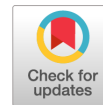


ВКЛАД ЛАКТОФЕРРИНА, СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА КЛАССА А В АНТИМИКРОБНУЮ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ ГРУДНОГО МОЛОКА



В.Г. Арзуманян¹, Т.И. Колыганова^{1,2}, О.А. Свитич^{1,2}, П.В. Самойликов¹,
С.Ю. Конаныхина¹, Т.А. Зайцева², В.В. Зверев^{1,2}

¹ ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

² ГАОУВ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Резюме. Проведена оценка вклада антимикробной активности sIgA, лактоферрина, α -лактальбумина, сывороточного альбумина и лизоцима в общую антимикробную активность сыворотки. Исследованы 66 образцов грудного молока, полученных от здоровых матерей в возрасте от 23 до 45 лет на разных сроках лактации. Установлено, что по мере увеличения периода лактации снижалась не только общая антимикробная активность ($r = -0,944$), но и активность низкомолекулярной фракции, содержащей сумму антимикробных пептидов ($r = -0,950$). Медианный уровень лактоферрина менялся от 3,46 мг/мл в молозиве до 0,94 мг/мл через год после начала лактации и коррелировал с активностью сыворотки ($r = 0,616$). Концентрация sIgA в образцах сыворотки была максимальной в сыворотке молозива (5,01 мг/мл) и резко падала при переходе к зрелому молоку, сохраняясь примерно на одном уровне в последующие периоды лактации (1,0 мг/мл). Концентрация сывороточного альбумина значимо снижалась по мере увеличения периода лактации (от 5,52 до 4,68 мг/мл) и коррелировала с активностью сыворотки ($r = 0,589$). Оценка действия очищенного препарата α -лактальбумина в диапазоне 5–20 мг/мл методами спектрофотометрии и микроскопии на клетки *C. albicans* показала отсутствие фунгицидной активности. В то же время очищенные лактоферрин, IgA, лизоцим и сывороточный альбумин демонстрировали прямой фунгицидный эффект. Активность препарата IgA в концентрации, соответствующей содержанию sIgA в сыворотке молозива на первые сутки после родоразрешения составила 50,0%, а через 12 месяцев — 31,0%; лактоферрина — 26,7 и 3,4%; сывороточного альбумина — 15,0 и 17,7%; лизоцима — 0,1 и 1,8%. Таким образом, сумма активностей этих полипептидов в концентрациях, характерных для молозива, составляет 91,7%, что сравнимо с общей активностью его сыворотки — 82,4%. Сумма активностей указанных полипептидов, типичных для 12 месяцев лактации, равна 53,9%, а общая активность сыворотки в этот период составила 64,5%. Итак, наиболее значимыми по антимикробной активности в сыворотке молозива являются IgA и лактоферрин, тогда как спустя 12 месяцев после начала лактации на первый план выходят IgA и сывороточный альбумин.

Ключевые слова: грудное молоко, лактоферрин, иммуноглобулин, сывороточный альбумин, антимикробная активность, *Candida albicans*.

Адрес для переписки:

Колыганова Татьяна Игоревна
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (495) 917-49-00.
E-mail: mech.inst@mail.ru

Contacts:

Tatiana I. Kolyganova
105064, Russian Federation, Moscow, Maly Kazenny lane, 5a.
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
Phone: +7 (495) 917-49-00.
E-mail: mech.inst@mail.ru

Для цитирования:

Арзуманян В.Г., Колыганова Т.И., Свитич О.А., Самойликов П.В.,
Конаныхина С.Ю., Зайцева Т.А., Зверев В.В. Вклад лактоферрина,
сывороточного альбумина и секреторного иммуноглобулина класса А
в антимикробную активность сыворотки грудного молока // Инфекция
и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 519–526. doi: 10.15789/2220-7619-GPO-1759

Citation:

Arzumanyan V.G., Kolyganova T.I., Svitich O.A., Samoilikov P.V.,
Konanykhina S.Yu., Zaytseva T.A., Zverev V.V. An impact of lactoferrin,
serum albumin and secretory immunoglobulin A in antimicrobial activity of breast milk whey // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3,
pp. 519–526. doi: 10.15789/2220-7619-GPO-1759

AN IMPACT OF LACTOFERRIN, SERUM ALBUMIN AND SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A IN ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BREAST MILK WHEY

Arzumanyan V.G.^a, Kolyganova T.I.^{a,b}, Svitich O.A.^{a,b}, Samoilkov P.V.^a, Konanykhina S.Yu.^a, Zaytseva T.A.^b, Zverev V.V.^{a,b}

^a *Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*

^b *First Moscow State Medical University I.M. Sechenov (Sechenov University), Moscow, Russian Federation*

