam, J.C., van de Geijn, F.E., Koeleman, C.A., Verrips, C.T., Dolhain, R.J., Hokke, C.H., and Deelder, A.M. (2007) Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum, *Proteomics*, **7**, 4070–4081, doi: 10.1002/pmic.200700289.
 49. Ballard, O., and Morrow, A.L. (2013) Human milk composition: nutrients and bioactive factors, *Pediatr. Clin. North. Am.*, **60**, 49–74, doi: 10.1016/j.pcl.2012.
 50. Kieber-Emmons, T., Saha, S., Pachov, A., Monzavikarabassi, B., and Murali, R. (2014) Carbohydrate-mimetic peptides for pan anti-tumor responses, *Front. Immunol.*, **5**, 308, doi: 10.3389/fimmu.2014.00308.
 51. Ohtaki, A., Kieber-Emmons, T., and Murali, R. (2013) Structure-based peptide mimicry of tumor-associated antigens, *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, **32**, 1–5, doi: 10.1089/mab.
 52. Cusick, M.F., Libbey, J.E., and Fujinami, R.S. (2012) Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease, *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **42**, 102–111, doi: 10.1007/s12016-011-8294-7.
 53. Umair, S., Deng, Q., Roberts, J.M., Shaw, R.J., Sutherland, I.A., and Pernthaner, A. (2016) Identification of peptide mimics of a glycan epitope on the surface of parasitic nematode larvae, *PLoS One*, **11**, doi: 10.1371/journal.pone.0162016.
 54. Vyas, N.K., Vyas, M.N., Chervenak, M.C., Bundle, D.R., Pinto, B.M., and Quijcho, F.A. (2003) Structural basis of peptide-carbohydrate mimicry in an antibody-combining site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15023–15028, doi: 10.1073/pnas.2431286100.
 55. Huflejt, M.E., Vuskovic, M., Vasiliu, D., Xu, H., Obukhova, P., Shilova, N., Tuzikov, A., Galanina, O., Arun, B., Lu, K., and Bovin, N. (2009) Anti-carbohydrate antibodies of normal sera: findings, surprises and challenges, *Mol. Immunol.*, **46**, 3037–3049, doi: 10.1016/j.molimm.2009.06.010.
 56. Lee, E., Pandey, N.B., and Popel, A.S. (2014) Lymphatic endothelial cells support tumor growth in breast cancer, *Sci. Rep.*, **4**, 5853, doi: 10.1038/srep05853.
 57. Muthana, S.M., Campbell, C.T., and Gildersleeve, J.C. (2002) Modifications of glycans: biological significance and therapeutic opportunities, *ACS Chem. Biol.*, **7**, 4310, doi: 10.1021/cb2004466.
 58. Zhang, S.L., Zhang, H.S., Cordon Cardo, C., Reuter, V.E., Singhal, A.K., Lloyd, K.O., and Livingston, P.O. (1997) Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry. 2. Blood group-related antigens, *Int. J. Cancer*, **73**, 50–56, doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19970926)73:1<50::AID-IJC9>3.0.CO;2-0.
 59. Smorodin, E.P., Kurtenkov, O.A., Sergeev, B.L., Chuzmarov, V.I., and Afanasyev, V.P. (2007) The relation of serum anti-(GalNAc beta) and para-Forsman disaccharide IgG levels to the progression and histological grading of gastrointestinal cancer, *Exp. Oncol.*, **29**, 61–66.
 60. Hoja-Lukowicz, D., Lenczowski, P., Carpentieri, A., Pohec, E., Artemenko, K.A., Bergquist, J., and Litynska, A. (2013) L1CAM from human melanoma carries a novel type of N-glycan with Galβ1-4Galβ1-motif. Involvement of N-linked glycans in migratory and invasive behavior of melanoma cells, *Glycoconj. J.*, **30**, 205–225, doi: 10.1007/s10719-012-9374-5.

THE REPERTOIRE OF HUMAN ANTI-GLYCAN ANTIBODIES AND ITS DYNAMICS IN THE FIRST YEAR OF LIFE

N. R. Khasbiullina^{1,2*}, N. V. Shilova², M. E. Navakouski², A. Yu. Nokel², O. Blixt³, L. O. Kononov¹, Yu. A. Knirel¹, and N. V. Bovin²

¹ Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; E-mail: n.khasbiullina@mail.ru

² Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

³ University of Copenhagen, T4221871, Frederiksberg, Denmark

Received November 23, 2018

Revised March 18, 2019

Accepted March 19, 2019

The repertoire of anti-glycan antibodies of peripheral blood was studied using a microarray containing 487 glycan antigens: fragments of mammalian glycans (N- and O-chains of glycoproteins, as well as glycolipids) and bacterial polysaccharides. The studied sera samples correspond to the third, sixth, and twelfth months of life. The infants were divided into four groups according to their nutrition type: breast milk, standard formula, and partially or totally hydrolyzed (protein) formula. At the age of 3 months, the repertoire of IgG is maximal (presumably, the lifetime of maternal IgG in the newborns' bloodstream is much greater than it is generally assumed), but by the 12th month it is significantly decreased, as well the total content of IgG. On the opposite, the IgM content was low during the first six months and increased significantly by the 12th month. Nevertheless, the anti-glycan IgM repertoire of 12-month-old infants is still different from that of their mothers and unrelated donors, in particular, by the absence of antibodies against the Galβ1-3GlcNAc (Le^C) disaccharide, which is found in almost all healthy humans. Remarkably, the repertoire of IgM of breast-fed infants was significantly lower than that of formula-fed by the 12th month.

Keywords: natural antibodies, glycans, polysaccharides, bacteria, glycochip, array, infant nutrition, innate immunity