

ZNACZNIK ANTYGENOWY IMMUNOGLOBULIN KLASY M W BADANIACH WCHŁANIAANIA I ZANIKU PRZECIWCIAŁ POCHODZENIA SIAROWEGO U JAGNIĄT

Piotr Krzyścin, Małgorzata Natonek-Wiśniewska

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa,
e-mail: pkrzysc@izoo.krakow.pl

Celem pracy było określenie absorpcji i katabolizmu siarowych przeciwciał klasy M u jagniąt przy wykorzystaniu IghmA2 – antygenowego znacznika łańcuchów ciężkich immunoglobulin IgM. Badaniami objęto 51 jagniąt plenno-mlecznej owcy kołudzkiej, które po urodzeniu wypily siarę własnych matek, zawierającą immunoglobuliny klasy M. Obserwowano pojawienie się i zmiany poziomu badanych białek w surowicach krwi potomków od chwili urodzenia do wieku dwóch miesięcy. Kolejne próby krwi uzyskiwano od noworodków przed piciem siary, 24 h później, a następnie w 14., 28., 42. i 60. dniu życia jagniąt. Obecność białek z epitopem IghmA2 w surowicy krwi oraz w siarze wykrywano przy użyciu alloprzeciwciał anti-IghmA2, stosując test podwójnej immunodyfuzji w żelu agarowym (TPI). O zmianach poziomu badanych immunoglobulin wnioskowano na podstawie porównania siły reakcji i położenia linii precipitacyjnych dla kolejnych prób. Absorpcja siarowych IgM u badanych jagniąt nastąpiła w ciągu pierwszej doby życia. Rozpad wchłoniętych przeciwciał rozpoczął się i przebiegał u większości osesków przed 14. dniem życia, a u 8 jagniąt nastąpił w tym czasie całkowity zanik matczynych IgM. Część z tych jagniąt nie wytwarzała własnych przeciwciał z epitopem IghmA2, a część rozpoczęła ich wytwarzanie dopiero po całkowitym zaniku immunoglobulin siarowych. U tych ostatnich własne immunoglobuliny klasy M pojawiały się we krwi dopiero w 3. lub 4., a nawet 5. lub 6. tygodniu życia i utrzymywały się w krwiobiegu do chwili zakończenia doświadczenia. Uzyskane wyniki wskazują, że stopniowo rozwijająca się biosynteza własnych immunoglobulin M nie jest w stanie uzupełnić ubytków/braku degradowanych przeciwciał siarowych przez długi nieraz czas. U niektórych jagniąt obniżony poziom IgM odnotowywano już w 14. dniu i (nadal) w 42. dniu życia. Takie czasowe niedobory białek odpornościowych mogą być przyczyną zwiększonej podatności na różnorodne infekcje, typowe dla jagniąt w pierwszych tygodniach ich odchowu. Marker antygenowy IghmA2 wydaje się być użyteczny w badaniach występowania siarowych przeciwciał IgM w organizmach rozwijających się jagniąt, a zatem może być pomocny w ocenie kształtowania się nabytej odporności przeciwciałowej u owiec.

Immunoglobuliny klasy M są podstawowymi Ig w pierwotnej odpowiedzi odpornościowej typu humoralnego, a także – ze względu na pentameryczną formę cząsteczeki – odgrywają istotną rolę w aktywacji układu wiązania dopełniacza. Mimo że są najwcześniej syntetyzowaną w rozwoju osobniczym grupą białek odpornościowych, to w chwili urodzenia nie występują jeszcze w organizmach jagniąt; produkcja własnych IgM rozpoczyna się najwcześniej w 1–2 tygodniu życia (Deptuła i Buczek, 1998).

