

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

В. Г. Арзуманян¹,

Т. И. Кольганова^{1,2},

О.А. Свитич^{1,2},

П.В. Самойликов¹,

С.Ю. Конаныхина¹,

Зайцева Т. А.²,

В. В. Зверев^{1,2}

¹ФГБНУ НИИ Вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, 105064;
директор, чл.-корр. РАН Свитич О.А.

²Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии ГАОУВ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет), Москва; зав. кафедрой – академик РАН Зверев В. В.

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

Arzumanian V.G.^a,

Kolyganova T. I.^{a,b},

Svitich O. A.^{a,b},

Samoilikov 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; Director, Corresponding member of Russian Academy of Sciences, Oxana A. Svitich

^bDepartment of Microbiology, Virology and Immunology, First Moscow State Medical University I.M. Sechenov, (Sechenov University), Moscow; head of the Department - Academician of Russian Academy of Sciences Zverev V.V.

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 значительно 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 %. И так, 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*

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*

1 **Введение**

2 Грудное молоко служит не только полноценным источником питания, но и
3 обеспечивает противомикробную защиту протоков молочных желез матери и
4 пищеварительного тракта ребенка от патогенной микробиоты. В качестве
5 антимикробных агентов грудного молока могут выступать как
6 высокомолекулярные, так и низкомолекулярные полипептиды. Среди
7 высокомолекулярных факторов гуморальной защиты обычно упоминают
8 казеин, муцин и иммуноглобулины классов А, G и М, причем в наиболее
9 высокой концентрации в грудном молоке представлен секреторный
10 иммуноглобулин - sIgA — от 2 до 5,5 мг/мл [9]. К низкомолекулярным
11 факторам относятся антимикробные (поли)пептиды (АМП) – лактоферрин,
12 лизоцим, дефензины, кателицидин, лактопероксидаза, дермцидин, гепцидин,
13 лактальбумин и др. [6]. Среди АМП в наибольших концентрациях в грудном
14 молоке встречаются лактоферрин (до 7 мг/мл) [19], лактальбумин (до 4
15 мг/мл) [12] и лизоцим (до 0,9 мг/мл) [16]. Кроме того, в грудном молоке
16 присутствует сывороточный альбумин, который по нашим данным также
17 обладает антимикробной активностью [3]. Показано также, что наибольшая
18 концентрация АМП имеет место в молозиве [6]. Недавно с помощью метода
19 спектрофотометрии установлено, что антимикробная активность сыворотки
20 грудного молока находится в обратной корреляции с периодом лактации, т. е.
21 наибольшую защиту ребенка от патогенов обеспечивает молозиво [5].
22 Однако отсутствуют данные о вкладе наиболее значимых антимикробных
23 компонентов и низкомолекулярной фракции сыворотки в общую
24 противомикробную активность грудного молока на протяжении всего
25 периода лактации, что и явилось целью настоящего исследования.

26 **Материалы и методы**

27 В исследование включены 66 образцов грудного молока, полученных от
28 здоровых матерей в возрасте от 23 до 45 лет на разных сроках лактации.

29 Свежесобранные образцы замораживали до момента получения сывороток
30 при - 25⁰С.

31 Сыворотки получали в два этапа: 1) обезжиривание путем
32 центрифугирования со скоростью 16000 об/мин в течение 5 мин; 2) удаление
33 казеина путем подкисления 20% раствором лимонной кислоты из расчета
34 0,06 мл кислоты на 4 мл с повторным центрифугированием [4].

35 Антимикробную активность определяли методом спектрофотометрии [1].
36 Для этого 300 мкл сыворотки соединяли с 50 мкл суспензии клеток *Candida*
37 *albicans* № 927 (коллекция НИИВС им. Мечникова), выращенной на плотной
38 глюкозо-пептон-дрожжевой среде; контрольная проба вместо сыворотки
39 содержала 300 мкл физраствора. Суспензию клеток готовили из расчета 1
40 микробиологическая петля в 50 мкл физраствора. Пробы инкубировали 2
41 часа при 32⁰С на шейкере, центрифугировали 5 мин со скоростью 16000
42 об/мин, надосадочную жидкость удаляли, а в осадки вносили по 300 мкл
43 раствора бромкрезолового пурпурного в фосфатном буфере рН 4,6. Пробы
44 повторно инкубировали 45 мин при 32⁰С и вновь центрифугировали. Осадки
45 микроскопировали при суммарном увеличении 1750 («ЛЮМО», Россия) и
46 фотографировали цифровой камерой «Sony» (Япония). Из полученных
47 супернатантов отбирали по 50 мкл и соединяли с 2,5 мл фосфатного буфера
48 рН 4,6. Оптическую плотность полученных растворов оценивали на
49 спектрофотометре «Genesys 10SUV-Vis» (США), длина волны 440 нм. Для
50 каждой пробы рассчитывали среднее значение из трех измерений.
51 Активность рассчитывали, как отношение разности между оптической
52 плотностью контрольного и опытного образцов, отнесенной к оптической
53 плотности контрольного образца и выраженной в процентах [2].

