

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВАКЦИН И СЫВОРОТОК ИМ. И. И. МЕЧНИКОВА»

На правах рукописи



Колыганова Татьяна Игоревна

**Антимикробная активность и микробиом грудного молока
на разных сроках лактации**

1.5.11. Микробиология

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Арзуманян Вера Георгиевна

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Гуморальные факторы противомикробной защиты сыворотки грудного молока человека.....	16
1.1.1. Компоненты грудного молока, определяющие его антимикробную активность.....	16
1.2. Факторы, влияющие на антимикробную активность грудного молока	30
1.2.1. Срок лактации.....	30
1.2.2. Термическая обработка и сроки хранения.....	31
1.3. Характеристика молока различных видов млекопитающих	32
1.4. Микробиом зрелого грудного молока и молозива: нормобиота и условно-патогенные микроорганизмы.....	38
1.4.1. Видовое разнообразие микроорганизмов грудного молока на разных сроках лактации - сравнение различных методов идентификации	38
1.4.2. Взаимосвязь между микробиомом грудного молока и его антимикробной активностью.....	40
1.5. Методы, используемые для оценки антимикробной активности грудного молока	41
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1. Объекты.....	46
2.2. Микробиологические методы	47
2.3. Биохимические и биофизические методы	48
2.3.1. Спектрофотометрический метод	48
2.3.2. Фракционирование сывороток.....	49
2.3.3. Пастеризация, лиофилизация и диализ.....	49
2.3.4. Микроскопия	50
2.3.5. Колориметрический метод.....	50

2.3.6. Электрофорез в ПААГ	50
2.3.7. Высокоэффективная жидкостная хроматография	51
2.3.8. MALDI-TOF MS	51
2.3.9. Хромато-масс-спектрометрический и ВЭЖХ-МС/МС анализ низкомолекулярной фракции сыворотки.....	52
2.4. Иммунологические методы.....	53
2.5. Методы статистической обработки.....	53
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	54
3.1. Применение спектрофотометрического метода для определения противомикробной активности сывороток грудного молока.....	54
3.1.1. Сравнение спектрофотометрического метода определения антимикробной активности сыворотки грудного молока с традиционными методами.....	54
3.1.2. Исследование общей противомикробной активности сыворотки и её фракций ниже 100 кДа сывороток на культурах <i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	58
3.2. Изучение взаимосвязи антимикробной активности сыворотки грудного молока с её основными противомикробными компонентами.....	60
3.2.1. Определение антимикробной активности сыворотки, концентрации лактоферрина, сывороточного альбумина, sIgA и оценка взаимосвязи между данными показателями	60
3.2.2. Расчет продукции и потребления лактоферрина, лизоцима, сывороточного альбумина и sIgA молозива и зрелого молока	62
3.2.3. Сравнение активности очищенных препаратов лактоферрина, лизоцима, лактопероксидазы и лактальбумина в отношении микроорганизмов <i>in vitro</i>	65
3.2.4. Вклад лактоферрина, сывороточного альбумина, sIgA и лизоцима в антимикробную активность сыворотки грудного молока	68

3.3. Изучение взаимосвязи между наличием основных групп условно-патогенных микроорганизмов, антимикробной активностью и периодом лактации.....	70
3.3.1. Оценка видового разнообразия условно-патогенных микроорганизмов грудного молока на разных сроках лактации.....	70
3.3.2. Сравнительная оценка микробиологических показателей с антимикробной активностью сыворотки и её низкомолекулярной фракции	74
3.4. Активность различных фракций сыворотки грудного молока	77
3.4.1. Определение активности фракций сыворотки, содержащих полипептиды молекулярной массой ниже 3, 10, 30 и 100 кДа.....	77
3.4.2. Изучение пептидного состава фракции сыворотки ниже 3 кДа	78
3.5. Влияние физических факторов на антимикробную активность сыворотки молока.....	82
3.6. Антимикробная активность сыворотки молока различных млекопитающих.....	84
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	89
ВЫВОДЫ	100
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	104

ВВЕДЕНИЕ

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 JKS 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 (Такаюама Y., Аоки 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 микробицидного 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 в (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 Федерального государственного автономного образовательного учреждения 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 Федерального государственного бюджетного научного учреждения «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», «Ломоносов-2022», 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 Pharmaceutics and Novel Drug Delivery Systems , Paris, France (2022г.).