Całą pulę przeciwciał (łącznie z IgM) noworodki otrzymują zatem z siarą i to siarowe Ig stanowią w pierwszym okresie życia o poziomie odporności przeciwwzakaźnej. Istnieje wyraźna współzależność pomiędzy poziomem IgM w surowicy ciężarnych matek a ich zawartością w dostępnej dla osesków siarze; w wydzielinie gruczołu mlekowego owcy immunoglobuliny te stanowią około 5% białek odpornościowych (Hurley i Theil, 2011). Podobnie jak przeciwciała innych klas, w pierwszych kilkunastu godzinach życia są absorbowane z wypitej siary i przenikają do krwiobiegu noworodków zwierząt przeżuwiających na drodze pinocytozy. IgM są szybko metabolizowane ze względu na stosunkowo krótki, kilkudniowy okres półtrwania (Watson, 1992; Szulc i Zachwieja, 1998). Szybka degradacja siarowych immunoglobulin klasy M może prowadzić do zaostrzonych objawów niedoborów fizjologicznych tych przeciwciał w rozwijających się organizmach.

Znaczenie tej grupy białek odpornościowych w pierwotnej odpowiedzi immunologicznej czy w przebiegu apoptozy komórkowej (jako przeciwciała wielospecyficzne) skłania do podjęcia obserwacji pojawienia się, obecności i degradacji IgM, przyswajanych z siary owiec przez oseski.

Celem niniejszej pracy było określenie absorpcji i katabolizmu siarowych przeciwciał klasy M u jagniąt przy wykorzystaniu antygenowego znacznika łańcuchów ciężkich immunoglobulin IgM.

Material i metody

Badaniami objęto 51 jagniąt plenno-mlecznej owcy kołudzkiej, które po urodzeniu wypily siarę własnych matek, zawierającą immunoglobuliny klasy M z markerem IghmA2. Obserwowano pojawienie się i zmiany poziomu badanych białek w surowicach krwi jagniąt od urodzenia do osiągnięcia wieku dwóch miesięcy. Kolejne próby krwi uzyskiwano: tuż po urodzeniu (przed piciem siary), 24 h po pierwszym picu siary oraz w 14., 28., 42. i 60. dniu życia.

Obecność białek z epitopem IghmA2 w kolejnych próbach surowic (oraz w siarze matek) wykrywano przy użyciu uprzednio uzyskanych alloprzeciwciał anti-IghmA2 (Skiba i Węgrzyn, 1993; Skiba i in., 2000), stosując test podwójnej immunodyszufacji w żelu agarowym (TPI) według Ouchterlony (1953). Wykonano również kontrolnie oznaczanie w TPI dwóch markerów immunoglobulin IgG – znaczników IghgA1 i IghgA2. Testowanie prowadzono en bloc, nastawiając w teście obok siebie kolejne próby surowic, chronologicznie uzyskane od każdego z badanych jagniąt, a także próby surowic rodziców i wypitej siary. Na podstawie porównania siły reakcji i położenia linii precipitacyjnych dla kolejnych prób wnioskowano o obecności i zmianach poziomu badanych immunoglobulin. Wyniki określano w czterostopniowej skali, od braku reakcji do reakcji silnej.

W celu określenia genotypów jagniąt i ich rodziców wykorzystano genetyczne zależności genu *IGHMA2* oraz pary przeciwstawnych sobie genów *IGHGA1* – *IGHGA2*, warunkujących owcze przeciwciała klasy G. Wiadomo, że gen immunoglobulin IgM – *IGHMA2* jest ściśle sprzężony z *IGHGA2* i przeciwstawny wobec *IGHGA1* (Skiba i Węgrzyn, 1993).

Wyniki

W chwili urodzenia żaden z 51 noworodków nie posiadał we krwi immunoglobulin z epitopem IghmA2; przeciwciała klasy M wykryto u nich (w zróżnicowanej ilości) po upływie 24 godzin od pierwszego wypicia siary. Obie te obserwacje dotyczyły zarówno 45 homozygot dominujących A2/A2 i heterozygot A2/A0 (tab. 1), jak i 6 homozygot recesywnych A0/A0 (tab. 2). W tej grupie homozygot recesywnych w żadnym spośród czterech kolejnych oznaczeń (do końca doświadczenia) nie stwierdzono obecności immunoglobulin IgM. Wśród pozostałych jagniąt (tab. 1) wraz z przebiegiem badań odnotowywano stały wzrost poziomu badanego białka (10 sztuk), bądź też przejściowe obniżanie się poziomu immunoglobulin z epitopem IghmA2 (35 sztuk). W przypadku czterech osobników stwierdzono przejściowy zanik przeciwciał klasy M w jednej próbie surowicy (w 14. lub w 28. dniu życia). W ostatniej próbie (w wieku ~2 miesięcy) poziom badanego białka we krwi zbliżył się dla wszystkich 45 homozygot dominujących i heterozygot do poziomu oznaczonego w wypitej przez oseski siarze.

