

На правах рукописи



Колыганова Татьяна Игоревна

Антимикробная активность и микробиом грудного молока на разных сроках лактации

1.5.11. Микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Арзуманян Вера Георгиевна

Официальные оппоненты:

Лазарева Анна Валерьевна - доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория микробиологии, заведующая лабораторией

Царёв Виктор Николаевич - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-исследовательский медико-стоматологический институт, директор; кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии, заведующий кафедрой

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «16» января 2024 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.25 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



Калужин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Грудное молоко является многокомпонентной биологической жидкостью, обеспечивающей не только питание развивающегося младенца, но и выполняющее функцию антимикробной защиты. Эта биожидкость содержит ряд компонентов клеточного иммунитета, таких как лейкоциты и эпителиоциты, а также целый спектр гуморальных факторов иммунитета: антимикробные пептиды (АМП), иммуноглобулины, цитокины и отдельные белки системы комплемента (Duncan M. E. et al., 1983; Michie C.A. et al., 1998; Wada Y., Lönnerdal B., 2014). АМП представляют собой полипептиды или олигопептиды, с различным числом аминокислот ((Li Y. et al., 2012). В настоящее время в базе данных АМП зарегистрировано 8652 пептидов животного происхождения, в том числе около 140 из них присутствуют в организме человека (Gawde U. et al., 2023). Эти молекулы обладают широким спектром антимикробной активности в отношении бактерий, грибов, простейших и вирусов, а также синергической активностью с традиционными противомикробными химиотерапевтическими препаратами (Wada, Y., Lönnerdal, B., 2014; Rodrigues G. et al., 2022). Имеются данные по влиянию возраста матери и ребенка, способа родоразрешения, общего анамнеза, курения, особенностей питания и других факторов на содержание АМП в грудном молоке (Villavicencio A. et al., 2014; Самсонова А.И., 2017; Zimmermann P., Curtis N., 2020; Ahuja JKC et al., 2022). Превалирующими АМП грудного молока являются лактоферрин и лизоцим. Значительное количество исследований посвящено изучению свойств лактоферрина и перспектив его практического применения (Pan Y. et al., 2007; Sharma D. et al., 2017). Лактоферрин проявляет не только антимикробную активность в отношении бактерий, паразитов и грибов путем образования пор в клеточных мембранах (Valenti P., Antonini G., 2005), но и противовирусную, антиоксидантную и противовоспалительную активность, а также противоопухолевую активность путем прямого воздействия на трансформированные клетки (Takayama Y., Aoki R., 2012). Лизоцим (мурамидаза) действует на грамположительные, грамотрицательные бактерии и грибы путем разрушения гликозидных связей полисахаридов клеточной стенки и повреждения цитоплазматической мембраны (Ibrahim H. et al., 2001). Прочие АМП – дефензины, кателицидин, гепцидин, дермцидин, лактопероксидаза, лактадгерин, гаптокоррин - обнаруживаются в грудном молоке в нанограммовых концентрациях, однако, вполне возможно, что действуя совокупно, они вносят свой вклад в общую антимикробную активность, тем более что механизмы их действия на микробные клетки при всем их разнообразии, сводятся к повреждению клеточных мембран (Li Y. et al., 2012). Важным гуморальным компонентом грудного молока является секреторный иммуноглобулин класса А (sIgA), основное действие которого проявляется в нейтрализации патогенов путем

специфического связывания с микробными эпитопами. Показано, что поликлональный sIgA проявлял прямое амёбоцидное действие в опытах *in vitro* (León-Sicairos N. et al., 2006), а специфический моноклональный IgA – фунгицидную активность по отношению к культуре клеток *C. albicans* (Kavishwar A., Shukla P. K., 2006). Механизм микробоцидного действия этих IgA на микроорганизмы до сих пор не изучен. В грудном молоке присутствует сывороточный альбумин, который не относят к факторам антимикробной защиты, но для которого, однако, установлен непосредственный цитотоксический эффект в отношении бактерий и дрожжей (Арзуманян В.Г. с соавт., 2019).

Именно на свойстве АМП нарушать целостность мембран основан ранее разработанный спектрофотометрический метод определения совокупной активности АМП в сыворотке крови и некоторых других биожидкостях (Арзуманян В.Г. с соавт., 2016, 2019). До сих пор противомикробную активность грудного молока определяли традиционными методами посевов и микроскопии (Trend S. et al., 2015). Применение метода спектрофотометрии позволит не только количественно оценить антимикробную активность, но и подойти к объяснению механизма действия отдельных компонентов сыворотки молока, поскольку он основан на измерении количества красящего вещества, проникающего через поры цитоплазматической мембраны с нарушенной целостностью. Метод также применим не только к нативной сыворотке, но и к отдельным её фракциям, содержащим антимикробные вещества с разной молекулярной массой, а также к очищенным препаратам АМП. Такой методический подход позволит впервые исследовать взаимосвязь между периодом лактации и антимикробной активностью нативной сыворотки грудного молока, а также активностью её фракций и отдельных антимикробных компонентов. Нормобиота грудного молока здоровых матерей описана сравнительно недавно (Martin R. et al., 2003). С тех пор в молоке выявлено свыше тысячи видов бактерий, грибов и вирусов с помощью традиционных микробиологических, молекулярно-генетических методов и метода MALDI-TOF спектрометрии (Consales A. et al., 2022). Основу микробиома грудного молока составляют роды *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* и *Propionibacterium* (Ojo-Okunola A. et al., 2018). До сих пор различные исследования касались лишь отдельных антимикробных факторов или нормального микробиоценоза грудного молока, тогда как комплексное изучение условно-патогенной микробиоты грудного молока на разных сроках лактации во взаимосвязи со способностью данного субстрата противостоять микробным агентам, представляет особый интерес, поскольку является важной характеристикой этой биологической жидкости. Помимо женского грудного молока источником питания младенца может служить молоко сельскохозяйственных животных, о питательной ценности которого в научной литературе имеется достаточно данных (Park Y. W., 2009). Есть также данные о содержании