54 Низкомолекулярную фракцию, содержащую комплекс АМП, получали из
55 сывороток путем их фильтрации через молекулярные фильтры с размером
56 пор 100 кДа («Amicon Ultra-0,5», Millipore, Merck). Для этого в

57 предварительно замоченные дистиллированной водой в течение 1 часа
58 фильтры вносили по 500 мкл сыворотки и центрифугировали со скоростью
59 16000 об/мин в течение 15 мин. Антимикробную активность полученных
60 фильтратов определяли аналогично образцам сыворотки (см. выше).

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

68 Уровень лактоферрина в образцах сыворотки определяли методом
69 иммуноферментного анализа с помощью тест-системы «ELISA Kit for
70 Lactoferrin (LTF human)» («Cloud-Clone Corp.», США) в соответствии с
71 прилагаемой инструкцией. Тест-система предназначена для определения
72 лактоферрина в различных биожидкостях, включая сыворотку грудного
73 молока. Разведение сывороток составило 1:1.000.000.

74 Уровень sIgA в образцах сыворотки оценивали методом иммуноферментного
75 анализа с помощью тест-системы «IgA секреторный-ИФА-БЕСТ» («Вектор
76 БЕСТ», Новосибирск), предназначенной для определения данного
77 иммуноглобулина в образцах сыворотки крови. Разведение сывороток
78 грудного молока составило 1:10.000.

79 Концентрацию сывороточного альбумина измеряли с помощью набора
80 реагентов «Альбумин Абрис+» (ООО «НПФ» «Абрис», Санкт-Петербург).
81 Метод основан на образовании окрашенных комплексных соединений при
82 взаимодействии альбумина с бромкрезоловым зеленым в слабокислой среде
83 в присутствии детергента. К 10 мкл сыворотки добавляли 2 мл реактива,
84 выдерживали 10 мин при комнатной температуре и измеряли оптическую

85 плотность при длине волны 628 нм. Предварительно с помощью того же
86 набора реагентов оценивали взаимодействие чистого лактальбумина,
87 полученного путем ионообменной хроматографии из грудного молока
88 («Лактбио», Москва), с тем же реактивом. Анализ показал отсутствие
89 реакции между лактальбумином и указанными выше реагентами.

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

93 Статистический анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel.
94 Расчет коэффициентов Манна-Уитни, свидетельствующих о
95 наличии/отсутствии значимости различий между показателями, проводили с
96 помощью автоматической программы [7].

97

98 **Результаты**

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

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

119 Оценка содержания лактоферрина в изучаемых образцах сыворотки
120 показала, что наиболее высокие его концентрации имели место в молозиве,
121 причем отмечено его многократное снижение при переходе к зрелому
122 молоку. Уровень лактоферрина имел высокую положительную корреляцию
123 не только с общей противомикробной активностью (**таблица 1**), но и с
124 активностью АМП фракции сыворотки - коэффициент Пирсона составил
125 0,845. Экспериментальные и расчетные данные, касающиеся продукции и
126 потребления лактоферрина на первые сутки и через 12 месяцев от начала
127 лактации приведены в **таблице 2**.

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

133 Концентрация сывороточного альбумина значительно снижалась по мере
134 увеличения периода лактации и коррелировала с активностью сыворотки
135 (**таблица 1**). Имела место также высокая положительная корреляция с
136 лактоферрином – $r = 0,994$. Расчет максимальной продукции и потребления
137 сывороточного альбумина приведен в **таблице 2**.

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

143 Концентрацию лизоцима в сыворотке грудного молока в данном
144 исследовании не определяли. Для расчетов воспользовались данными [16],
145 где показано, что на всем протяжении периода лактации лизоцим меняется от
146 0.32 мг/мл в молозиве до 0,85 мг/мл спустя год после начала лактации [16].
147 Наибольшие расчетные значения продукции и потребления лизоцима
148 приведены в **таблице 2**.