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Гуморальные факторы противомикробной защиты сыворотки грудного молока человека

К компонентам антимикробной защиты молока относят клеточные и гуморальные факторы. Клеточное звено представлено клетками моноцитарного ряда, гранулоцитами, дендритными клетками, НК-клетками, а также стволовыми клетками (Palmeira P., Carneiro-Sampaio M., 2016). К гуморальным компонентам молока относят антимикробные пептиды, иммуноглобулины, цитокины и систему комплемента (Duncan, M. E. et al., 1983; Michie C.A. et al., 1998; Wada Y., Lönnerdal B., 2014).

1.1.1. Компоненты грудного молока, определяющие его антимикробную активность

Антимикробные пептиды, их характеристика, молекулярные и биологические особенности

Лактоферрин (ЛФ) представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 80 кДа. ЛФ секретируется нейтрофилами, клетками эпителия, обнаруживается в тканях, а также почти во всех биологических жидкостях – плазме крови, слюне, слезной жидкости, сперме, вагинальном секрете, желудочно-кишечном секрете, в слизистом отделяемом респираторного тракта (Albenzio M. et al., 2016)

По своей химической структуре ЛФ содержит два активных сайта, имеющих высокое сродство к ионам железа и способных связывать большую часть железа в молоке (Weinberg E.D., 1975). По степени насыщенности ЛФ железом можно выделить три формы: форма свободная от железа (аполактоферрин), форма, содержащая один ион Fe^{3+} (моноферрин) и

максимально насыщенная форма, содержащая два иона Fe^{3+} (хололактоферрин). Третичные структуры холо- и апо- форм белка также имеют различия (Jameson G.V. et al., 1998).

Ввиду истощения ионов железа - биологически важного кофактора для ферментов, участвующих в бактериальном росте - данный механизм связывания помогает ЛФ косвенно регулировать численность микробов в молоке млекопитающих (Becker K.W., Skaar E.P., 2014).

Помимо этого, ЛФ обладает прямым антимикробными, антиоксидантными, противовоспалительными, противоопухолевыми и иммунорегуляторными свойствами, тем самым выступая ключевым звеном иммунитета хозяина (Valenti P., Antonini G., 2005; Takayama Y., Aoki R., 2012; Arias M. et al., 2017).

Прямое микробоцидное действие ЛФ связано с непосредственным эффектом на структуры клеточных стенок микробов. Так, например, катионные структуры ЛФ взаимодействуют с отрицательно заряженными компонентами микробных клеток - липотейхоевой кислотой грамположительных бактерий или липосахаридами грамотрицательных бактерий. Заряд, амфипатичность и размеры молекул АМП позволяет им формировать поры в мембране микробных клеток, приводя к осмотическому лизису клетки (Ellison R.T.J., 1991).

Антимикробная активность ЛФ и его производных была продемонстрирована в отношении широкого спектра патогенных микробов, включая *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Candida albicans*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*; *S. Enteriditis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Vibrio cholerae* и вирусы гепатита В и С, цитомегаловирус, полиовирус, ротавирус и вирус простого герпеса. ЛФ в экспериментах *in vitro* повышал чувствительность бактерий к ряду антибиотиков, например, ванкомицину, пенициллину и цефалоспорином (Farnaud S., Evans R.W., 2003; Pan Y. et al., 2007).

Отмечается влияние ЛФ на биопленкообразование бактерий, что особенно значимо, например, в контексте инфицирования новорожденных опасным

био пленкообразующим патогеном *Streptococcus agalactiae* группы В (Lu J. Et al., 2021).

При этом ЛФ способствует росту нормофлоры с низкими потребностями в железе, такой как *Lactobacillus* и *Bifidobacteria* (Sherman M.P. et al., 2004).

Гидролиз ЛФ человека пепсином приводит к освобождению коротких пептидных фрагментов (примерно из 24–25 аминокислот), получивших название лактоферрицины. Лактоферрицины в экспериментах *in vitro* продемонстрировали большую антибактериальную эффективность - примерно в 12 раз выше, чем у негидролизованного лактоферрина (Bellamy W. et al., 1992a).

В зависимости от условий взаимодействия и иммунного статуса хозяина прямое антимикробное действие лактоферрина дополняют его про- и противовоспалительные свойства благодаря способности взаимодействовать с многочисленными клеточными и молекулярными мишенями (Legrand D., 2012). На клеточном уровне ЛФ модулирует миграцию, созревание и функции иммунных клеток.

Лактоферрин показал себя перспективным препаратом для снижения распространенности ряда патологий новорожденных, включая инвазивные микозы, сепсис и некротизирующий энтероколит (Sharma D. et al., 2017).