лактоферрина, лизоцима и sIgA в молоке разных млекопитающих (Barbour E.K. et al., 1984; Montagne P. et al., 2001; Park Y. W., 2009; Claeys W. L. et al., 2014; Tafes A. G. et al., 2020), тогда как вопрос о защитных свойствах молока различных животных до сих пор остается открытым. Соотнесение общей антимикробной активности сыворотки грудного молока с содержанием его основных антимикробных полипептидов, разнообразием и обилием различных видов условно-патогенных микроорганизмов дает представление об иммунологической состоятельности этого уникального питательного субстрата на разных сроках лактации.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день опубликовано достаточное количество исследований грудного молока с точки зрения проявления его антимикробных свойств (Ramsey KH et al., 1998; Ibhanebhor S.E., Ootobo E.S., 1996, Lepage P., Van de Perre P., 2012, Wang X.F. et al., 2014, Musaev A. et al., 2021). Объектом исследования является как цельное грудное молоко, так и отдельные противомикробные компоненты молока, которые могут быть использованы для дальнейшего применения в профилактике и лечении инфекционных заболеваний (Daristan, J. et al., 2011, Baricelli J. et al., 2014, Meikle V. et al., 2019, Lu J. et al., 2021). Противомикробную активность как молока, так и отдельных его компонентов, оценивают традиционными методами посева и микроскопии (Andersson Y. et al., 2000, Trend S. et al., 2015). Немаловажную роль в иммунной защите младенца играет и микробиом молока, а именно его качественный и количественный состав (Ojo-Okunola A. et al., 2018, Togo A. et al., 2019, Khodayar-Pardo P. et al., 2014). Однако имеющиеся в научной литературе данные носят разрозненный характер и сосредоточены на изучении либо противомикробных свойств молока, либо микробного разнообразия. Адаптация спектрофотометрического метода определения антимикробной активности (Арзуманян В.Г. с соавт., 2015) по отношению к грудному молоку позволила установить наличие взаимосвязи между периодом лактации, антимикробной активностью сыворотки и обсемененностью грудного молока условно-патогенными микроорганизмами. Данный метод, в отличие от ранее использовавшихся, позволяет в течение нескольких часов получить количественные данные по гуморальной противомикробной защите молока человека и животных. До проведения настоящего исследования подобных систематических работ не проводилось.

Цель исследования

Изучение взаимосвязи между антимикробной активностью сыворотки грудного молока человека и микробиологическими/ иммунологическими показателями молока на разных сроках лактации.

Задачи исследования

1. Адаптация спектрофотометрического метода определения противомикробной активности по отношению к сыворотке грудного молока и его фракциям.
2. Оценка взаимосвязи антимикробной активности сыворотки и её фракции, содержащей АМП (ниже 100 кДа) с периодом лактации и концентрацией некоторых антимикробных полипептидов.
3. Определение действия очищенных препаратов основных АМП грудного молока на клетки *C. albicans*, *S. aureus* и *E. coli*.
4. Исследование микробиома грудного молока и оценка взаимосвязи между наличием основных групп условно-патогенных микроорганизмов, антимикробной активностью и периодом лактации.
5. Оценка влияния физических факторов - пастеризации, замораживания/хранения, лиофилизации и диализа - на антимикробную активность сыворотки молока.
6. Изучение антимикробной активности сыворотки молока различных млекопитающих.

Научная новизна

Обнаружена обратная взаимосвязь между периодом лактации и антимикробной активностью цельной сыворотки грудного молока, концентрацией лактоферрина, секреторного иммуноглобулина класса А и сывороточного альбумина.

Установлено, что снижение общей обсемененности грудного молока условно-патогенными бактериями по мере увеличения срока лактации наступает раньше снижения антимикробной активности сыворотки. Впервые установлено антимикробное действие очищенного препарата лактопероксидазы на клетки микроорганизмов *per se*, т.е. вне связи с лактопероксидазной системой. Впервые показан фунгицидный эффект очищенного препарата IgA против *C. albicans*, обусловленный разрушением мембран и клеточных стенок. Показано, что пептиды с молекулярной массой ниже 3 кДа, содержащиеся во фракции сыворотки грудного молока, не являются продуктом метаболизма организма человека. Сопоставление антимикробной активности сыворотки молока шести млекопитающих разных видов выявило, что наибольшим уровнем противомикробной защиты обладают мыши.

Теоретическая и практическая значимость работы

Адаптированный к сыворотке грудного молока и его фракций спектрофотометрический метод позволяет в течение нескольких часов определить антимикробную активность по отношению к бактериям и микромицетам. Установлено, что через 12 месяцев ввиду увеличения

объема потребляемого молока младенец получает не меньше антимикробных компонентов, чем при кормлении молозивом, а в несколько раз больше. Пастеризация и замораживание сроком до 3 месяцев могут быть рекомендованы в качестве методов обработки молока, позволяющих сохранить его антимикробную активность. Наиболее часто встречающимися микроорганизмами грудного молока являются стафилококки - *S. epidermidis* и *S. aureus*, и стрептококки - *S. mitis* и *S. oralis*. Общая обсемененность имеет высокую обратную корреляцию с периодом лактации и высокую прямую корреляцию с антимикробной активностью сыворотки. Снижение общей обсемененности грудного молока условно-патогенными бактериями по мере увеличения срока лактации первично по отношению к снижению антимикробной активности сыворотки. В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск) депонирован полученный автором штамм *Paenibacillus amylolyticus* 22069 – кандидатный штамм-продуцент антимикробных и биологически активных веществ.

Методология и методы исследования

Определение антимикробной активности цельной сыворотки молока, его фракций и очищенных полипептидных препаратов проводили спектрофотометрическим методом, который основан на измерении количества красящего вещества, проникающего в клетки через поры цитоплазматической мембраны с нарушенной целостностью. Микробиологический анализ образцов молока на наличие условно-патогенных микроорганизмов проводили как традиционными бактериологическими методами, так и с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ Microsoft Office Excel. Идентификацию пептидов низкомолекулярной фракции сыворотки грудного молока осуществляли методами MALDI-TOF масс-спектрометрии и ВЭЖХ. Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерного приложения SearchGUI v.3.3.21 по геномной базе данных человека UniProtKB с использованием поискового алгоритма X!Tandem. Дополнительно для идентификации последовательности пептидов, не соответствующих базе данных человека UniProtKB, был применен подход DeNovo секвенирования с помощью компьютерного приложения PEAKS.

Личный вклад

Колыганова Т.И. сразу при поступлении в лабораторию начала подготовку к проведению научных экспериментов: наладила связь с клиниками, активно собирала и самостоятельно обрабатывала биологический материал. Одновременно с процессом сбора материала она написала и опубликовала обзорную статью по антимикробным пептидам грудного молока.

Приступив к экспериментальной работе, автор освоила ряд современных методик, лично провела все опыты, послужившие основой будущей диссертационной работы. Автору принадлежит ведущая роль в обобщении данных литературы, формулировании темы диссертации, сборе биоматериалов, проведении экспериментов, обработке полученных результатов и написании публикаций и самой диссертации.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Института общественного здравоохранения имени академика А.А. Воробьева Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины «Микробиология» акт № 116 от 04.07.2022. Полученные результаты внедрены в лечебный процесс Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Оренбургский клинический перинатальный центр».

Положения, выносимые на защиту

1. Для оценки антимикробных свойств сыворотки грудного молока и её фракций применим метод спектрофотометрии, показавший преимущества по сравнению с традиционными методами посевов и микроскопии.

2. С увеличением периода лактации снижаются: антимикробная активностью цельной сыворотки и её фракции с молекулярной массой ниже 100 кДа, концентрации лактоферрина, секреторного иммуноглобулина класса А и сывороточного альбумина.

3. Обсемененность условно-патогенными микроорганизмами (общая и преобладающими видами) грудного молока снижается на протяжении периода лактации и коррелирует с антимикробной активностью сыворотки.