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

151 Для того чтобы оценить вклад лактоферрина, сывороточного
152 альбумина, лизоцима и IgA в антимикробную активность сыворотки
153 грудного молока в первые сутки и через 12 месяцев после начала лактации,
154 провели определение противомикробной активности чистых препаратов этих
155 полипептидов в концентрациях, соответствующих их содержанию в
156 молозиве и грудном молоке в указанные периоды (**таблица 2**). Полученные
157 данные представлены на **рис. 2**. Сумма активностей этих полипептидов в
158 концентрациях, характерных для односуточного молозива, составляет 91,7%,
159 что сравнимо с общей активностью сыворотки для этого периода. Сумма
160 активностей в концентрациях, типичных для 12 месяцев лактации, равна
161 53,9%, что также сравнимо с общей активностью в указанный период.
162 Микроскопия образцов клеток дрожжей, обработанных этими
163 полипептидами, показала наличие фунгицидного эффекта: клетки
164 разрушались с образованием дебриса.

165

166 **Обсуждение**

167 Фунгистатическое действие грудного молока было ранее установлено
168 методом посевов [8]. Методы спектрофотометрии и микроскопии позволяют
169 оценить фунгицидный эффект любой биожидкости по отношению к клеткам
170 микроорганизмов [1]. Ранее этими методами показано фунгицидное действие
171 сыворотки грудного молока на клетки дрожжей *C. albicans* [5]. В настоящем
172 исследовании получены данные, подтверждающие антимикробную
173 активность цельной сыворотки. Кроме того, изучена антимикробная
174 активность низкомолекулярной фракции сыворотки, содержащей АМП.
175 Оказалось, что как общая активность сыворотки, так и активность её
176 низкомолекулярной фракции обратно пропорциональны длительности
177 периода лактации, но не связаны с возрастом матери.

178 Одним из основных белков сыворотки грудного молока является
179 лактоферрин, который составляет до 20% от общего белка сыворотки [14].
180 Он устойчив к протеолизу и выполняет ряд функций: участвует в процессах
181 эндоцитоза; внутри клеток действует как регулятор экспрессии многих генов,
182 в том числе отвечающих за синтез цитокинов; способствует поглощению
183 железа клетками; является эффективным модулятором воспалительного и
184 иммунного ответа. На клетки микроорганизмов он действует двояко – с
185 одной стороны, обедняет среду, связывая ионы железа, с другой – нарушает
186 целостность мембран. Известно, что лактоферрин оказывает
187 фунгистатическое действие на клетки *C. albicans*, подтвержденное методом
188 посевов [21]. Полученные нами результаты по снижению его концентрации
189 при переходе от молозива к зрелому молоку согласуются с данными других
190 авторов [14]. Необходимо отметить, что снижение содержания лактоферрина
191 (**таблица 1**) и его доли в общей антимикробной активности сыворотки (**рис.**
192 **2**) в процессе лактации не критично, поскольку за счет увеличения объема
193 продуцируемого молока общее потребление этого полипептида за 12 месяцев
194 кормления возрастает почти вдвое (**таблица 2**).

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

202 Лактопероксидаза не вносит существенного вклада в общую
203 антимикробную активность грудного молока, поскольку содержание этого
204 полипептида варьирует в пределах 0.77 ± 0.38 мг/л [20], а в данном
205 исследовании установлено, что фунгицидную активность этот полипептид
206 проявлял в концентрации выше 1 мг/мл.

207 Считают, что сывороточный альбумин синтезируется не молочной
208 железой, а проникает в грудное молоко из сосудов [14]. Содержание
209 сывороточного альбумина, оцененное нами с помощью вышеуказанного
210 реагента, превысило данные, полученные другими исследователями – менее
211 1 мг/мл [17], что, вероятно, связано с использованием ими метода
212 препаративного электрофореза. Ранее нами установлено, что сывороточный
213 альбумин в широком диапазоне концентраций проявлял антимикробную
214 активность [3]. Изменение содержания этого полипептида в процессе
215 лактации не настолько значимо, как в случае с лактоферрином (**таблица 1**),
216 но его вклад в общую активность (**рис. 2**) и суточное потребление (**таблица**
217 **2**) значительно повышаются через год после начала лактации.

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

222 Полученные нами данные по изменению концентрации секреторного
223 иммуноглобулина класса А на протяжении периода лактации согласуются с
224 результатами других авторов [14]. В научной литературе есть данные о
225 фунгистатической активности IgA по отношению к дрожжам *C. albicans*,
226 оцененной методом посевов [11]. На моноклональных антителах класса А
227 показано наличие фунгицидной активности против тех же дрожжей,
228 установленной тем же методом [13]. Однако в современных учебных
229 пособиях и научных публикациях указано, что антитела непосредственным
230 микробицидным действием не обладают. В настоящем исследовании опыты
231 по фунгицидной активности чистого препарата иммуноглобулина проводили
232 не на sIgA, а на IgA. На основании полученных данных можно подтвердить,
233 что иммуноглобулин класса А оказывает прямое микробицидное действие на
234 клетки *C. albicans*, которое проявляется в разрушении клеточных стенок и
235 мембран этих дрожжей, наблюдаемом через 2 часа от начала эксперимента.