Abstract. The contribution of the antimicrobial activity of sIgA, lactoferrin, α -lactalbumin, serum albumin, and lysozyme to the total antimicrobial activity of whey was evaluated. 66 breast milk samples from healthy women aged from 23 to 45 years collected at different periods of lactation were studied. It was found that along with proceeding the lactation period, not only the total antimicrobial activity ($r = -0.944$) decreased, but also the activity of the low molecular weight fraction containing the sum of antimicrobial peptides ($r = -0.950$). The median lactoferrin level varied from 3.46 mg/ml in colostrum down to 0.94 mg/ml one year after the onset of lactation that correlated with whey activity ($r = 0.616$). The concentration of sIgA was peaked in the whey of colostrum (5.01 mg/ml) and significantly reduced in mature milk, remaining approximately at the same level in subsequent periods of lactation (1.0 mg/ml). Serum albumin concentration significantly decreased while proceeding through lactation period (from 5.52 to 4.68 mg/ml) and correlated with whey activity ($r = 0.589$). Evaluating effects of the purified α -lactalbumin on *C. albicans* cells within the range of 5–20 mg/ml by spectrophotometry and microscopy showed the absence of fungicidal activity. At the same time, purified lactoferrin, IgA, lysozyme, and serum albumin demonstrated a direct fungicidal effect. The activity of the IgA preparation at a concentration relevant to the sIgA content in the whey of the first day colostrum was 50.0%, and in the whey after 12 months — 31.0%; lactoferrin — 26.7% and 3.4%; serum albumin — 15.0% and 17.7%; lysozyme — 0.1% and 1.8%. Thus, the sum of the activities of these polypeptides at concentrations typical for the first-day colostrum was 91.7%, which is comparable to the total activity of this whey — 82.4%. The sum of the activities of these polypeptides, typical for 12 months of lactation, was 53.9%, and the total whey activity relevant to this period was 64.5%. Therefore, IgA and lactoferrin contribute the most significant antimicrobial activity in the whey of colostrum, whereas after 12 month-breastfeeding IgA and serum albumin become most significant.

Key words: breast milk, lactoferrin, immunoglobulin A, serum albumin, antimicrobial activity, *Candida albicans*

Введение

Грудное молоко служит не только полноценным источником питания, но и обеспечивает противомикробную защиту протоков молочных желез матери и пищеварительного тракта ребенка от патогенной микробиоты. В качестве антимикробных агентов грудного молока могут выступать как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные полипептиды. Среди высокомолекулярных факторов гуморальной защиты обычно упоминают казеин, муцин и иммуноглобулины классов А, G и M, причем в наиболее высокой концентрации в грудном молоке представлен секреторный иммуноглобулин — sIgA — от 2 до 5,5 мг/мл [9]. К низкомолекулярным факторам относятся антимикробные (поли)пептиды (АМП) — лактоферрин, лизоцим, дефензины, кателицидин, лактопероксидаза, дермцидин, гепцидин, лактальбумин и др. [5]. Среди АМП в наибольших концентрациях в грудном молоке встречаются лактоферрин (до 7 мг/мл) [19], лактальбумин (до 4 мг/мл) [11] и лизоцим (до 0,9 мг/мл) [16]. Кроме того, в грудном молоке присутствует сывороточный альбумин, который по нашим данным также обладает антимикробной активностью [2]. Показано также, что наибольшая концентрация АМП имеет место в молозиве [5]. Недавно с помощью метода спектрофотометрии установлено, что антимикробная активность сыворотки грудного молока находится в обратной корреляции с периодом лактации,

то есть наибольшую защиту ребенка от патогенов обеспечивает молозиво [4]. Однако отсутствуют данные о вкладе наиболее значимых антимикробных компонентов и низкомолекулярной фракции сыворотки в общую противомикробную активность грудного молока на протяжении всего периода лактации, что и явилось целью настоящего исследования.

Материалы и методы

В исследование включены 66 образцов грудного молока, полученных от здоровых матерей в возрасте от 23 до 45 лет на разных сроках лактации. Свежесобранные образцы замораживали до момента получения сывороток при -25°C .

Сыворотки получали в два этапа: 1) обезжиривание путем центрифугирования со скоростью 16 000 об/мин в течение 5 мин; 2) удаление казеина путем подкисления 20% раствором лимонной кислоты из расчета 0,06 мл кислоты на 4 мл с повторным центрифугированием [3].

Антимикробную активность определяли методом спектрофотометрии [7]. Для этого 300 мкл сыворотки соединяли с 50 мкл суспензии клеток *Candida albicans* № 927 (коллекция НИИВС им. Мечникова), выращенной на плотной глюкозо-пептон-дрожжевой среде; контрольная проба вместо сыворотки содержала 300 мкл физраствора. Суспензию клеток готовили из расчета 1 микробиологическая петля в 50 мкл физраствора. Пробы инкубировали 2 ч при 32°C на шейкере,

центрифугировали 5 мин со скоростью 16 000 об/мин, надосадочную жидкость удаляли, а в осадки вносили по 300 мкл раствора бромкрезолового пурпурного в фосфатном буфере pH 4,6. Пробы повторно инкубировали 45 мин при 32°C и вновь центрифугировали. Осадки микроскопировали при суммарном увеличении 1750 (ЛОМО, Россия) и фотографировали цифровой камерой «Sony» (Япония). Из полученных супернатантов отбирали по 50 мкл и соединяли с 2,5 мл фосфатного буфера (pH 4,6). Оптическую плотность полученных растворов оценивали на спектрофотометре «Genesys 10SUV-Vis» (США), длина волны 440 нм. Для каждой пробы рассчитывали среднее значение из трех измерений. Активность рассчитывали, как отношение разности между оптической плотностью контрольного и опытного образцов, отнесенной к оптической плотности контрольного образца и выраженной в процентах [1].