4. На антимикробную активность молока оказывают влияние как физические (пастеризация, лиофилизация, замораживание/хранение, диализ), так и биологические факторы (вид млекопитающего).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные результаты и положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 1.5.11. Микробиология. Соответствие диссертации паспорту научной специальности 1.5.11. Микробиология (медицинские науки), определяется областью

исследований, а именно: выделение, культивирование, идентификация и изучение свойств микроорганизмов; работа с микробиологическим оборудованием; изучение симбиотических микробных сообществ, в том числе микробиоты человека.

Степень достоверности и апробация результатов

Научные положения и выводы базируются на достаточном объеме экспериментальных результатов, полученных методами микроскопии, спектрофотометрии, MALDI-TOF масс-спектрометрии, иммуноферментного анализа, и подвергнутых статистической обработке. Использованное в работе научное оборудование сертифицировано. Диссертация апробирована на заседании отдела микробиологии Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» Министерства образования науки протокол № 7 от «7» июля 2022 г. Материалы диссертации доложены на конференциях молодых ученых ГУ НИИВС им. И.И. Мечникова, г. Москва, Россия (2021, 2022, 2023 гг.); на конференции «Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий», г. Кемерово, Россия (2020 г.), на Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2021», «Ломоносов2022», МГУ, г. Москва, Россия (2021-2022 гг.); на Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии Кашкинские чтения, г. Санкт-Петербург (2021-2022 гг.); на Международной научно-практической конференции «Современные технологии диагностики, лечения, профилактики инфекционных и паразитарных болезней», г. Бухара, Узбекистан (2022 г.); на International Conference and Exhibition on The Future of Pharmaceuticals and Novel Drug Delivery Systems , Paris, France (2022 г.).

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 15 работ, в том числе 6 научных статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer), 9 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 1 зарубежной конференции).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 132 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, экспериментальной части, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы из 248 источников (230 из которых – зарубежные). Диссертация иллюстрирована 15 рисунками и включает 10 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Образцы грудного молока человека получены от 100 здоровых кормящих матерей на разных сроках лактации. **Молоко млекопитающих** – коров, коз, лошадей, верблюдов и мышей - получено от здоровых самок. Свежие образцы молока замораживали через 1,5 часа после получения и хранили при -25°C не более 1 месяца до момента получения сывороток. **Сыворотки молока получали** ранее описанным методом (Богатова О. В., Догаева Н.Г., 2002).

В работе использованы штаммы: *Candida albicans* № 927 (коллекция НИИВС им. Мечникова), а также *Staphylococcus aureus* Wood 46 и *Escherichia coli* M 17.

Применялись очищенные препараты лактоферрина, лактальбумина и лактопероксидазы, полученные из грудного молока методом ионообменной хроматографии («Лактбио», Москва); а также коммерческие препараты человеческого сывороточного альбумина (квалификация High Purity, «EMD Millipore Corp.», США), человеческого IgA («Имтек», Россия) и яичного лизоцима (BioChemica, «AppliChem», США).

Штаммы условно-патогенных микроорганизмов выделяли с помощью соответствующих селективных питательных сред и адекватных условий культивирования. Идентификацию чистых культур микроорганизмов проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии на приборе «MALDI Biotyper Sirius RUO System» («Bruker», США). Результат идентификации считали достоверным, если коэффициент соответствия с базой данных (Score) был больше или равен 2.0.

Для оценки антимикробной активности сыворотки методом посевов аликвоту суспензии 19-ти часовой культуры *Candida albicans* № 927 плотностью 10^5 КОЕ/мл соединяли с сывороткой или физраствором (контроль), инкубировали при 32°C , после чего отсеивали аликвоты на чашки Петри и инкубировали 24 часа при 32°C до появления колоний. Для определения общей антимикробной активности и активности фракции с молекулярной массой менее 100 кДа был адаптирован ранее разработанный **метод спектрофотометрии** (Арзуманян В.Г. с соавт., 2019 патент). Метод основан на инкубировании культуры клеток *C. albicans* с

сывороткой молока и последующем добавлении красителя бромкрезолового пурпурного с повторной инкубацией. В течение периода инкубации краситель убывает из среды, проникая через поврежденные мембраны клеточных стенок микробов. По окончании эксперимента клеточный осадок удаляли и проводили измерение оптической плотности образца на спектрофотометре («Genesys 10S UV-VIS», США) при длине волны 440 нм. Антимикробную активность рассчитывали в % по отношению к контрольному образцу, содержащему физиологический раствор вместо сыворотки. Микроскопию окрашенных осадков клеток проводили при суммарном увеличении 1750 (МБИ-6 «ЛОМО», Россия).

Фракции сывороток получали с помощью фильтрующих насадок с размером пор 3, 10, 30 и 100 кДа («Amicon Ultra-0,5», Millipore, Merck), а их активность определяли тем же методом. **Вклад активности фракции ниже 100 кДа в общую активность** сыворотки рассчитывали, как величину активности фракции ниже 100 кДа, умноженную на 100 и деленную на общую активность. **Пастеризацию** образцов проводили при температуре 62.5 °С в течение 30 минут. **Лиофилизацию** молока проводили в асептических условиях соответственно принятому стандарту. **Диализ** образцов сыворотки грудного молока проводили с помощью диализных пробирок EasyDial с размером пор 1 кДа (Orange Scientific, Бельгия) против физраствора в течение ночи при температуре 4÷6 °С. **Концентрацию альбумина** в образцах определяли с помощью тест-системы «Альбумин Абрис+» (ООО «НПФ» «Абрис», Санкт-Петербург).

Хромато-масс-спектрометрический и ВЭЖХ-МС/МС анализ фракции сыворотки ниже 3 кДа проведены на базе Центра коллективного пользования “Передовой масс-спектрометрии” Сколковского института науки и технологий. **Биоинформатический анализ образцов** производили с помощью приложения MSconvert (ProteoWizard 3.0). **Идентификацию пептидов** проводили с помощью компьютерного приложения SearchGUI v.3.3.21 по геномной базе данных человека UniProtKB с использованием поискового алгоритма X!Tandem. Дополнительно для идентификации последовательности пептидов, не соответствующих базе данных человека UniProtKB, был применен подход DeNovo секвенирования с помощью компьютерного приложения PEAKS. 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. **Уровень sIgA** в образцах сыворотки оценивали методом иммуноферментного анализа с помощью тест-системы «IgA секреторный-ИФА-БЕСТ» («Вектор БЕСТ», Новосибирск).

Статистический анализ полученных данных производили с помощью пакета программ Microsoft Excel 2019. Для оценки достоверности различия выборок применяли критерий Манна-Уитни.