Omówienie wyników

Brak przeciwciał z markerem IghmA2 w chwili urodzenia świadczy o tym, że żadne z badanych 51 jagniąt nie syntetyzowało w życiu płodowym własnych immunoglobulin klasy M; w żadnym też przypadku nie nastąpiło przenikanie tych molekuł przez barierę łożyskową (Chełmońska-Soyta i Nikolańczuk, 2000).

Wkrótce po urodzeniu wszystkie oseski wypłyły siarę zawierającą IgM, a po 24 godzinach w ich krwi wykryto znaczniki tych przeciwciał. Zarówno nagle pojawienie się immunoglobulin w krwiobiegu, jak i to, że pojawiły się tam od razu w znacznej ilości (na poziomie zbliżonym do oznaczanego w wypitej siarze), świadczy o ich siarowym pochodzeniu. Absorpcja IgM u badanych jagniąt nastąpiła w ciągu pierwszej doby życia. Obserwacja ta jest zbliżona do spostrzeżeń innych badaczy: Marx i in. określili czas wchłaniania przeciwciał klasy M na ~26 (za: Szulc i Zachwieja, 1998), a Roy – na ~16 godzin (za: Waelchli i in., 1994). Pryswajalność tej frakcji Ig sięga w pierwszych godzinach życia 95% (Szulc i Zachwieja, 1998). Węgrzyn i in. (2001) stwierdzili obecność siarowych IgM w krwiobiegu jagniąt polskiej owcy długowłnistej już po dwóch godzinach od wypicia siary.

Badanie surowic uzyskanych w 14. dniu życia nie wykazało u żadnego jagnięcia wzrostu poziomu immunoglobulin z epitopem IghmA2. U 41 zwierząt dominował mniejszy lub większy spadek poziomu IgM, a u ośmiu spośród nich stwierdzono całkowity zanik badanych białek odpornościowych. Efekt ten był najprawdopodobniej wyrazem postępującego katabolizmu ograniczonej puli przeciwciał wchłoniętych z siary. Duże pentamery IgM są stosunkowo nietrwale; okres połowicznego rozpadu określano u bydła na 4 dni (Szulc i Zachwieja, 1998), a u jagniąt na 6 dni (Watson, 1992). Reasumując, rozpad siarowych przeciwciał klasy M rozpoczął się i przebiegał u badanych jagniąt przed 14. dniem życia, a u 8 spośród nich w tym czasie nastąpił całkowity zanik matczynych IgM (ten całkowity zanik wystąpił u jeszcze dwóch potomków, ale dopiero w kolejnej próbie – w wieku 28 dni). Część z tych jagniąt (6 homozygot recesywnych – tab. 2) nie wytwarzała własnych przeciwciał z epitopem IghmA2, a część (4 sztuki) rozpoczęła endosyntezę dopiero po całkowitym zaniku

immunoglobulin siarowych. Pełny rozkład siarowych IgM obserwowano także w badaniach Węgrzyzna i in. (2001); nastąpiło to pomiędzy 21. a 40. dniem życia jagniąt długowelnistych.

Tabela 1. Absorpcja i katabolizm siarowych przeciwciał z epitopem *IghmA2* u 45 jagniąt prowadzących syntezę własnych immunoglobulin klasy M

Table 1. Absorption and catabolism of colostrum antibodies with *IghmA2* epitope in 45 lambs that synthesize their own class M immunoglobulins