Низкомолекулярную фракцию, содержащую комплекс АМП, получали из сывороток путем их фильтрации через молекулярные фильтры с размером пор 100 kDa (Amicon Ultra-0,5, Millipore, Merck). Для этого в предварительно замоченные дистиллированной водой в течение 1 ч фильтры вносили по 500 мкл сыворотки и центрифугировали со скоростью 16 000 об/мин в течение 15 мин. Антимикробную активность полученных фильтратов определяли аналогично образцам сыворотки (см. выше).

Активность чистых препаратов лактоферрина, лактальбумина и лактопероксидазы, полученных из грудного молока методом ионообменной хроматографии (Лактбио, Москва), человеческого сывороточного альбумина (квалификация High Purity, EMD Millipore Corp., США), человеческого IgA (Имтек, Россия), а также яичного лизоцима (квалификация BioChemica, AppliChem, США), оценивали тем же способом (см. выше).

Уровень лактоферрина в образцах сыворотки определяли методом иммуноферментного анализа с помощью тест-системы «ELISA Kit for Lactoferrin (LTF human)» (Cloud-Clone Corp., США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Тест-система предназначена для определения лактоферрина в различных биожидкостях, включая сыворотку грудного молока. Разведение сывороток составило 1:1 000 000.

Уровень sIgA в образцах сыворотки оценивали методом иммуноферментного анализа с помощью тест-системы «IgA секреторный-ИФА-БЕСТ» (Вектор-Бест, Новосибирск), предназначенной для определения данного иммуноглобулина в образцах сыворотки крови. Разведение сывороток грудного молока составило 1:10 000.

Концентрацию сывороточного альбумина измеряли с помощью набора реагентов «Альбумин

Абрис+» (НПФ «Абрис+», Санкт-Петербург). Метод основан на образовании окрашенных комплексных соединений при взаимодействии альбумина с бромкрезоловым зеленым в слабокислой среде в присутствии детергента. К 10 мкл сыворотки добавляли 2 мл реактива, выдерживали 10 мин при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность при длине волны 628 нм. Предварительно с помощью того же набора реагентов оценивали взаимодействие чистого лактальбумина, полученного путем ионообменной хроматографии из грудного молока (Лактбио, Москва), с тем же реактивом. Анализ показал отсутствие реакции между лактальбумином и указанными выше реагентами.

Расчет продукции и потребления лактоферрина, лизоцима, сывороточного альбумина и sIgA на первые сутки и через 12 месяцев от начала лактации проводили на основании собственных данных и данных литературы.

Статистический анализ выполняли с помощью программы Microsoft Excel. Расчет коэффициентов Манна–Уитни, свидетельствующих о наличии/отсутствии значимости различий между показателями, проводили с помощью автоматической программы [6].

Результаты

Образцы сывороток грудного молока разделили на 5 равноценных групп в соответствии с периодом лактации: первая группа состояла из сывороток молозива, остальные — из сывороток переходного и зрелого молока (табл. 1). Видно, что по мере увеличения периода лактации значительно снижалась не только общая антимикробная активность, но и активность фракции, содержащей АМП, о чем свидетельствуют соответствующие значения коэффициентов Манна–Уитни. При этом обращают на себя внимание высокие значения коэффициентов Пирсона, свидетельствующие о наличии положительной корреляции между этими показателями, а также об их обратной корреляции по отношению к периоду лактации. Однако с возрастом матери ни общая антимикробная активность, ни активность АМП фракции сыворотки не были связаны.

На одном из наиболее активных образцов сыворотки молока проведено исследование его действия на клетки *C. albicans* методом микроскопии: в контрольном варианте присутствуют как живые (белые) клетки, так и некоторое количество мертвых (желтых клеток) (рис. 1А, III обложка); в пробе, обработанной цельной сывороткой — обилие клеточного дебриса (полностью разрушенных клеток) и немного живых (рис. 1Б, III обложка); в пробе, обработанной низкомолекулярной фракцией сыворотки, мертвые клетки явно преобладают над живыми (рис. 1В, III обложка).