Применение спектрофотометрического метода для определения противомикробной активности сывороток грудного молока

На пуловом образце зрелого грудного молока провели исследование активности сыворотки тремя методами: методом посевов, методом микроскопии и спектрофотометрическим методом. Установлено, что численность популяций микроорганизмов при культивировании в течение 4 часов значительно различалась: 4х-кратное снижение жизнеспособных клеток имело место для варианта, содержащего сыворотку, в то время как для контрольного варианта показано 2х-кратное увеличение жизнеспособных клеток. Результаты микроскопии показали, что инкубация суспензии с сывороткой приводила к разрушению как мембран, так и клеточных стенок мертвых и живых клеток с образованием везикулярного дебриса. Метод спектрофотометрии показал наличие дозозависимого эффекта при воздействии сыворотки грудного молока на клетки *C. albicans*: повышение объема сыворотки по отношению к объему суспензии клеток в 6 раз приводило к увеличению цитотоксической активности в 4,5 раза. Инкубация клеток с цельной сывороткой показала наличие антимикробной активности на уровне 82,9%, тогда как активность фракции сыворотки ниже 100 кДа составила 36,3%. Аналогичные результаты получены на культурах бактерий *S. aureus* и *E. coli*. Метод посевов занимает с учётом предварительной подготовки в среднем от 24 ч и более, в то время как для работы методами спектрофотометрии и микроскопии достаточно нескольких часов, что позволяет получить результат в день проведения эксперимента. Кроме того, методы спектрофотометрии и микроскопии не требуют большого количества питательных сред, что минимизирует затраты на проведение экспериментов.

Определение антимикробной активности сыворотки, концентрации лактоферрина, сывороточного альбумина, sIgA и оценка взаимосвязи между данными показателями

Исследование проводили на выборке из 66 образцов грудного молока, полученных от здоровых матерей в возрасте от 23 до 45 лет на разных сроках лактации. Сыворотки грудного молока ранжировали на 5 равноценных групп в соответствии с периодом лактации. В первую группу были включены сыворотки, относящиеся к молозиву. В остальные группы были включены и ранжированы сыворотки, относящиеся к переходному и зрелому молоку (Таблица 1). Установлено, что с увеличением длительности периода лактации значительно снижалась как общая антимикробная активность, так и активность фракции сыворотки, содержащая АМП, что подтверждается *p*-значениями по критерию Манна-Уитни для молозива и зрелого молока. Высокие значения коэффициентов Пирсона свидетельствуют о наличии положительной корреляции между показателями общей антимикробной и АМП-активности, и наличие обратной

корреляции этих показателей по отношению к периоду лактации. Корреляция между возрастом матери и антимикробной активностью сыворотки была умеренной.

Таблица 1 - Взаимосвязь биологических и иммунологических показателей сыворотки грудного молока

Чел. в группе, N	Период лактации	Период лактации, месяцы (медиана)	Возраст матери, лет (медиана)	Активность сыворотки и общая, % (медиана)	Активность фракции ниже 100 кДа, % (медиана)	ЛФ, мг/мл (медиана)	Альбумин сыв., мг/мл (медиана)	sIgA, мг/мл (медиана)
12	1 день -1 неделя	0,067	31	82,4	37,9	3,46	5,53	5,01
12	2 недели-2,5 месяца	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
14	8-11 месяцев	9	30,5	63,6	28,4	1,19	4,73	1,30
14	12 -27 месяцев	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
P*		$p \leq 0,01$	$p > 0,05$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$

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; p - значимость различий между 1 и 5 группой.

При оценке содержания лактоферрина в изучаемых образцах сыворотки установлено, что наиболее высокие его концентрации обнаруживались в образцах молозива, причем, максимальная детектированная концентрация ЛФ составила 10,8 мг/мл, в то время как максимальная детектированная концентрация ЛФ в зрелом молоке после 12 месяцев лактации

составила 1 мг/мл. Отмечена высокая положительная корреляция ЛФ не только с общей противомикробной активностью, но и с активностью АМП-фракции сыворотки – $r = 0,845$. Концентрация сывороточного альбумина была максимальна в молозиве – 8,8 мг/мл и значительно снижалась по мере увеличения периода лактации, коррелируя с активностью сыворотки. Имела место также высокая положительная корреляция с содержанием лактоферрина: $r = 0,994$. Максимальная детектированная концентрации sIgA соответствовала сыворотке молозива – 6,8 мг/мл и резко снижалась при переходе к зрелому молоку, сохраняясь примерно на одном уровне в последующие периоды лактации. Расчет потребления антимикробных полипептидов сыворотки по средним значениям объема продуцируемого молока (мг/кг веса младенца × сутки) показал, что через 12 месяцев от начала кормления младенец получает в несколько раз больше антимикробных субстанций: лактоферрина – в 1,8 раза, лизоцима – в 50,3 раза, сывороточного альбумина – в 10,5 раза и sIgA – в 5,7 раза.

Сравнение активности очищенных препаратов лактоферрина, лизоцима, лактопероксидазы и лактальбумина в отношении микроорганизмов *in vitro*

Действие очищенных препаратов лактоферрина (ЛФ), лизоцима (ЛЦ), лактопероксидазы (ЛП) и лактальбумина (ЛА) оценивали в отношении культур *S. aureus* Wood 46, *E. coli* M 17, и *C. albicans* № 927. Изучение действия указанных АМП в диапазоне концентраций от 2,5 мг/мл до 20 мг/мл выявило наличие дозозависимого эффекта для ЛФ, ЛП и ЛЦ, тогда как для ЛА этот эффект отсутствовал. Микроскопирование осадков клеток *C. albicans* показало наличие везикулярного дебриса после действия всех трех препаратов. При этом ЛА не проявлял какой-либо антимикробной активности. Уровни активности при концентрации препарата 5 мг/мл составили: против *C. albicans* – ЛФ – 12,7%, ЛП – 14,2%, ЛЦ – 20,1%; против *S. aureus* – ЛФ – 12,4%, ЛП – 5,8%, ЛЦ – 35,3%; против *E. coli* – ЛФ – 11,9%, ЛП – 6,8%, ЛЦ – 29,5%. Для пары ЛФ и ЛП экспериментальные и расчетные значения суммарной активности оказались почти одинаковыми против обоих видов бактерий, тогда как расчетная активность против *C. albicans* в 1,6 раза превысила экспериментальную ($p \leq 0,01$). То есть в случае дрожжей имел место антагонистический эффект при совместном действии ЛФ и ЛП. Для пары ЛФ и ЛЦ сумма расчетных активностей значительно превышала сумму экспериментальных: для *E. coli* – в 1,7 раза ($p \leq 0,01$), для *S. aureus* – в 3 раза ($p \leq 0,01$), т.е. отмечено достоверное взаимное ингибирование. Напротив, для *C. albicans* имела место незначительная синергия – в 1,2 раза экспериментальная суммарная активность превышала расчетную ($p > 0,05$). Для пары ЛП и ЛЦ, как и в предыдущем случае, имел место антагонистический эффект при совместном действии: для *E. coli* – в 1,4 раза ($p \leq 0,01$), для *S. aureus* – в 1,8 раза ($p \leq 0,01$). Однако для *C. albicans* указанные показатели

практически не различались. При совместном действии всех трех препаратов – ЛФ, ЛЦ и ЛП (каждый в концентрации 5 мг/мл) их активности составили: против *C. albicans* – 35,4%; против *S. aureus* – 31,5%; против *E. coli* – 38,8%. Очевидно, что расчетные величины активности по всем изучаемым микроорганизмам достоверно превышали экспериментальные: для *E. coli* – в 1,2 раза ($p \leq 0,01$), для *S. aureus* – в 1,7 раза ($p \leq 0,01$), для *C. albicans* – в 1,3 раза ($p \leq 0,01$). То есть в данном случае имело место взаимное ингибирование активности при одновременном действии препаратов на все указанные микроорганизмы. Таким образом, для бактерий во всех вариантах, кроме пары ЛФ и ЛП, имел место антагонистический эффект, наиболее ярко выраженный для пары ЛФ и ЛЦ. В то же время для дрожжей этот эффект отмечен только в вариантах ЛФ и ЛП, а также в случае действия всех трех препаратов.