Наибольшая концентрация ЛФ в грудвысокающем молоке первые 5 дней жизни младенца составляет около 7 г/л, постепенно снижаясь до 50% с 6 по 10 день и выходя на плато уже после первого месяца жизни, приближаясь к концентрации до 1 г/л (Rai D. et al., 2014).

Достоверность взаимосвязи курения, питания матери, социально-экономического статуса, расы/этнической принадлежности, возраста матери, со значительными изменениями концентрации ЛФ в грудном молоке не подтверждена (Villavicencio A. et al., 2014).

Лизоцим – гликозидаза, фермент класса гидролаз с молекулярной массой 15 кДа, способный разрушать клеточную стенку грамположительных бактерий

путем гидролиза β -1,4- гликозидной связи N-ацетилмураминовой и N-ацетилглюкозаминовой кислот.

Помимо этого, лизоцим также обладает активностью в отношении грамотрицательных бактерий *in vitro*, действуя синергически с лактоферрином, который, связываясь с липополисахаридом внешней бактериальной мембраны, повреждает его и тем самым предоставляет доступ лизоциму к внутреннему пептидогликану клеточной стенки (Ellison R.T.J.,1991).

Данный полипептид присутствует в больших количествах в органах, тканях и биологических жидкостях организма, в том числе в суставных хрящах, печени, селезенке, крови, слюне, слезной жидкости и грудном молоке (Reitamo S. et al.,1978). Схожие литические ферменты были выделены из органов и секретов различных позвоночных, беспозвоночных, бактерий и даже растений (например, латекс папайи) (Ogawa H. et al.,1971). Данный феномен свидетельствует о широком распространении лизоцима и лизоцимподобных ферментов в природе.

Недавно была продемонстрирована высокая бактерицидная активность лизоцима как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий, а также в отношении *Candida albicans*, независимая от каталитического действия. Данный эффект был обусловлен внутренним пептидом частично развернутой формы лизоцима (Ibrahim H. et al., 2001).

В клинических испытаниях было показано положительное воздействие лизоцима при добавлении его к молочным смесям и донорскому грудному молоку. У всей выборки, состоящей из 64 недоношенных детей, отмечалось улучшение общего состояния, санация инфекционных очагов воспаления, нормализация стула, стабилизация уровня лизоцима в копрофильтратах и в сыворотке крови (Bol'shakova AM. et al., 1984).

Концентрация лизоцима меняется на протяжении всего периода лактации – постепенное снижение уровня от молозива к зрелому молоку (с 15 по 28 день) - 0,37 г/л, 0,27 г/л и 0,24 г/л соответственно (Montagne P. et al., 2001). Однако, начиная с 29 дня и до 56 дня лактации концентрация лизоцима зрелого молока

увеличилась до 0,33 г/л. При этом самые высокие показатели зрелого молока соответствовали 57 - 84 дням (0,89 г/л).

Дефензины – антимикробные пептиды молекулярной массой 3–4 кДа, состоящие из шести высококонсервативных остатков цистеина с тремя парами внутримолекулярных дисульфидных связей (Tunzi C.R. et al., 2000). Они могут быть классифицированы как α - β - и θ -дефензины в зависимости от клеточного происхождения и строения. У человека обнаружены α -дефензины и β -дефензины.

Известны шесть типов α -дефензинов: пептиды 1–4 (HNP-1, HNP-2, HNP-3 и HNP-4) продуцируемые гранулоцитами, Т-лимфоцитами и естественными киллерами, и пептиды 5-6 (HD5 и HD6), обнаруженные в гранулах клеток Пенета тонкой кишки.

Среди β -дефензинов (hBDs) человека наиболее хорошо изучены типы hBD-1, hBD-2, hBD-3 и hBD-4. Почечная ткань, поджелудочная железа, слюнная железа, эпителий дыхательных путей, женская мочеполовая система, плацента, а также эпителий молочной железы человека широко экспрессирует hBD-1 (Zhao C. et al., 1996; McCray PB Jr, Bentley L.1997; Valore EV. et al.,1998; Tunzi C.R. et al., 2000). Экспрессия hBD-2 была обнаружена в коже, легких, мочеполовой системе и грудном молоке (Bals R. et al.,1998; Hiratsuka T. et al.,1998; Tunzi CR et al., 2000; Joanna B. et al., 2014;). При этом экспрессия hBD-1 является конститутивной, в то время как hBD-2 индуцируется грамположительными и грамотрицательными бактериями, *Candida albicans* и фактором некроза опухоли- α .