Genotypy rodziców* (locus <i>IGHMA</i>) Genotypes of parents* (<i>IGHMA</i> locus) ♂ x ♀	Liczba jagniąt No. of lambs	Genotypy jagniąt (locus <i>IGHMA</i>) Genotypes of lambs (<i>IGHMA</i> locus)	Reakcje prób surowic jagniąt z przeciwciałami anti-IghmA2** Reactions of samples of lamb sera with anti-IghmA2 antibodies**					
			przed wypiciem siary before colostrum ingestion	24 h	14 dni 14 days	28 dni 28 days	42 dni 42 days	60 dni 60 days
				po pierwszym wypiciu siary after first colostrum ingestion				
				↓	↓	↓	↓	↓
A2/A2 x A2/A2	10	A2/A2	-	+	+	++	++	+++
A2/A2 x A2/A0		A2/A0						
A2/A0 x A2/A0	4	A2/A2	-	+++	++	+++	+++	+++
A2/A2 x A2/A0	22	A2/A2	-	++	+	++	++	++
A2/A0 x A2/A0		A2/A0						
A2/A2 x A2/A0	5	A2/A2	-	+++	+	++	+++	+++
A2/A0 x A2/A0		A2/A0						
A2/A2 x A2/A0	1	A2/A2	-	+++	-	+	++	+++
A2/A2 x A2/A0	2	A2/A0	-	++	+	-	+	++
A2/A2 x A2/A0	1	A2/A0	-	++	-	++	++	++

* pełne nazwy genów: *IGHMA2* i *IGHMA0*

* full names of genes: *IGHMA2* and *IGHMA0*

** symbole „+” lub „-” oznaczają obecność lub brak cechy;

** symbols “+” or “-” indicate presence or absence of trait;

Siła reakcji : „+” słaba/weak;


Reaction intensity: „++” średnia/medium;


„+++” silna/strong;

Okresowy niedobór / brak przeciwciał klasy IgM:

Periodic deficiency / lack of class IgM antibodies:

+ ++ /-

 IgM zaabsorbowane z siary
IgM absorbed from colostrum

 prawdopodobnie własne IgM
probably own IgM


 własne IgM
own IgM

Tabela 2. Absorpcja i katabolizm siałowych przeciwciał z epitopem IghmA2 u 6 jagniąt – homozygot recesywnych *IGHMA0 / IGHMA0*Table 2. Absorption and catabolism of colostral antibodies with IghmA2 epitope in 6 lambs – *IGHMA0 / IGHMA0* recessive homozygotes

Genotypy rodziców* (locus <i>IGHMA</i>) Genotypes of parents* (<i>IGHMA</i> locus) ♂ x ♀	Liczba jagniąt No. of lambs	Genotypy jagniąt (locus <i>IGHMA</i>) Genotypes of lambs (<i>IGHMA</i> locus)	Reakcje prób surowic jagniąt z przeciwciałami anti-IghmA2** Reactions of samples of lamb sera with anti-IghmA2 antibodies**					
			przed wypiciem siary before colostrum ingestion	24 h	14 dni 14 days	28 dni 28 days	42 dni 42 days	60 dni 60 days
				po pierwszym wypiciu siary after first colostrum ingestion				
			↓	↓	↓	↓	↓	
A2/A0 × A2/A0 ^s								
A0/A0 × A2/A0 ^s	3	A0/A0	–	++	–	–	–	–
A2/A0 × A2/A0 ^s								
A0/A0 × A2/A0 ^s	3	A0/A0	–	+++	–	–	–	–

^s poziom IgM w siałce matek: +++

^s level of IgM in colostrum of mothers: +++

Pozostałe objaśnienia i symbole jak pod tab. 1.

For other explanations and symbols, see under Table 1.

W kolejnych próbach (od 28. doby życia) u niektórych jagniąt obserwowano masywne ewentualnej dalszej degradacji przeciwciał siałowych przez produkty postępującej (i zróżnicowanej) endosyntezy własnych immunoglobulin M, będącej wyrazem ekspresji odziedziczonych genów. Jak podaje literatura przedmiotu, produkcja przeciwciał u nowo narodzonych owiec rozpoczyna się najwcześniej syntezą IgM w 1–2 (Deptuła i Buczek, 1998) lub 2–3 tygodniu życia (Węgrzyn i in., 2001). W niniejszych badaniach (na podstawie analizy wyników TPI dla czterech jagniąt – tab. 1, trzy ostatnie rzędy tabeli) stwierdzono, że własne immunoglobuliny klasy M pojawiły się we krwi dopiero w trzecim lub czwartym (u 2 sztuk), a nawet w piątym lub szóstym (u innych dwóch osobników) tygodniu życia i utrzymywały się w krwiobiegu do chwili zakończenia doświadczenia.