Вклад лактоферрина, сывороточного альбумина, sIgA и лизоцима в антимикробную активность сыворотки грудного молока

Поскольку определены концентрации антимикробных компонентов грудного молока и их активность в отношении культуры клеток *C. albicans* также установлена, то представляется возможным проведение оценки вклада этих полипептидов в общую антимикробную активность сыворотки грудного молока (Рисунок 1). Активность чистого препарата IgA определяли для двух концентраций, максимально детектированных в молозиве (6,8 мг/мл) и зрелом молоке (1 мг/мл), а активность чистого препарата сывороточного альбумина – для 10 мг/мл и 5 мг/мл соответственно. Установлено, что иммуноглобулин класса А оказывал прямое микробицидное действие на клетки *C. albicans*, которое по данным микроскопии проявлялось в разрушении клеточных стенок и мембран этих дрожжей, наблюдаемом через 2 часа от начала эксперимента.

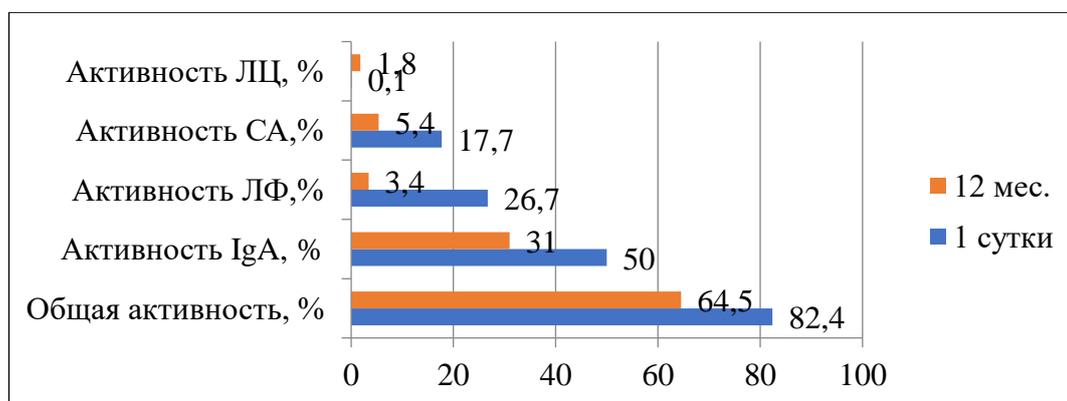


Рисунок 1 - Вклад лактоферрина, сывороточного альбумина, лизоцима и IgA в антимикробную активность сыворотки грудного молока на 1 сутки и через 12 месяцев после начала лактации (экспериментальные данные)

Сумма расчетных величин активности чистых препаратов этих полипептидов в концентрациях, характерных для односуточного молозива, составила 94,5%, что сравнимо с общей активностью сыворотки для этого периода. Сумма расчетных величин активности в концентрациях, типичных для 12 месяцев лактации, равна 41,6%, что также сравнимо с общей активностью в указанный период. Кроме того, видно, что наибольший вклад в активность как молозива, так и зрелого молока вносит sIgA.

Изучение взаимосвязи между наличием основных групп условно-патогенных микроорганизмов, антимикробной активностью и периодом лактации

Исследование проводили на 100 образцах грудного молока, полученных на разных сроках лактации. Ни в одном из образцов не были обнаружены условно-патогенные грибы. Методами посевов на селективные среды и последующей MALDI-TOF масс-спектрометрии был выявлен значительный спектр родов и видов условно-патогенных бактерий (Таблица 2). Из 270 изолятов, представленных 36 видами и 13 родами, преобладающими родами явились стафилококки (7 видов) и стрептококки (11 видов). Наиболее часто встречающимися (свыше 20%) были стафилококки - *S. epidermidis* и *S. aureus*, и стрептококки - *S. mitis* и *S. oralis*. Остальные роды бактерий представлены 1–3 видами, причем некоторые из полученных изолятов, такие как *Enterococcus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Rothia sp.*, *Neisseria sp.* и *Gemella sp.*, не удалось идентифицировать до уровня вида даже применив такой современный метод, как MALDI-TOF масс-спектрометрия. Обращает на себя внимание тот факт, что обсемененность грудного молока стафилококками и стрептококками варьировала от 10^2 до 10^3 КОЕ/мл, тогда как максимальная биомасса бактерий (10^4 КОЕ/мл и выше) характерна для редко встречающихся видов, таких как *P. amylolyticus*, *B. subtilis* и др. Образцы молока были разделены на группы в соответствии с периодом лактации: первая – 1-2^x суточное молозиво; вторая – 3^x суточное молозиво; третья – переходное молоко 4 сут-1 месяц; четвертая - зрелое молоко 3-8 месяцев; пятая – зрелое молоко – старше 9 месяцев. Количество образцов с максимальной суммарной обсемененностью – выше 10^4 КОЕ/мл – в первой группе составило 54,5%, во второй – 42,1%, в третьей – 23,1%, в четвертой – 10,5%, в пятой – 5,3%. Для каждого периода лактации определены и рассчитаны следующие показатели: антимикробная активность сыворотки, частота встречаемости и обсемененность наиболее значимыми видами, суммарная обсемененность образцов в данной группе и их видовое разнообразие (Таблица 3). Установлено, что активность сыворотки обратно пропорциональна периоду лактации, на что указывает отрицательное высокое значение коэффициента корреляции и значимые различия величин активности первой и пятой групп ($p < 0,001$).