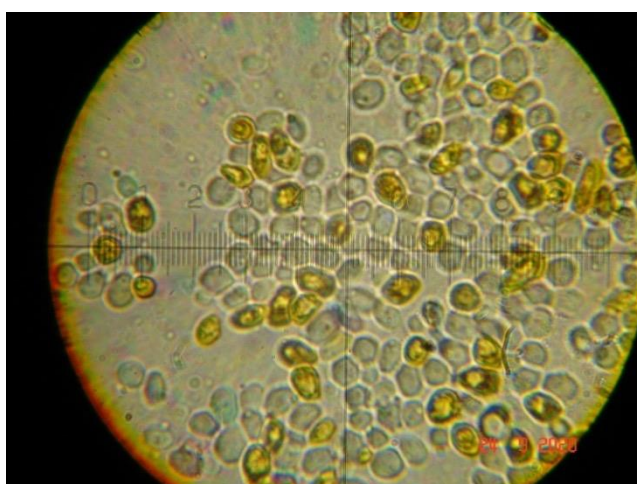
236 Очевидно, что наиболее значимыми по антимикробной активности в
237 сыворотке молозива являются IgA и лактоферрин, тогда как спустя 12
238 месяцев после начала лактации на первый план выходят IgA и сывороточный
239 альбумин. Известно, что совместное действие АМП может носить
240 синергичный характер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

244 **Благодарности.** Авторы благодарят сотрудников лаборатории физиологии
245 грибов и бактерий Артемьеву Тамару Алексеевну и Бутовченко Любовь
246 Михайловну за техническую и моральную поддержку.

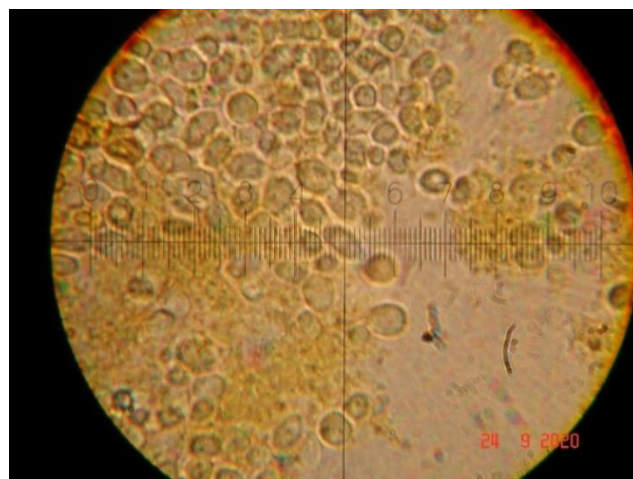
РИСУНКИ

Рис. 1. Микроскопия клеток *C. albicans* (увеличение микроскопа x1750): А – контроль – 2 ч инкубации с физраствором; Б – 2 часа инкубации с сывороткой грудного молока; В – 2 часа инкубации с фракцией сыворотки ниже 100 кДа. Желтые клетки – мертвые, белые – живые.

Fig. 1. Microscopy of *C. albicans* cells (microscope magnification x1750): A - control - 2 h incubation with saline; B - 2 h incubation with breast milk serum; B - 2 h incubation with a serum fraction below 100 kDa. Dead and live cells are highlighted in yellow and white, respectively.



А



Б



В

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

Fig. 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.