Uzyskane wyniki wskazują, że stopniowo rozwijająca się biosynteza własnych immunoglobulin M nie jest w stanie uzupełnić ubytków/braku degradowanych przeciwciał siałowych przez długi nieraz czas. U niektórych jagniąt obniżony poziom IgM odnotowywano już w 14. dniu i (nadal) w 42. dniu życia. Takie czasowe niedobory białek odpornościowych mogą być przyczyną zwiększonej podatności jagniąt na różnorodne infekcje w początkowym okresie rozwoju osobniczego (Hein, 1995; McMurray, 1999). Podobne konkluzje sformułowane zostały w trakcie badań absorpcji i katabolizmu przeciwciał IgG u owiec oraz ekspresji genów, warunkujących syntezę tych immunoglobulin (Krzyścin, 2004; Krzyścin i in., 2002; Krzyścin i Korman, 2009). Jednakże, w czasie wspomnianych prac wykazano, że IgG siałowe dzięki swojemu stosunkowo długiemu okresowi połowicznego rozpadu, utrzymywały się w krwiobiegu jagniąt znacznie dłużej aniżeli obecnie badane IgM. Jednocześnie

stwierdzono, że synteza własnych przeciwciał IgG mogła rozpoczynać się wcześniej. Tak więc, fizjologiczne niedobory przeciwciał klasy IgG nie były ani tak długie, ani tak intensywne, jak obecnie określone niedobory immunoglobulin M. Świadczy o tym fakt, że u jagniąt absorbujących Ig oraz prowadzących syntezę własnych immunoglobulin stwierdzano tylko okresy hypogammaglobulinemiczne pod względem IgG, natomiast w obecnej pracy wykrywa się częste okresy agammaglobulinemiczne pod względem IgM.

Marker antygenowy IghmA2 wydaje się być użyteczny w badaniach występowania siarowych przeciwciał IgM w organizmach rozwijających się jagniąt, a zatem może być pomocny w ocenie kształtowania się nabytej odporności przeciwciałowej u owiec. Gwałtownie absorbowane z siary IgM szybko zabezpieczają oseski, jednakże (ze względu na krótki okres półtrwania) mogą ulegać stosunkowo szybkiemu rozpadowi i eliminacji z krwiobiegu – już przed upływem drugiego tygodnia życia. Ponadto, synteza własnych immunoglobulin M, o ile w ogóle jest prowadzona, rozpoczyna się u zwierząt dopiero w czasie 3. lub 4., a nawet 5. lub 6. tygodnia. Może to prowadzić do zaostrzonych i przedłużonych fizjologicznych niedoborów przeciwciał klasy M, sprzyjających zwiększonej podatności na różnorodne infekcje, typowe dla jagniąt w pierwszych tygodniach ich odchowu.