Неспецифичная цитотоксическая активность дефензинов обуславливает их широкий антимикробный спектр в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, микобактерий, грибов и некоторых вирусов (Lehrer R.I. et al., 1993). Помимо этого, дефензины выполняют иммуноадаъювантную, регуляторную функцию, взаимодействуя с клеточными факторами врожденного и адаптивного иммунитета (Hazlett L., Wu M. 2011).

Концентрации дефензинов варьируют в молозиве и грудном молоке в зависимости от ряда факторов. Так, исследование, проведенное в КНР, показало диапазоны концентраций hBD-1 и hBD-2 в молозиве на уровне 1,04–12,81 мкг/мл и 0,31–19,12 нг/мл, соответственно (Wang X.F. et al., 2014). В зрелом молоке уровни hBD-1 и hBD-2 были 1,03–31,76 нг/мл и 52,65–182,29 пг/мл, соответственно. Кроме того, установлена взаимосвязь между высокими уровнями hBD-1 и снижением уровня заболеваемости инфекциями верхних дыхательных путей в течение первых 6 месяцев ребенка ($\chi^2 = 4,995$, $P = 0,025$). Обнаружена связь между индексом массы тела (ИМТ) до беременности и уровнями hBD-1 в молозиве ($P = 0,001$); способ родоразрешения был достоверно связан с уровнями hBD-2 в молозиве ($P = 0,006$), а гестационный возраст был достоверно связан с уровнями hBD-1 в зрелом молоке ($P = 0,010$).

В исследовании, проведенном на территории РФ, была показана зависимость концентрации hBD-2 в грудном молоке и риск развития атопического дерматита у детей (АтД) (Бунина (Богуславская) Ю.А. с соавт., 2020). В грудном молоке матерей, имеющих здоровых детей, уровень hBD-2 составил 209,6 пг/мл, в то время как в грудном молоке матерей с детьми с АтД в легкой форме концентрация hBD-2 составила 166,3 пг/мл. В грудном молоке матерей чьи дети имели среднетяжелое течение АтД, концентрация β -дефензина-2 была значительно ниже, чем в первой группе (71,2 пг/мл). Снижение концентрации β -дефензина-2 в грудном молоке может быть одним из ранних прогностических критериев более тяжелого течения АтД у детей раннего возраста.

Сообщалось о бактерицидной активности hBD-2 человека *in vitro* в отношении энтеропатогенов и внутрибольничных штаммов (Routsias J.G. et al., 2010). Значение hBD-2 в антимикробной активности грудного молока подтверждается также тем, что концентрация, в которой hBD-2 проявляет антимикробную активность *in vitro* в отношении изолятов *Salmonella spp.* и

штаммов *E. coli*, сходна с его физиологической концентрацией в грудном молоке (Joanna B. et al., 2014).

Кателицидины – широко представленное семейство катионных пептидов, синтезируемое созревающими миелоидными клетками костного мозга в виде пре-про-пептидов (Bartlett J. A. et.al, 2008 Anderson R.C. et al., 2008; Vandamme D. et al., 2012; National Center for Biotechnology Information (2022);). При этом геном человека кодирует единственный пептид hCAP-18 с молекулярной массой около 18 кДа (human cationic antimicrobial protein 18 kDa), по кателиновому домену отнесенный к семейству кателицидинов. В результате протеолиза hCAP-18 образуется пептид LL-37 (leucine–leucine 37 aa) с молекулярной массой примерно 4,5 кДа, обладающий прямым антимикробным и выраженным иммуномодулирующим действием.

В экспериментах LL-37 проявлял антибактериальную активность как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий (Turner J. et al, 1998), эффективно ингибировал образование бактериальных биопленок *in vitro* (Overhage J. et al., 2008). Кроме того, показана его противовирусная (Howell M.D. et al., 2004; Wang G. et al., 2008) и противогрибковая активность (Wong J.H. et al., 2011).

В грудном молоке человека мРНК кателицидина CAP18/LL-37 не только обнаруживается в клеточных элементах, но и возрастает в 12 раз к 30-му дню лактации (в сравнении с 10-м днём), сохраняя экспрессию до 60 дня лактации (Murakami M. et al.,2005). Содержание LL-37 составило 157,5 мкг/мл. Показано, что пептид LL-37, полученный из супернатанта автоклавированного молока, обладал прямой антимикробной активностью по отношению к *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* и *E. coli*. Фактическая активность в естественных условиях может дополнительно усиливаться комбинацией с другими антимикробными пептидами молока человека.