Таблица 2 - Видовое разнообразие изолятов, полученных из 100 образцов грудного молока

Роды	Виды	Число изолятов
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>	71
	<i>S. aureus</i>	21
	<i>S. haemolyticus</i>	13
	<i>S. lugdunensis</i>	9
	<i>S. hominis</i>	9
	<i>S. warneri</i>	5
	<i>S. pasteurii</i>	1
<i>Streptococcus</i>	<i>S. mitis</i>	28
	<i>S. oralis</i>	22
	<i>S. parasanguinis</i>	20
	<i>S. vestibularis</i>	13
	<i>S. salivarius</i>	11
	<i>S. pneumoniae</i>	5
	<i>S. peroris</i>	1
	<i>S. agalactiae</i>	1
	<i>S. pseudopneumoniae</i>	1
	<i>S. constellatus</i>	1
	<i>S. infantis</i>	1
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	2
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>	2
<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i>	1
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	1
<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>	2
	<i>C. tuberculostearicum</i>	2
	<i>C. argentoratense</i>	1
<i>Klebsiella</i>	<i>K. oxytoca</i>	2
	<i>K. pneumoniae</i>	1
<i>Paenibacillus</i>	<i>P. amylolyticus</i>	1
<i>Rothia</i>	<i>Rothia sp.</i>	3
	<i>R. mucilaginosa</i>	2
<i>Neisseria</i>	<i>N. subflava</i>	4
	<i>N. flavescens</i>	2
	<i>Neisseria sp.</i>	1
<i>Kocuria</i>	<i>K. kristinae</i>	1
<i>Gemella</i>	<i>G. haemolysans</i>	7
	<i>Gemella sp.</i>	1
Итого родов – 13	Итого видов – 36	Итого изолятов – 270

Частота встречаемости и обсемененность *S. epidermidis* обратно коррелировали с периодом лактации, но были прямо пропорциональны антимикробной активности сывороток. Та же закономерность, но менее выраженная, имела место для *S. mitis* и *S. oralis*. Исключение среди часто встречающихся видов составлял *S. aureus*. Таким образом, первые три вида преобладали в раннем молозиве, тогда как золотистый стафилококк – в переходном молоке. Среди видов, не относящихся к стафилококкам и стрептококкам, преобладал *G. haemolysans*, причем он встречался только в молозиве.

Таблица 3 - Взаимосвязь между периодом лактации, антимикробной активностью сыворотки и наличием микроорганизмов в грудном молоке

N	Период лактации	Период лактации, месяцы (мед.)	АМ активность, %, (мед.)	<i>S. epidermidis</i>		<i>S. mitis</i>		<i>S. oralis</i>		<i>S. aureus</i>		Сумм. объем., КОЕ/мл (мед.) *	Видовое разнообразие, % **
				Частота встреч., %	КОЕ/мл, (мед.)	Частота встреч., %	КОЕ/мл, (мед.)	Частота встреч., %	КОЕ/мл, (мед.)	Частота встреч., %	КОЕ/мл, (мед.)		
11	1-2 сут	0,07	87,4	81,8	1200	36,4	6000	75	3000	9,1	200	9200	43,3
38	3 сут	0,1	89,4	73,7	2000	31,6	4000	31,6	1800	29	400	6800	76,7
13	4 сут-1 мес	0,13	88,2	69,2	1000	23,1	1000	23,1	4000	38,5	100	4200	60
19	3–8 мес	6	81,9	68,4	500	21,1	150	21,1	0	5,3	2000	560	50
19	9–27 мес	13	63,4	57,9	90	26,3	60	26,3	210	15,8	80	460	53,3
Корреляция с периодом лактации, <i>r</i>		-	-0,977	-0,854	-0,838	-0,400	-0,674	-0,397	-0,785	-0,413	0,127	-0,806	-0,283
Корреляция с АМ активностью, <i>r</i>		-0,977	-	0,827	0,810	0,272	0,581	0,288	0,664	0,336	0,079	0,699	0,291

Суммарная микробная обсемененность грудного молока, оцененная в виде медиан по группам, имела высокую обратную корреляцию с периодом лактации и высокую прямую корреляцию с антимикробной активностью сыворотки. При этом наиболее значимое снижение обсемененности отмечено при переходе от третьей группы к четвертой (после 1 месяца лактации), тогда как наиболее значимое снижение активности имело место позже – при переходе от четвертой к пятой группе (после 8 месяцев лактации), то есть, снижение обсемененности было первично по отношению к снижению активности. Видовое разнообразие, оцененное для каждой группы в целом, имело наименьшее значение в первой группе, а наибольшее - во второй, далее оно постепенно снижалось по мере увеличения срока лактации. При этом число видов, выделенных из каждого конкретного образца, варьировало от 1 до 5 в первой группе (медиана равна 3, среднее значение 2,8), от 1 до 5 во второй группе (3 и 3,2), от 1 до 4 в третьей группе (3 и 2,9), от 0 до 3 в четвертой группе (2 и 1,7) и от 1 до 5 в пятой группе (2 и 2,5). Коэффициент корреляции между этим показателем (медианами) и медианами обсемененности в группах составил 0,888; а между этим показателем и медианами антимикробной активности 0,794. Между общей обсемененностью и возрастом матери имела место обратная корреляция высокой силы ($r = - 0,787$); тогда как корреляция между антимикробной активностью сыворотки и возрастом матери была умеренной.

Активность различных фракций сыворотки грудного молока

Для определения реального вклада полипептидов с различной молекулярной массой в общую активность сыворотки грудного молока два пула сывороток фильтровали через мембранные фильтры с соответствующими размерами пор и в соответствующих фракциях определяли активность по отношению к клеткам *C. albicans* (Рисунок 2). Каждый пул состоял из трех сывороток – первый – с относительно высокой общей активностью, второй – с относительно низкой. Установлено, что основная часть активности соответствует белкам с молекулярной массой выше 100 кДа, что согласуется с данными, полученными ранее. Разность между активностью нативной сыворотки и активностью 100 кДа-фракции составила 56,2% (пул 1) и 70,2% (пул 2). Самый обильный АМП сыворотки грудного молока - лактоферрин (мол.масса 80 кДа) - находится во фракции ниже 100 кДа, но выше 30 кДа, таким образом, разность между значениями активностей этих фракций должна отражать в основном активность именно этого АМП: эта разность составила 5,1% (пул 1) и 9,7% (пул 2). Обращает на себя внимание отсутствие разницы в активности между фильтрами 3 кДа и 30 кДа. ВЭЖХ-МС анализ образцов с UV-детектированием и хромато масс-спектрометрический анализ фракции сыворотки с молекулярной массой ниже 3 кДа показали отсутствие пептидов, соответствующих геномной

базе данных человека UniProtKB, поэтому можно заключить, что полученные сигналы соответствуют каким-либо пептидам бактерий, например, бактериоцинам.