Активность ЛЦ, %

Lysozyme activity, %

Активность СА, %

Serum albumin activity, %

Активность ЛФ, %

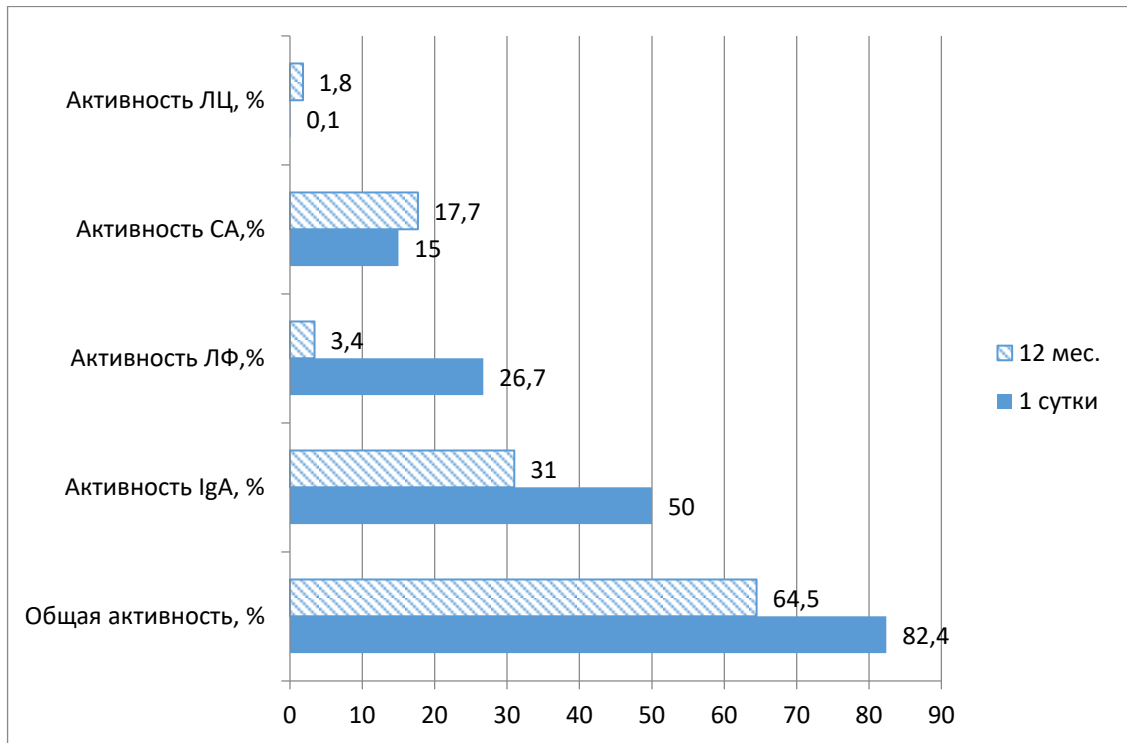
Lactoferrin activity, %

sIgA activity, %

Total serum activity, %

12 months,

1st day



ТАБЛИЦЫ

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 кДа, % (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)	sIgA, мг/мл (медиана) sIgA, 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	5	31,5	73,2	31,2	1,49	4,77	1,00

	3–7.5 months							
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	-0,950	-0,668	-0,643	-0,527
r_2		-0,944	-0,431	-	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	-	$p \leq 0,01$	$p > 0,05$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$

groups 1 and 5								
-------------------	--	--	--	--	--	--	--	--

r_1 - коэффициент корреляции Пирсона, характеризующий наличие взаимосвязи данного показателя с периодом лактации;
 r_2 - коэффициент корреляции Пирсона, характеризующий наличие взаимосвязи данного показателя с общей активностью сыворотки;

r_3 - коэффициент корреляции Пирсона, характеризующий наличие взаимосвязи данного показателя с возрастом матери.

r_1 - Pearson's correlation coefficient, characterizing interrelation between this parameter with the lactation period;

r_2 - Pearson correlation coefficient, characterizing interrelation between this parameter with the total activity of serum;

r_3 - Pearson's correlation coefficient, characterizing interrelation between this parameter with the age of the mother.

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.

Table 2. Experimental and calculated data on production and consumption of lactoferrin, lysozyme, serum albumin and sIgA on the first day and 12 months after the onset of lactation.

	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 иммуноглобулин класса А Secretory immunoglobulin A	
			Макс. конц-я, мг/мл Max. concentration, mg / ml	Макс. потребление, мг/кг×сут Max. consumption mg / kg × day	Макс. конц-я, мг/мл** Max. concentration mg / ml**	Макс. потребление, мг/кг×сут Max. consumption mg / kg × day	Макс. конц-я, мг/мл Max. concentration, mg / ml	Макс. потребление, мг/кг×сут Max. consumption mg / kg × day	Макс. конц-я, мг/мл Max. concentration, mg / ml	Макс. потребление, мг/кг×сут Max. consumption mg / kg × day
Молозиво (1 ^е сут.) Colostrum	10	3	10,8	36	0,32	1,1	8,8	29	6,8	22,7

(1st day)										
Зрелое молоко (12 мес.) Mature milk (12 months)	650	10	1,0	65	0,85	55,3	4,7	305	2,0	130,0
Кратность увеличения за 12 мес. Multiplicity of increase in 12 months			-	1,8	-	50,3	-	10,5	-	5,7