Таблица 1. Взаимосвязь биологических и иммунологических показателей сыворотки грудного молока
Table 1. Interrelation of biological and immunological parameters of breast milk serum

Человек в группе, N Subjects in group, N	Период лактации Lactation period	Период лактации, месяцы (медиана) Lactation period, months (median)	Возраст матери, лет (медиана) Mother's age, years (median)	Активность сыворотки общая, % (медиана) Total serum activity, % (median)	Активность фракции ниже 100 kDa, % (медиана) Activity of the fraction lower 100 kDa, % (median)	Лактоферрин, мг/мл (медиана) Lactoferrin, mg/ml (median)	Альбумин сывороточный, мг/мл (медиана) Serum albumin, mg/ml (median)	lgA, мг/мл (медиана) lgA, mg/ml (median)
12	1 день – 1 неделя 1 day – 1 week	0,067	31	82,4	37,9	3,46	5,53	5,01
12	2 недели – 2,5 месяца 2 weeks – 2.5 months	1	28	84,8	34,6	1,39	4,80	0,92
14	3–7,5 месяцев 3–7.5 months	5	31,5	73,2	31,2	1,49	4,77	1,00
14	8–11 месяцев 8–11 months	9	30,5	63,6	28,4	1,19	4,73	1,30
14	12–27 месяцев 12–27 months	15	30,5	61,8	26,4	0,94	4,68	0,94
r ₁		-0,944	-0,431	-0,944	-0,950	-0,668	-0,643	-0,527
r ₂				-	0,937	0,616	0,589	0,452
r ₃				-0,431	-0,189	0,265	0,226	0,315
Значимость различий между 1 и 5 группами Significance of differences between groups 1 and 5	-	p ≤ 0,01	p > 0,05	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01

Примечание. r₁ — коэффициент корреляции Пирсона, характеризующий наличие взаимосвязи данного показателя с периодом лактации; r₂ — коэффициент корреляции Пирсона, характеризующий наличие взаимосвязи данного показателя с возрастом матери. Note. r₁ — Pearson's correlation coefficient, characterizing interrelation between this parameter with the lactation period; r₂ — Pearson correlation coefficient, characterizing interrelation between this parameter with the total activity of serum; r₃ — Pearson's correlation coefficient, characterizing interrelation between this parameter with the age of the mother.

Оценка содержания лактоферрина в изучаемых образцах сыворотки показала, что наиболее высокие его концентрации имели место в молозиве, причем отмечено его многократное снижение при переходе к зрелому молоку. Уровень лактоферрина имел высокую положительную корреляцию не только с общей противомикробной активностью (табл. 1), но и с активностью АМП фракции сыворотки — коэффициент Пирсона составил 0,845. Экспериментальные и расчетные данные, касающиеся продукции и потребления лактоферрина на первые сутки и через 12 месяцев от начала лактации приведены в табл. 2.

Оценка действия нативного альфа-лактальбумина в концентрации 5–20 мг/мл методами спектрофотометрии на клетки изучаемого штамма *C. albicans* показала отсутствие какой-либо фунгицидной активности. Полученный результат подтвержден также методом микроскопии — клетки дрожжей оставались интактными после 2 ч инкубации с этим препаратом.

Концентрация сывороточного альбумина значительно снижалась по мере увеличения периода лактации и коррелировала с активностью сыворотки (табл. 1). Имела место также высокая положительная корреляция с лактоферрином ($r = 0,994$). Расчет максимальной продукции и потребления сывороточного альбумина приведен в табл. 2.

Исследование концентрации sIgA в образцах сыворотки показало, что она была максимальной в сыворотке молозива и резко падала при переходе к зрелому молоку, сохраняясь примерно на одном уровне в последующие периоды лактации (табл. 1). Расчет наибольшей продукции и потребления sIgA приведен в табл. 2.

Концентрацию лизоцима в сыворотке грудного молока в данном исследовании не определяли. Для расчетов воспользовались данными [16], где показано, что на всем протяжении периода лактации лизоцим меняется от 0,32 мг/мл в молозиве до 0,85 мг/мл спустя год после начала лактации [16]. Наибольшие расчетные значения продукции и потребления лизоцима приведены в табл. 2.

Фунгицидная активность лактопероксидазы при концентрации 2,5 мг/мл составила 12–14%.

Для того чтобы оценить вклад лактоферрина, сывороточного альбумина, лизоцима и IgA в антимикробную активность сыворотки грудного молока в первые сутки и через 12 месяцев после начала лактации, провели определение противомикробной активности чистых препаратов этих полипептидов в концентрациях, соответствующих их содержанию в молозиве и грудном молоке в указанные периоды (табл. 2). Полученные данные представлены на рис. 2. Сумма активностей этих полипептидов в концентрациях, характерных для односуточного молозива, составляет 91,7%, что сравнимо с об-

Таблица 2. Экспериментальные и расчетные данные по продукции и потреблению лактоферрина, лизоцима, сывороточного альбумина и sIgA на первые сутки и через 12 месяцев от начала лактации