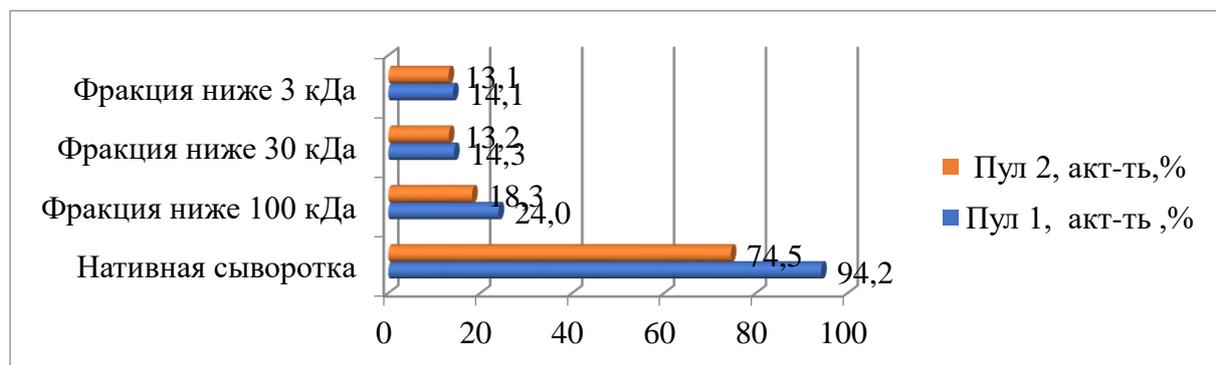


Рисунок 2 - Антимикробная активность фракций двух пулов сыворотки грудного молока (медианы)

Данные о последовательности аминокислот имеются только на пептиды с молекулярной массой 722 Да, 1048 Да и 1064 Да, однако количество аминокислот (6-9) недостаточно для того, чтобы определить их принадлежность к пептидам из релевантных баз данных.

Влияние физических факторов на антимикробную активность сыворотки молока

На 6 образцах грудного молока человека и 6 образцах молока коровы была изучена антимикробная активность сыворотки по отношению к культуре *C. albicans* после предварительного воздействия данных факторов. Все физические факторы оказали влияние на исходные образцы. Показано, что минимальное влияние на антимикробную активность образцов молока человека оказали пастеризация (снижение антимикробной активности на 5,2% от исходной) и лиофилизация (снижение на 7,3% от исходной). Максимальное воздействие на антимикробную активность грудного молока человека оказало замораживание в течение 3 месяцев – антимикробная активность грудного молока человека снижалась на 25,7% от исходной. Антимикробная активность сыворотки молока коровы значительно снижалась под действием всех описанных факторов: на 21,1% в результате пастеризации молока, на 49,6% после лиофилизации и на 49,2% после замораживания в течение 3 месяцев. Данные исследования позволяют предположить, что грудное молоко человека ввиду его качественного и количественного состава компонентов более устойчиво к физическим воздействиям, чем молоко коровы.

Антимикробная активность сыворотки молока различных млекопитающих

Сравнение общей антимикробной активности пуловых сывороток молока различных млекопитающих показало, что величина данного показателя нарастала в ряду коза-лошадь-

верблюд-корова-человек-мышь. Антимикробная активность фракции сыворотки молока ниже 100 кДа возрастала в ряду: коза (13,6%) - корова (18,9%) - лошадь (21,7%) - верблюд (30,6%) - человек (31,7%) - мышь (47,9%). Между этими двумя показателями имела место прямая корреляция: коэффициент Пирсона $r = 0,881$. Содержание альбумина в сыворотке молока мышей составляло 38,6 мг/мл, что было сравнимо с концентрацией его в крови мышей (30,8÷36,8 мг/мл). Концентрация сывороточного альбумина изменялась аналогично, корреляция этого показателя с общей активностью сыворотки так же высока: $r = 0,992$. Активность фракции сыворотки молока ниже 100 кДа мыши и человека сравнивали не только спектрофотометрическим методом, но и путем микроскопирования клеток. Установлено, что активность фракции ниже 100 кДа мышей значительно превышает таковую в человеческой сыворотке: число убитых клеток под действием фракции ниже 100 кДа мыши составило 29,8% (а с учетом 4-х кратного разведения – 119,2%) против 18,5 % для той же фракции сыворотки молока человека.

ВЫВОДЫ

1. Впервые для определения антимикробной активности цельной сыворотки грудного молока и её фракций в отношении клеток *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus* адаптирован спектрофотометрический метод. Метод дает возможность быстро (в течение 4 часов) и количественно оценить микробицидный эффект, заключающийся в деструкции мембран клеток микроорганизмов.
2. Показано, что с увеличением периода лактации значительно снижались: антимикробная активность цельной сыворотки ($r = - 0,944$), активность фракции сыворотки с молекулярной массой ниже 100 кДа ($r = - 0,950$), а также концентрации лактоферрина ($r = - 0,668$), sIgA ($r = - 0,527$) и сывороточного альбумина ($r = - 0,643$). Корреляция между возрастом матери и антимикробной активностью сыворотки была умеренной ($r = - 0,431$). Установлено, что наиболее значимыми по антимикробной активности в сыворотке молозива являются sIgA и лактоферрин, тогда как спустя 12 месяцев после начала лактации на первый план выходят sIgA и сывороточный альбумин. Расчет потребления указанных антимикробных компонентов сыворотки (мг/кг веса х сутки) по средним значениям способности к лактации показал, что через 12 месяцев от начала кормления младенец получает не меньше, как считали ранее, а в несколько раз больше антимикробных субстанций, чем при кормлении молозивом.
3. Изучено действие чистых препаратов основных антимикробных полипептидов грудного молока – лактоферрина, лизоцима и лактопероксидазы на клетки *C. albicans*, *S. aureus* и *E. coli* методами спектрофотометрии и микроскопии. Установлено, что эти полипептиды демонстрировали значительный дозозависимый микробицидный эффект. При их совместном

действию имели место как синергия, так и антагонизм, в зависимости от конкретного сочетания препаратов. Впервые установлено антимикробное действие лактопероксидазы на клетки микроорганизмов *per se*, т.е. вне связи с лактопероксидазной системой. Впервые показано, что очищенный препарат IgA в физиологической концентрации демонстрировал прямой фунгицидный эффект, обусловленный разрушением мембран и клеточных стенок.

4. Изучена взаимосвязь между наличием основных групп условно-патогенных микроорганизмов грудного молока, антимикробной активностью сыворотки и периодом лактации. Получено 270 изолятов, представленных 36 видами 13 родов условно-патогенных бактерий. Ни один из 100 изучаемых образцов молока не содержал условно-патогенных грибов. Наиболее часто встречающимися явились стафилококки - *S. epidermidis* (70,2%) и *S. aureus* (20,8%), и стрептококки - *S. mitis* (27,7%) и *S. oralis* (21,8%). Общая обсемененность имела высокую обратную корреляцию с периодом лактации ($r = - 0,806$) и высокую прямую корреляцию с антимикробной активностью сыворотки ($r = 0,699$). При этом снижение общей обсемененности грудного молока условно-патогенными бактериями по мере увеличения срока лактации первично по отношению к снижению антимикробной активности сыворотки.

5. Определение активности фракций сыворотки, содержащих полипептиды молекулярной массой ниже 3, 30 и 100 кДа, показало, что наибольшая антимикробная активность соответствовала фракции выше 100 кДа и, очевидно, обусловлена присутствием sIgA. Небольшая часть антимикробной активности соответствовала диапазону 30÷100 кДа, что, скорее всего, связано с наличием лактоферрина. Фракции ниже 30 кДа и ниже 3 кДа имели одинаково низкую активность. Показано, что фракция ниже 3 кДа не содержала пептидов человеческого происхождения. Превалирующие в данной фракции пептиды молекулярной массой 1406.4 Да и 1064.3 Да могут являться бактериоцинами.