** - приведены данные из литературных источников

** - data from literary sources

МЕТАДААННЫЕ

1. Арзуманян Вера Георгиевна (Arzumanian V.G.), д.б.н., профессор, зав. лаб. физиологии грибов и бактерий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», Москва, 8-495-917-09-03; veraar@mail.ru
2. Колыганова Татьяна Игоревна (Kolyganova T.I.) – ответственный автор, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет); младший научный сотрудник лаборатории физиологии грибов и бактерий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», Москва;
Assistant at The Department of Microbiology, Virology and Immunology, First Moscow State Medical University I.M. Sechenov, (Sechenov University), Moscow; research assistant at The Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera»,
8 917-540-0966; kolyganova_t_i@staff.sechenov.ru
3. Свитич Оксана Анатольевна (Svitich O.A.), д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», Москва, 8-495-917-49-00; svitichoa@yandex.ru
4. Самойликов Павел Владимирович (Samoylikov P.V.), к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории алергодиагностики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», Москва, 8 926-707-41-52, samoilikov@mail.ru
5. Конаныхина Светлана Юрьевна (Konanykhina S.Y.), к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологических методов исследования ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», Москва,

+7 495- 916-03-20, sdieta@yandex.ru

6. Зайцева Татьяна Александровна (Zaytseva T.A.), к.м.н, старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет);

8 903-578-87-52, zat25@yandex.ru

7. Зверев Виталий Васильевич (Zverev V.V.) д.б.н, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет); Научный руководитель Института ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», Москва,

+7 495- 917-49-00; vitalyzverev@outlook.com

Адрес для переписки:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Адрес: Россия 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а

Телефон +7 (495) 917-49-00

Адрес электронной почты: mec.h.inst@mail.ru

Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera»

Address: Russia 105064, Moscow, Maly Kazenny lane, 5a

Phone +7 (495) 917-49-00, e-mail: mec.h.inst@mail.ru

Оригинальная статья

Название: ВКЛАД ЛАКТОФЕРРИНА, СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И
СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА КЛАССА А В
АКТИМИКРОБНУЮ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ ГРУДНОГО МОЛОКА

Дата отправления работы: 29.06.2021

Количество страниц текста: 9

Количество таблиц: 2

Количество рисунков: 2

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ

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

В. Г. Арзуманян¹, Т. И. Колыганова^{1,2}, О.А. Свитич^{1,2}, П.В. Самойликов¹,

С.Ю. Конаныхина¹, Зайцева Т. А.², В. В. Зверев^{1,2}

¹ФГБНУ НИИ Вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, 105064; директор, чл.-корр. РАН Свитич О.А.

²Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии ГАОУВ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет), Москва; зав. кафедрой – академик РАН Зверев В. В.

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

CONTRIBUTION OF LACTOFERRIN, SERUM ALBUMIN AND SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A IN ACTIMICROBIAL ACTIVITY OF BREAST MILK WHEY

Arzumanian V.G.^a, Kolyganova T. I.^{a,b}, Svitich O. A.^{a,b}, Samoilikov 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; Director, Corresponding member of Russian Academy of Sciences, Oxana A. Svitich

^bDepartment of Microbiology, Virology and Immunology, First Moscow State Medical University I.M. Sechenov, (Sechenov University), Moscow; head of the Department - Academician of Russian Academy of Sciences Zverev V.V.

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

Адрес для переписки: kolyganova_t_i@staff.sechenov.ru , 8917-540-0966

Сокращенное название статьи: Вклад ЛФ, СА, sIgA в АМС ГМ

Contribution of LF, SA, sIgA in AMS BM

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или doi
1	<p>Патент № 2602298 С2 Российская Федерация, МПК G01N 33/48. Способ определения совокупной активности антимикробных пептидов как маркера состояния местного иммунитета различных эпителиальных тканей: № 2015113069/15 : заявл. 10.04.2015: опубл. 20.11.2016 / В. Г. Арзуманян, Е. Т. Мальбахова, Е. П. Фошина [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова" (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова).</p>	<p><i>Arzumanjan V. G., Malbakhova E. T., Foshina E. P., Artemeva T. A., Butovchenko L. M., Vartanova N. O., Shmeleva O. A. Method for determining antimicrobial peptide total activity as a marker of tissue immunity state of various epithelial tissues, patent № 2602298 21.10.2016</i></p>	<p>https://www.elibrary.ru/item.asp?id=37842599</p>
2	<p>Arzumanyan, V. G. Modified method for evaluation of plasma membrane integrity in eukaryotic cell / V. G. Arzumanyan, I. M. Ozhovan // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2002. – Vol. 134. – No 1. – P. 103-105. – DOI 10.1023/A:1020641629319.</p>	<p>Arzumanyan, V. G. Modified method for evaluation of plasma membrane integrity in eukaryotic cell / V. G. Arzumanyan, I. M. Ozhovan // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2002. – Vol. 134. – No 1. – P. 103-105.</p>	<p>DOI 10.1023/A:1020641629319</p>
3	<p>Arzumanyan, V. G. Antimicrobial Effect of Albumin on Bacteria and Yeast Cells / V. G. Arzumanyan, I. M. Ozhovan, O. A. Svitich // Bulletin of Experimental Biology</p>	<p>Arzumanyan, V. G. Antimicrobial Effect of Albumin on Bacteria and Yeast Cells / V. G. Arzumanyan, I. M.</p>	<p>DOI 10.1007/s10517-019-04618-6.</p>