	Средний объем в сутки, мл* Average volume per day, ml*	Средний вес ребенка, кг* Average weight of a child, kg*	Лактоферрин Lactoferrin		Лизоцим Lysozyme		Сывороточный альбумин Serum albumin		Секреторный IgA Secretory IgA	
			Макс. концентрация, мг/мл Max. concentration, mg/ml	Макс. потребление, мг/кг × сут. Max. consumption, mg/kg × day	Макс. концентрация, мг/мл* Max. concentration, mg/ml*	Макс. потребление, мг/кг × сут. Max. consumption, mg/kg × day	Макс. концентрация, мг/мл Max. concentration, mg/ml	Макс. потребление, мг/кг × сут. Max. consumption, mg/kg × day	Макс. концентрация, мг/мл Max. concentration, mg/ml	Макс. потребление, мг/кг × сут. Max. consumption, mg/kg × day
Молозиво (1-е сутки) Colostrum (1 st day)	10	3	10,8	36	0,32	1,1	8,8	29	6,8	22,7
Зрелое молоко (12 месяцев) Mature milk (12 months)	650	10	1,0	65	0,85	55,3	4,7	305	2,0	130,0
Кратность увеличения за 12 месяцев Multiplicity of increase in 12 months			–	1,8	–	50,3	–	10,5	–	5,7

Примечание. * — приведены данные из литературных источников.
Note. * — data from literary sources.

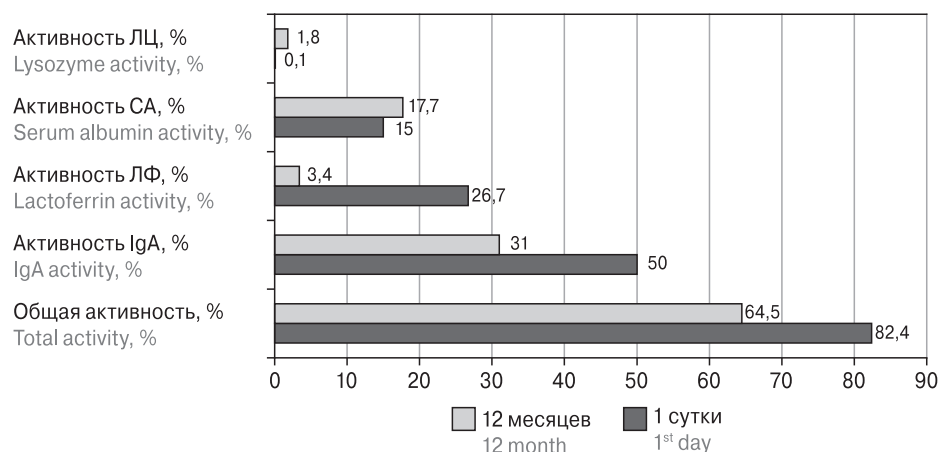


Рисунок 2. Вклад лактоферрина, сывороточного альбумина, лизоцима и IgA в антимикробную активность сыворотки грудного молока в первые сутки и через 12 месяцев после начала лактации

Figure 2. An impact of lactoferrin, serum albumin, lysozyme and IgA to the antimicrobial activity of breast milk serum on the first day and 12 months after the onset of lactation

шей активностью сыворотки для этого периода. Сумма активностей в концентрациях, типичных для 12 месяцев лактации, равна 53,9%, что также сравнимо с общей активностью в указанный период. Микроскопия образцов клеток дрожжей, обработанных этими полипептидами, показала наличие фунгицидного эффекта: клетки разрушались с образованием дебриса.

Обсуждение

Фунгистатическое действие грудного молока было ранее установлено методом посевов [8]. Методы спектрофотометрии и микроскопии позволяют оценить фунгицидный эффект любой биожидкости по отношению к клеткам микроорганизмов [7]. Ранее этими методами показано фунгицидное действие сыворотки грудного молока на клетки дрожжей *C. albicans* [4]. В настоящем исследовании получены данные, подтверждающие антимикробную активность цельной сыворотки. Кроме того, изучена антимикробная активность низкомолекулярной фракции сыворотки, содержащей АМП. Оказалось, что как общая активность сыворотки, так и активность ее низкомолекулярной фракции обратно пропорциональны длительности периода лактации, но не связаны с возрастом матери.

Одним из основных белков сыворотки грудного молока является лактоферрин, который составляет до 20% от общего белка сыворотки [14]. Он устойчив к протеолизу и выполняет ряд функций: участвует в процессах эндоцитоза; внутри клеток действует как регулятор экспрессии многих генов, в том числе отвечающих за синтез цитокинов; способствует поглощению железа клетками; является эффективным модулятором воспалительного и иммунного ответа. На клетки микроорганизмов он действует двояко — с одной

стороны, обедняет среду, связывая ионы железа, с другой — нарушает целостность мембран. Известно, что лактоферрин оказывает фунгистатическое действие на клетки *C. albicans*, подтвержденное методом посевов [21]. Полученные нами результаты по снижению его концентрации при переходе от молозива к зрелому молоку согласуются с данными других авторов [14]. Необходимо отметить, что снижение содержания лактоферрина (табл. 1) и его доли в общей антимикробной активности сыворотки (рис. 2) в процессе лактации не критично, поскольку за счет увеличения объема продуцируемого молока общее потребление этого полипептида за 12 месяцев кормления возрастает почти вдвое (табл. 2).