Piśmiennictwo

- Chełmońska-Soyta A., Nikołajczuk M. (2000). Immunologia ciąży i okresu neonatalnego ssaków hodowlanych. W: Noworodek a środowisko (monografia), A.B. Ślebodziński (red.), Poznań, ss. 19–37.
- Deptuła W., Buczek J. (1998). Zarys immunologii ssaków. III Układ odpornościowy przeżuwaczy. Wyd. UJ, ss. 51–69.
- Hein W.R. (1995). Sheep as experimental animals for immunological research. *The Immunologist* 3/1: 12–18.
- Hurley W.L., Theil P.K. (2011). Perspectives on immunoglobulins in colostrum. *Nutrients*, 3: 442–474.
- Krzyścin P. (2004). Antygenowe markery immunoglobulin jako wskaźniki fizjologicznych niedoborów przeciwciał u jagniąt. *Zesz. Nauk. Prz. Hod.*, 72, 3: 9–14.
- Krzyścin P., Korman K. (2009). Two epitopes of blood serum immunoglobulins as indicators of physiological antibody deficiency in lambs. *Ann. Anim. Sci.*, 9 (1): 27–33.
- Krzyścin P., Skiba E., Węgrzyn J. (2002). Expression of IgG immunoglobulin heavy chain *IGHG1* and *IGHG2* genes and absorption and catabolism of these proteins in lambs. *Ann. Anim. Sci.*, 2 (1): 101–111.
- McMurray D.N. (1999). Effect of moderate protein deficiency on immune function. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 21: 21–24.
- Ouchterlony O. (1953). Antigen – antibody reactions in gels. *Acta Pathol. Scand.*, 32: 231–237.
- Skiba E., Węgrzyn J. (1993). IgG and IgM antigenic markers in sheep. *Genet. Polon.*, 34, 4: 345–355.
- Skiba E., Węgrzyn J., Kościelny M. (2000). Epitopes of blood proteins in sheep and the nomenclature. *Ann. Anim. Sci.*, 27 (2): 27–35.
- Szulec T., Zachwieja A. (1998). Siara eliksir życia osesków (monografia). *Zesz. Nauk. AR Wrocław*, 327, Monografie, XIII.
- Waelchli R.O., Müller Ch., Hässig M., Rüschi P. (1994). Immunoglobulin concentrations in colostrum and serum of lambs of dairy sheep breeds. *Vet. Rec.*, 2: 16–17.

- Watson D. L. (1992). Biological half-life of ovine antibody in neonatal lambs and adult sheep following passive immunization. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 30: 221–232.
- Węgrzyn J., Skiba E., Kaczor U. (2001). Expression of IgM immunoglobulin heavy chain *IGHMA2* gene and absorption and catabolism of these proteins in lambs. *Ann. Anim. Sci.*, 1 (2): 45–52.

Zatwierdzono do druku 24 X 2011

PIOTR KRZYŚCIN, MAŁGORZATA NATONEK-WIŚNIEWSKA

Antigenic marker of class M immunoglobulins in a study of absorption and catabolism of colostrum-derived antibodies in lambs

SUMMARY

The aim of the study was to determine the absorption and catabolism of colostrum M-class antibodies in lambs using the antigenic marker of IgM immunoglobulin heavy chains.

Subjects were 51 lambs of the prolific-dairy Kolumbia sheep, which, after birth, ingested maternal colostrum containing class M immunoglobulins. The appearance and changes of the level of the analysed proteins in blood sera of progeny were observed from birth to two months of age. The next samples of blood were obtained from neonates before ingestion of colostrum, 24 h later and at 14, 28, 42 and 60 days of age. The presence of proteins with *IghmA2* epitope in the blood sera and in the colostrum was detected with anti-*IghmA2* alloantibodies, using the agar gel double immunodiffusion test. Changes in the level of the analysed immunoglobulins were determined by comparing the intensity of reaction and position of precipitation lines in successive samples.

Colostrum IgM were absorbed in the analysed lambs during the first 24 hours of life. The breakdown of the absorbed antibodies began and proceeded before 14 days of age in most neonatal lambs, 8 of which showed complete catabolism of maternal IgM during that time. Some of these lambs did not produce their own antibodies with *IghmA2* epitope, and some lambs only began to produce them after colostrum immunoglobulins completely disappeared. In the latter, own class M immunoglobulins only appeared in blood at 3, 4 or even at 5 and 6 weeks of age and remained in the blood stream until the end of the experiment.

The results obtained indicate that the gradually developing biosynthesis of the lamb's own M immunoglobulins cannot compensate for the deficiency/loss of degraded colostrum antibodies for sometimes long periods of time. In some lambs, reduced IgM levels were already noted at 14 days and were still observed on day 42. Such temporary deficiency of immune proteins may increase the animal's susceptibility to various infections typical of lambs during the first weeks of rearing.

The *IghmA2* antigenic marker appears to be useful in research on the presence of colostrum IgM antibodies in the body of growing lambs and thus can be of use in evaluating acquired antibody immunity in sheep.

Key words: IgM, absorption, catabolism, lambs