Дермцидин (DCD) - пептид, имеющий несколько изоформ из 110, 121 и 77 аминокислот с молекулярной массой 11 кДа, 12 кДа и 8 кДа соответственно (Schenk S. et al., 2008). Данный пептид выделен относительно недавно и не имеет гомологии с другими известными антимикробными пептидами. В отличие от других известных АМП, молекула дермцидина заряжена отрицательно и способна проявлять

антимикробную активность в широком диапазоне pH и при высоких концентрациях солей (Schitteck B., 2012). DCD активен в отношении широкого спектра бактерий и грибов в концентрациях ≈ 10 мкг/мл (Paulmann M. et al., 2012). В потовых железах изоформа из 110 аминокислот подвергается протеолитической обработке с образованием смеси олигомеров различного размера (T. Flad, R. Vogumil, 2002). Так, пептид из 47 аминокислот, получивший название DCD-1 в экспериментах *in vitro* показал широкий спектр антимикробной активности. Родственный пептид - DCD-1L, состоящий из DCD-1 плюс остаток лейцина (L), проявлял более выраженную антимикробную активность (Schitteck B., 2012).

Недавно показано присутствие дермцидина в молозиве и зрелом грудном молоке на уровне 70 нг/мл и 30 нг/мл соответственно (Ustebay S. et al., 2019). Данные показатели выше, чем в крови этих же пациентов, где концентрация дермцидина составила менее 10 нг/мл.

Гепцидин – антимикробный пептид, состоящий из 25 аминокислот, образующийся в результате ферментативного расщепления про-гепцидина печени, обнаруживается в крови, моче и молоке (Ganz T., 2006).

Как гормон, участвующий в метаболизме железа - отрицательный регулятор его всасывания в кишечнике, транспорта из макрофагов, а также через плаценту беременных - гепцидин является важным связующим звеном между иммунной защитой организма, воспалением и инфекционным процессом. Так, воспаление, инфекция и избыток поступления железа индуцируют выработку гепцидина, а

анемия и гипоксия – ингибируют (Nicolas G. et al., 2002). Данные эффекты приводят к так называемой «анемии воспаления».

Помимо снижения доступности ионов железа для микробов, *in vitro* была показана прямая микробицидная активность гепцидина в концентрации 200 мкг/мл. В меньших концентрациях он действовал бактериостатически (Houamel D. et al., 2016)

В молозиве кормящих женщин концентрации прогепцидина и гепцидина-25 в составили $0,65 \pm 0,039$ нг/мл и $0,6 \pm 0,077$ нг/мл соответственно. В зрелом грудном молоке концентрации прогепцидина и гепцидина-25 составили $0,53 \pm 0,048$ нг/мл и $0,62 \pm 0,064$ нг/мл соответственно (Aydin S. et al., 2013).

Лактопероксидаза (ЛП) - гликопротеин массой 77,5 кДа, обнаруживаемый как в растительном, так и в животном царстве, относится к семейству ферментов - пероксидаз. ЛП катализирует окисление тиоцианата (SCN) перекисью водорода с получением тиоцианогена ((SCN)₂), который затем гидролизует до гипоциановой кислоты (HOSCN) или гипотиоцианата (OSCN) - основного промежуточного продукта окисления SCN. Другими короткоживущими промежуточными продуктами, обнаруживаемыми в различных количествах, являются (SCN)₂, тиоцианат циана (NC-SCN), циано-сернистая кислота (HO₂SCN) и циано-серная кислота (HO₃SCN). Гипоциановая кислота и гипотиоцианат являются высокореактивными окислителями. Они вступают в реакцию с сульфгидрильными группами и восстановленными никотинамидными нуклеотидами микробных клеток, снижая жизнеспособность бактерий, вирусов и грибов (Welk A. et al., 2009; Buys E. M., 2011).

Лактопероксидаза присутствует в молоке практически всех видов млекопитающих. Она составляет приблизительно 0,5% сывороточных белков в коровьем молоке (1,2-19,4 Ед/мл), что примерно в 20 раз превышает активность фермента в человеческом молоке, где содержание ЛП составляет менее 0,1%

сывороточных белков - 1-1,5 ед/мл в течение первых 6 месяцев лактации (Buys E. M., 2011).

Методом ИФА показано, что средняя концентрация лактопероксидазы в 26 образцах сыворотки зрелого человеческого молока составляет $0,77 \pm 0,38$ мг/л (Shin K, et al., 2001).