	and Medicine. – 2019. – Vol. 167. – No 6. – P. 763-766. – DOI 10.1007/s10517-019-04618-6.	Ozhovan, O. A. Svitich // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2019. – Vol. 167. – No 6. – P. 763-766.	
4	Богатова О. В., Догаева Н. Г. Определение качества молока: Методические указания к лабораторному практикуму/ Оренбург: ОГУ, 2002, 39 с	Bogatova O.V., Dogaeva N.G. Determination of milk quality: Methodological instructions for laboratory practice / Orenburg: OSU, 2002, 39 p.	http://elib.osu.ru/handle/123456789/2243?mode=full
5	Kolyganova T.I., Arzumanyan V.G., Bogdanova E.A., Zverev V.V. Alternative methods in estimation of antimicrobial activity of breast milk serum // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2021. – 2021. – Vol. 171. – No 4. – P. 525-528. – DOI 10.47056/0365-9615-2021-171-4-525-528	Kolyganova T.I., Arzumanyan V.G., Bogdanova E.A., Zverev V.V. Alternative methods in estimation of antimicrobial activity of breast milk serum // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2021. – 2021. – Vol. 171. – No 4. – P. 525-528. –	DOI 10.47056/0365-9615-2021-171-4-525-528
6	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. - 2021. – Vol. 19. – No 2. – P. 33-40. – DOI 10.20953/1727-5784-2021-2-33-40.	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. - 2021. – Vol. 19. – No 2. – P. 33-40.	DOI 10.20953/1727-5784-2021-2-33-40.
7	Mathematical methods of data processing (online calculation) https://www.psychol-ok.ru/lib/statistics.html	Mathematical methods of data processing (online calculation)	https://www.psychol-ok.ru/lib/statistics.html

8	Andersson Y, Lindquist S, Lagerqvist C, Hernell O. Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk. <i>Early Hum Dev.</i> 2000, Aug;59(2):95-105. doi: 10.1016/s0378-3782(00)00086-4	Andersson Y, Lindquist S, Lagerqvist C, Hernell O. Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk. <i>Early Hum Dev.</i> 2000, Aug;59(2):95-105.	doi: 10.1016/s0378-3782(00)00086-4.
9	Brandtzaeg P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. <i>J Pediatr.</i> 2010 Feb;156(2 Suppl): S8-15. doi: 10.1016/j.jpeds.2009,11.014.	Brandtzaeg P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. <i>J Pediatr.</i> 2010 Feb;156(2 Suppl): S8-15.	doi: 10.1016/j.jpeds.2009,11.014.
10	Daristan Jamal, Akhter Ahmed, Abdulilah Ismaeil. Inhibitory Effect of Breast Milk Against Pediatric Bacterial Infection. <i>Journal of pure and applied science salahaddin university.</i> 2011, V 23, P.51	Daristan Jamal, Akhter Ahmed, Abdulilah Ismaeil. Inhibitory Effect of Breast Milk Against Pediatric Bacterial Infection. <i>Journal of pure and applied science salahaddin university.</i> 2011, V 23, P.51	https://www.researchgate.net/publication/266910129_Inhibitory_Effect_of_Breast_Milk_Against_Pediatric_Bacterial_Infection
11	Funakoshi S, Doi T, Nakajima T, Suyama T, Tokuda M. Antimicrobial effect of human serum IgA. <i>Microbiol Immunol.</i> 1982, 26(3):227-39. doi: 10.1111/j.1348-0421. 1982.tb00174. x.	Funakoshi S, Doi T, Nakajima T, Suyama T, Tokuda M. Antimicrobial effect of human serum IgA. <i>Microbiol Immunol.</i> 1982, 26(3):227-39.	doi: 10.1111/j.1348-0421.1982.tb00174. x.
12	Garcia-Rodenas CL, De Castro CA, Jenni R, Thakkar SK, Beauport L, Tolsa JF, Fischer-Fumeaux CJ, Affolter M. Temporal changes of major protein concentrations in preterm and term human milk. A prospective cohort study. <i>Clin Nutr.</i> 2019, Aug;38(4):1844-1852. doi: 10.1016/j.clnu.2018.07.016.	Garcia-Rodenas CL, De Castro CA, Jenni R, Thakkar SK, Beauport L, Tolsa JF, Fischer-Fumeaux CJ, Affolter M. Temporal changes of major protein concentrations in preterm and term human milk. A	doi: 10.1016/j.clnu.2018.07.016.