Альфа-лактальбумин составляет 25–35% от сывороточного белка, а его концентрация равна в среднем 4,3 мг/мл в молозиве и 2,6 мг/мл через год после начала лактации [14]. Известно, что альфа-лактальбумин ингибирует рост микроорганизмов, по-видимому, за счет связывания ионов кальция, цинка и железа, а пептиды, образующиеся при его протеолизе, обладают фунгицидным эффектом [15]. В настоящем исследовании установлено, что этот полипептид не проявляет непосредственной фунгицидной активности.

Лактопероксидаза не вносит существенного вклада в общую антимикробную активность грудного молока, поскольку содержание этого полипептида варьирует в пределах $0,77 \pm 0,38$ мг/л [21], а в данном исследовании установлено, что фунгицидную активность этот полипептид проявлял в концентрации выше 1 мг/мл.

Считают, что сывороточный альбумин синтезируется не молочной железой, а проникает в грудное молоко из сосудов [14]. Содержание сывороточного альбумина, оцененное нами

с помощью вышеуказанного реагента, превысило данные, полученные другими исследователями — менее 1 мг/мл [17], что, вероятно, связано с использованием ими метода препаративного электрофореза. Ранее нами установлено, что сывороточный альбумин в широком диапазоне концентраций проявлял антимикробную активность [2]. Изменение содержания этого полипептида в процессе лактации не настолько значимо, как в случае с лактоферрином (табл. 1), но его вклад в общую активность (рис. 2) и суточное потребление (табл. 2) значительно повышаются через год после начала лактации.

Лизоцим в связи с низкой его концентрацией в молозиве и зрелом молоке не вносит существенного вклада в общую активность сыворотки (рис. 2), однако его потребление значительно возрастает с увеличением периода лактации (табл. 2).

Полученные нами данные по изменению концентрации секреторного иммуноглобулина класса А на протяжении периода лактации согласуются с результатами других авторов [14]. В научной литературе есть данные о фунгистатической активности IgA по отношению к дрожжам *C. albicans*, оцененной методом посевов [10]. На моноклональных антителах класса А показано наличие фунгицидной активности против тех же дрожжей, установленной тем же методом [13]. Однако в современных учебных пособиях и на-

учных публикациях указано, что антитела непосредственным микробицидным действием не обладают. В настоящем исследовании опыты по фунгицидной активности чистого препарата иммуноглобулина проводили не на sIgA, а на IgA. На основании полученных данных можно подтвердить, что иммуноглобулин класса А оказывает прямое микробицидное действие на клетки *C. albicans*, которое проявляется в разрушении клеточных стенок и мембран этих дрожжей, наблюдаемом через 2 ч от начала эксперимента.

Очевидно, что наиболее значимыми по антимикробной активности в сыворотке молозива являются IgA и лактоферрин, тогда как спустя 12 месяцев после начала лактации на первый план выходят IgA и сывороточный альбумин. Известно, что совместное действие АМП может носить синергичный характер [18], что не исключает и взаимного подавления активности и подтверждается сравнением суммы активностей отдельных полипептидов с общей активностью сыворотки (рис. 2). Однако данное предположение требует дальнейших исследований.

Благодарности

Авторы благодарят сотрудников лаборатории физиологии грибов и бактерий Артемьеву Тамару Алексеевну и Бутовченко Любовь Михайловну за техническую и моральную поддержку.