6. Выявлено, что такие физические факторы, как пастеризация, лиофилизация, замораживание и диализ, снижали антимикробную активность цельной сыворотки грудного молока человека и молока коровы. Пастеризация молока снижала активности сывороток грудного молока человека и молока коровы по сравнению с исходной в 1.06 раза и в 1.37 раза соответственно; лиофилизация – в 1.09 раза и в 2.69 раза; замораживание – в 1.40 раза и в 2.65 раза.

7. Антимикробная активность сыворотки молока млекопитающих значительно варьировала и возрастала в ряду коза-лошадь-верблюд-корова-человек-мышь. При этом уровень общей антимикробной активности сыворотки молока у мышей в 3 раза превосходил соответствующую активность сыворотки грудного молока человека и в 10 раз – козы. Общая антимикробная активность имела высокую степень корреляции с содержанием альбумина ($r = - 0,725$), уровень которого у мышей был практически равен таковому в сыворотке крови этих животных.

Антимикробная активность фракции сыворотки молока ниже 100 кДа возрастала в ряду: коза-корова-лошадь-верблюд-человек-мышь.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Колыганова, Т. И.** Перспективы применения методов микроскопии и спектрофотометрии для оценки антимикробной активности молока / **Т. И. Колыганова**, В. Г. Арзуманян, В. В. Зверев // Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий : материалы I Международной научно-практической конференции, Кемерово, 27 ноября 2020 года. – Кемерово: КемГМУ, – 2020. – С. 61-63.
2. **Колыганова Т. И.** Различия гуморальных факторов иммунной защиты грудного молока и молозива / **Т. И. Колыганова**, В. Г. Арзуманян, Н. В. Хорошко, В. В. Зверев // **Вопросы детской диетологии.** – 2021. – Т. 19. – № 2. – С. 33-40. [Scopus]
3. **Kolyganova T.** Activity of breast milk antimicrobial peptides in experiments in vitro / **T. Kolyganova**, V. Arzumanian, O. Svitich [et al.] // **Current Topics in Peptide and Protein Research.** – 2021. – Vol. 22.– P. 77-83. [Scopus]
4. **Колыганова Т. И.** Альтернативные методы оценки противомикробной активности сыворотки грудного молока / **Т. И. Колыганова**, В. Г. Арзуманян, Е. А. Богданова, В. В. Зверев // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2021. – Т. 171. – № 4. – С. 525-528. [Scopus]
5. **Колыганова, Т. И.** Лактоферрин сыворотки грудного молока как фактор антимикробной активности в различные периоды лактации / **Т. И. Колыганова** // Ломоносов - 2021: материалы Международного молодежного научного форума, Москва, 12–23 апреля 2021 года. – Москва: ООО "МАКС Пресс", 2021.
6. **Колыганова, Т. И.** Полипептиды сыворотки грудного молока: антимикробное действие *in vitro* / **Т. И. Колыганова**, В. Г. Арзуманян // Проблемы медицинской микологии. – 2021. – Т. 23.– № 2.– С. 93.
7. **Колыганова, Т. И.** Лактоферрин и противомикробная активность сыворотки грудного молока в различные периоды лактации / **Т. И. Колыганова**, В. Г. Арзуманян, С. Ю. Конаныхина, П. В. Самойликов // **New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology** : Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, Москва, 30–31 марта 2021 года / Под редакцией В.В. Зверева. – Москва: Издательство "Перо", – 2021. – С. 20.
8. **Колыганова Т. И.** Вклад лактоферрина, сывороточного альбумина и секреторного иммуноглобулина класса А в антимикробную активность сыворотки грудного молока / В. Г.

Арзуманян, **Т. И. Колыганова**, О. А. Свитич [и др.] // **Инфекция и иммунитет.** – 2022. – Т. 12. – № 3. – С. 519-526. [Scopus]

9. **Колыганова, Т. И.** Антимикробная активность сыворотки молока / **Т. И. Колыганова**, В. Г. Арзуманян, М. А. Матвиенко [и др.] // *New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Epidemiology and Immunology: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, Москва, 03–04 июня 2022 года* / Под ред. В.В. Зверева.– Москва: Издательство "Перо", 2022.– С. 17.

10. **Колыганова Т.И.** Сравнительная характеристика антимикробной активности сыворотки грудного молока и ряда биологических жидкостей человека /**Т. И. Колыганова** // *Ломоносов - 2022: материалы Международного молодежного научного форума, Москва, 11–22 апреля 2022 года.* – Москва: ООО "МАКС Пресс", 2022.

11. **Колыганова, Т. И.** Микробиом грудного молока в различные периоды лактации как предиктор инфекционно-воспалительных заболеваний молочной железы/ **Т. И. Колыганова**, В.Г. Арзуманян, Н. О. Вартанова, А.В. Левадная //Международная научно-практическая конференция «Современные технологии диагностики, лечения, профилактики инфекционных и паразитарных болезней» (Бухара, 21–22 апреля 2022 г.): сборник материалов. – Бухара: 2022. – С. 75.

12. **Колыганова Т. И.** Влияние физических факторов на противомикробную активность грудного молока /**Т. И. Колыганова**, В. Г. Арзуманян, А. М. Иксанова // *New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology* : сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, Москва, 20–21 апреля 2023 года / ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. – Москва: Издательство "Перо", 2023. – С. 26.

13. **Колыганова Т. И.** Условно-патогенная микробиота грудного молока и антимикробная активность сыворотки на разных сроках лактации / В. Г. Арзуманян, **Т. И. Колыганова**, Н. О. Вартанова [и др.] // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.** – 2023. – Т. 100. – № 1. – С. 74-83. [Scopus]

14. **Колыганова Т. И.** Антимикробная активность сыворотки молока млекопитающих / **Т. И. Колыганова**, В. Г. Арзуманян, М. А. Матвиенко [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2023. – Т. 175. – № 3. – С. 340-344. [Scopus]

15. **Колыганова, Т. И.** Взаимосвязь микробиома грудного молока с антимикробной активностью сыворотки / **Т. И. Колыганова**, В. Г. Арзуманян, Н. О. Вартанова, И. М. Ожован // *Проблемы медицинской микологии.* – 2023. – Т. 25. – № 2. – С. 129.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМП – антимикробные пептиды

ЛФ – лактоферрин

ЛЦ – лизоцим

ЛП – лактопероксидаза

ЛА - лактальбумин

sIgA – секреторный иммуноглобулин класса А

Да – дальтон

кДа – килодальтон

ОП_{контр.} – оптическая плотность смеси из контрольной пробирки

ОП_{опыт.} – оптическая плотность смеси из опытной пробирки

ГПД – глюкозо-пептон-дрожжевая среда

Ig - иммуноглобулины