		prospective cohort study. Clin Nutr. 2019, Aug;38(4):1844-1852.	
13	Kavishwar, A., & Shukla, P. K. Candidacidal activity of a monoclonal antibody that binds with glycosyl moieties of proteins of <i>Candida albicans</i> . Medical Mycology, 2006, 44(2), 159–167. doi:10.1080/13693780500266038	Kavishwar, A., & Shukla, P. K. Candidacidal activity of a monoclonal antibody that binds with glycosyl moieties of proteins of <i>Candida albicans</i> . Medical Mycology, 2006, 44(2), 159–167.	doi:10.1080/13693780500266038
14	Lönnerdal B, Erdmann P, Thakkar SK, Sauser J, Destailats F. Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a developmental perspective. J Nutr Biochem. 2017, Mar; 41:1-11. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.06.001	Lönnerdal B, Erdmann P, Thakkar SK, Sauser J, Destailats F. Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a developmental perspective. J Nutr Biochem. 2017, Mar; 41:1-11.	doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.06.001
15	Lönnerdal B, Lien EL. Nutritional, and physiologic significance of alpha-lactalbumin in infants. Nutr Rev. 2003, Sep;61(9):295-305. doi: 10.1301/nr.2003.sept.295-305.	Lönnerdal B, Lien EL. Nutritional and physiologic significance of alpha-lactalbumin in infants. Nutr Rev. 2003, Sep;61(9):295-305.	doi: 10.1301/nr.2003.sept.295-305.
16	Montagne P, Cuillière ML, Molé C, Béné MC, Faure G. Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation. Adv Exp Med Biol. 2001, 501:241-7. doi: 10.1007/978-1-4615-1371-1_30.	Montagne P, Cuillière ML, Molé C, Béné MC, Faure G. Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation. Adv Exp Med Biol. 2001,	doi: 10.1007/978-1-4615-1371-1_30.

		501:241-7.	
17	Nagasawa T, Kiyosawa I, Fukuwatari Y, Kitayama T, Uechi M. Alpha-lactalbumin and serum albumin in human milk. <i>J Dairy Sci.</i> 1973, Feb;56(2):177-80. doi: 10.3168/jds. s0022-0302(73)85142-2.	Nagasawa T, Kiyosawa I, Fukuwatari Y, Kitayama T, Uechi M. Alpha-lactalbumin and serum albumin in human milk. <i>J Dairy Sci.</i> 1973, Feb;56(2):177-80.	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. <i>Drug Discov Ther.</i> 2019,13(1):28-33. doi: 10.5582/ddt.2019.01010.	Nakano M, Suzuki M, Wakabayashi H, Hayama K, Yamauchi K, Abe F, Abe S. Synergistic anti-candida activities of lactoferrin and the lactoperoxidase system. <i>Drug Discov Ther.</i> 2019,13(1):28-33	doi:10.5582/ddt.2019.01010.
19	Rai D, Adelman AS, Zhuang W, Rai GP, Boettcher J, Lönnerdal B. Longitudinal changes in lactoferrin concentrations in human milk: a global systematic review. <i>Crit Rev Food Sci Nutr.</i> 2014, 54(12):1539-47. doi: 10.1080/10408398.2011.642422.	Rai D, Adelman AS, Zhuang W, Rai GP, Boettcher J, Lönnerdal B. Longitudinal changes in lactoferrin concentrations in human milk: a global systematic review. <i>Crit Rev Food Sci Nutr.</i> 2014, 54(12):1539-47.	doi:10.1080/10408398.2011.642422.
20	Shin K, Hayasawa H, Lönnerdal B. Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immunoadsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase. <i>Am J Clin Nutr.</i> 2001, May;73(5):984-9. doi: 10.1093/ajcn/73.5.984.	Shin K, Hayasawa H, Lönnerdal B. Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immunoadsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase. <i>Am J Clin Nutr.</i> 2001, May;73(5):984-9.	doi:10.1093/ajcn/73.5.984.
21	Samaranayake YH, Samaranayake LP, Wu PC, So M. The antifungal	Samaranayake YH, Samaranayake LP, Wu	PMID: 9393559

	effect of lactoferrin and lysozyme on <i>Candida krusei</i> and <i>Candida albicans</i> . <i>APMIS</i> . 1997, Nov;105(11): p. 875–83.	PC, So M. The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on <i>Candida krusei</i> and <i>Candida albicans</i> . <i>APMIS</i> . 1997, Nov;105(11): p. 875–83.	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9393559/
--	--	---	---