Список литературы/References

1. Арзуманян В.Г., Ожован И.М. Модифицированный метод оценки целостности цитоплазматической мембраны клеток эукариот // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002. Т. 134, № 7. С. 118–120. [Arzumanyan V.G., Ozhovan I.M. Modified method for evaluation of plasma membrane integrity in eukaryotic cell. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2002, vol. 134, no. 7, pp. 118–120. (In Russ.)] doi: 10.1023/A:1020641629319
2. Арзуманян В.Г., Ожован И.М., Свитич О.А. Антимикробное действие альбумина на клетки бактерий и дрожжей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т. 167, № 6. С. 722–725. [Arzumanyan V.G., Ozhovan I.M., Svitich O.A. Antimicrobial effect of albumin on bacteria and yeast cells. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2019, vol. 167, no. 6, pp. 763–766. (In Russ.)] doi: 10.1007/s10517-019-04618-6
3. Богатова О.В., Догаева Н.Г. Определение качества молока: методические указания к лабораторному практикуму. Оренбург: Оренбургский государственный университет, 2002. 39 с. [Bogatova O.V., Dogaeva N.G. Determination of milk quality: methodological instructions for laboratory practice. *Orenburg: Orenburg State University*, 2002. 39 p. (In Russ.)]
4. Колыганова Т.И., Арзуманян В.Г., Богданова Е.А., Зверев В.В. Альтернативные методы оценки противомикробной активности сыворотки грудного молока // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Т. 171, № 4. С. 525–528. [Kolyganova T.I., Arzumanyan V.G., Bogdanova E.A., Zverev V.V. Alternative methods in estimation of antimicrobial activity of breast milk serum. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2021, vol. 171, no. 4, pp. 525–528. (In Russ.)] doi: 10.47056/0365-9615-2021-171-4-525-528
5. Колыганова Т.И., Арзуманян В.Г., Хорошко Н.В., Зверев В.В. Различия гуморальных факторов иммунной защиты грудного молока и молозива // Вопросы детской диетологии. 2021. Т. 19, № 2. С. 33–40. [Kolyganova T.I., Arzumanyan V.G., Khoroshko N.V., Zverev V.V. Differences in the humoral factors of the immune defence of breast milk and colostrum. *Voprosy detskoi dietologii = Pediatric Nutrition*, 2021, vol. 19, no. 2, pp. 33–40. (In Russ.)] doi: 10.20953/1727-5784-2021-2-33-40
6. Математические методы обработки данных (онлайн расчет). [Mathematical methods of data processing (online calculation)]. URL: <https://www.psychol-ok.ru/lib/statistics.html>
7. Патент № 2602298 Российская Федерация, МПК G01N 33/48 (2006.01). Способ определения совокупной активности антимикробных пептидов как маркера состояния местного иммунитета различных эпителиальных тканей: № 2015113069/15; заявлено 2015.10.04; опубликовано 2016.11.20 / Арзуманян В.Г., Мальбахова Е.Т., Фошина Е.П., Артемьева Т.А., Бутовченко Л.М., Вартанова Н.О., Шмелева О.А. Патентообладатель: ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. 10 с. [Patent No. 2602298 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/48 (2006.01). Method for determining antimicrobial peptide total activity as a marker of tissue immunity state of various epithelial tissues. No. 2015113069/15; application: 2015.10.04:

- date of publication 2016.11.20 / Arzumanjan V.G., Malbakhova E.T., Foshina E.P., Artemeva T.A., Butovchenko L.M., Vartanova N.O., Shmeleva O.A. Proprietors: Gosudarstvennoe uchrezhdenie Nauchnoissledovatel'skij institut vaksiny i syvorotok im. I.I. Mechnikova (GU NIIVS im. I.I. Mechnikova). 10 p.]
8. Andersson Y., Lindquist S., Lagerqvist C., Hernell O. Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk. *Early Hum. Dev.*, 2000, vol. 59, no. 2, pp. 95–105. doi: 10.1016/s0378-3782(00)00086-4
 9. Brandtzaeg P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J. Pediatr.*, 2010, vol. 156, no. 2 (Suppl.), pp. S8–S15. doi: 10.1016/j.jpeds.2009.11.014
 10. Funakoshi S., Doi T., Nakajima T., Suyama T., Tokuda M. Antimicrobial effect of human serum IgA. *Microbiol. Immunol.*, 1982, vol. 26, no. 3, pp. 227–239. doi: 10.1111/j.1348-0421.1982.tb00174.x
 11. Garcia-Rodenas C.L., De Castro C.A., Jenni R., Thakkar S.K., Beauport L., Tolsa J.F., Fischer-Fumeaux C.J., Affolter M. Temporal changes of major protein concentrations in preterm and term human milk. A prospective cohort study. *Clin. Nutr.*, 2019, vol. 38, no. 4, pp. 1844–1852. doi: 10.1016/j.clnu.2018.07.016.
 12. Garib D.J., Ahmed A.A., Ismaeil A.S. Inhibitory effect of breast milk against pediatric bacterial infection. *J. Pure Appl. Sci.*, 2011, vol. 23, 7p.
 13. Kavishwar A., Shukla P.K. Candidacidal activity of a monoclonal antibody that binds with glycosyl moieties of proteins of *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 2006, vol. 44, no. 2, pp. 159–167. doi: 10.1080/13693780500266038
 14. Lönnerdal B., Erdmann P., Thakkar S.K., Sauser J., Destailats F. Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a developmental perspective. *J. Nutr. Biochem.*, 2017, vol. 41: 1–11. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.06.001
 15. Lönnerdal B., Lien E.L. Nutritional and physiologic significance of alpha-lactalbumin in infants. *Nutr. Rev.*, 2003, vol. 61, no. 9, pp. 295–305. doi: 10.1301/nr.2003.sept.295-305.
 16. Montagne P., Cuillière M.L., Molé C., Béné M.C., Faure G. Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2001, vol. 501, pp. 241–247. doi: 10.1007/978-1-4615-1371-1_30
 17. Nagasawa T., Kiyosawa I., Fukuwatari Y., Kitayama T., Uechi M. Alpha-lactalbumin and serum albumin in human milk. *J. Dairy Sci.*, 1973, vol. 56, no. 2, pp. 177–180. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(73)85142-2
 18. Nakano M., Suzuki M., Wakabayashi H., Hayama K., Yamauchi K., Abe F., Abe S. Synergistic anti-candida activities of lactoferrin and the lactoperoxidase system. *Drug Discov. Ther.*, 2019, vol. 13, no. 1, pp. 28–33. doi: 10.5582/dtd.2019.01010
 19. Rai D., Adelman A.S., Zhuang W., Rai G.P., Boettcher J., Lönnerdal B. Longitudinal changes in lactoferrin concentrations in human milk: a global systematic review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2014, vol. 54, no. 12, pp. 1539–1547. doi: 10.1080/10408398.2011.642422
 20. Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P., Wu P.C., So M. The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans*. *APMIS*, 1997, vol. 105, no. 11, pp. 875–883.
 21. Shin K., Hayasawa H., Lönnerdal B. Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immunoabsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, vol. 73, no. 5, pp. 984–989. doi: 10.1093/ajcn/73.5.984

Авторы:

Арзуманян В.Г., д.б.н., профессор, зав. лаб. физиологии грибов и бактерий ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Колыганова Т.И., ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет); младший научный сотрудник лаборатории физиологии грибов и бактерий ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Свитич О.А., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, директор ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Самойликов П.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории аллергодиагностики ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Конаныхина С.Ю., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологических методов исследования ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Зайцева Т.А., к.м.н., старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;
Зверев В.В., академик РАН, д.б.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет); научный руководитель Института ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Arzumanian V.G., PhD, MD (Biology), Professor, Head of Laboratory Physiology of Fungi and Bacteria, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Kolyganova T.I., Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; Junior Researcher, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Svitich O.A., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Professor of the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;
Samoylikov P.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Allergy Diagnostics, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Konanykhina S.Yu., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Immunodiagnostic Research Methods, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Zaytseva T.A., PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;
Zverev V.V., RAS Full Member, PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; Scientific Director of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Иллюстрация к статье «Вклад лактоферрина, сывороточного альбумина и секреторного иммуноглобулина класса А в активную активность сыворотки грудного молока» (авторы: В.Г. Арзуманян, Т.И. Колыганова, О.А. Свитич, П.В. Самойликов, С.Ю. Конаныхина, Т.А. Зайцева, В.В. Зверев) (с. 519–526)

Illustration for the article “An impact of lactoferrin, serum albumin and secretory immunoglobulin A in antimicrobial activity of breast milk whey” (authors: Arzumanian V.G., Kolyganova T.I., Svitich O.A., Samoilikov P.V., Konanykhina S.Yu., Zaytseva T.A., Zverev V.V.) (pp. 519–526)

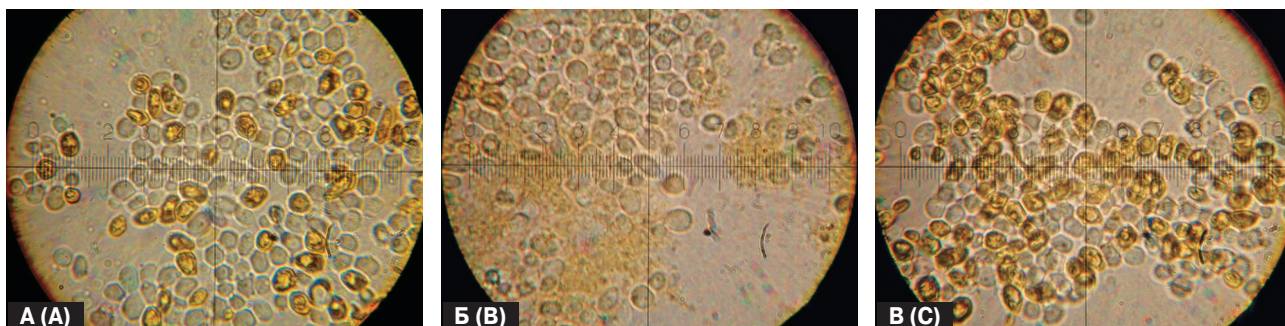


Рисунок 1. Микроскопия клеток *C. albicans*

Figure 1. Microscopy of *C. albicans* cells

Примечание. А — контроль — 2 ч инкубации с физраствором; Б — 2 часа инкубации с сывороткой грудного молока; В — 2 часа инкубации с фракцией сыворотки ниже 100 kDa. Желтые клетки — мертвые, белые — живые (увеличение микроскопа $\times 1750$).

Note. A — control — 2 h incubation with saline; B — 2 h incubation with breast milk serum; C — 2 h incubation with a serum fraction below 100 kDa. Dead and live cells are highlighted in yellow and white, respectively (microscope magnification $\times 1750$).