Прочие полипептиды, проявляющие антимикробную активность

α -Лактальбумин (α -LA) – один из наиболее распространенных сывороточных белков грудного молока с молекулярной массой 14,2 кДа, характеризуется высоким содержанием цистеина, триптофана и лизина. На концентрацию α -LA в грудном молоке влияют различные факторы, включая генетические, экологические и диетические факторы (Jackson J.G. et al., 2004; Santos L.H., Ferreira I.M., 2007). На 452 образцах зрелого человеческого молока, полученных от 50 женщин из девяти разных стран на пяти континентах, показана средняя концентрация α -LA на уровне $2,44 \pm 0,64$ г/л (Jackson J.G. et al., 2004). Важно отметить, что содержание α -лактальбумина варьировало в течение периода лактации и снижалось от $3,9 \pm 0,8$ г/л в молозиве до $2,8 \pm 0,5$ г/л в зрелом грудном молоке (Garcia-Rodenas C.L. et al., 2018). Апоптоз опухолевых и незрелых клеток, прямая антимикробная активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, таких как *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *M. tuberculosis* в экспериментах *in vitro* была показана для HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells) - белково-липидного комплекса грудного молока, состоящего из α -лактальбумина с олеиновой кислотой (Marks L.R. et al., 2012). Помимо этого, показано потенцирующее действие HAMLET в отношении гентамицина, эритромицина и пенициллина как против чувствительных, так и против резистентных пневмококковых штаммов, а также снижение МИК пенициллина, эритромицина и гентамицина в отношении пневмококковых

штаммов, находящихся в составе биопленок (Marks L.R. et al., 2012). Однако синтез HAMLET- комплекса *in vivo* при переваривании молока еще не доказан.

Казеины наравне с сывороточными белками относятся к основным белкам грудного молока. В молозиве соотношение сывороточных белков к казеину равно 80:20, в зрелом грудном молоке это соотношение меняется к 50:50 (Мачнева И. В. с соавт., 2020). Данные изменения обусловлены увеличением продолжительности периодов между кормлениями и снижением потребности в иммунных факторах материнского молока. Грудное молоко человека в сравнении с другими видами животных содержит только β - и κ -казеин, а также в низкой концентрации α -казеин (Liao Y. et al., 2017). В молозиве концентрация κ -казеина составляет более 1 г/л, постепенно снижаясь, к 12 месяцам кормления достигает 0,5 г/л в зрелом молоке. Концентрации α - и β -казеина в молозиве и зрелом молоке составляет 0,4–0,3 г/л и 1,3–1 г/л соответственно (Donovan S. M., 2019). Биологические функции казеинов молока обширны. Известно, что κ -казеин обладает антиоксидантной, АПФ-ингибирующей и антибактериальной активностью (Donovan S. M., 2019). Помимо этого, в экспериментах *in vitro* очищенный κ -казеин эффективно ингибировал специфическую адгезию *Helicobacter pylori* к клеткам слизистой оболочки желудка человека (Strömqvist M. et al., 1995). Отдельные фрагменты казеинов могут проявлять выраженную антимикробную активность. Так, из β -казеина был получен пептид, молекулярной массой 2,3 кДа, получивший название казеин 201 (пептид отщепленный от β -казеина 201–220 aa) (Zhang F. et al., 2017). В экспериментах *in vitro* он показал антибактериальный эффект, по механизму действия сходный с традиционными АМП, в отношении инфекционных агентов, возбудителей неонатальной инфекции - *Staphylococcus aureus* и *Yersinia enterocolitica*. Схожие результаты по антибактериальной активности в отношении *Staphylococcus aureus* и *Yersinia enterocolitica* показаны в эксперименте с другими пептидами, полученными из β - казеина - PDC213 (peptide derived from b-Casein 213-226 aa) и PDC197 (отщепленный от 197-213 AA β -казеина), к которому

помимо прочих были чувствительны штаммы *E. coli* (Fu Y. et al., 2017; Sun Y. et al., 2017).

Лактадгерин – гликопротеин с молекулярной массой 46 кДа, являющийся составной частью мембраны глобул молочного жира грудного молока. При исследовании очищенного препарата лактадгерина в условиях *in vitro* и *in vivo* на культуре клеток была показана его способность ингибировать связывание ротавируса (значимо при концентрации выше 0,02 мг/мл) и оказывать защитный антиротавирусный эффект (Kvistgaard A.S. et al., 2004). Литературные данные по антибактериальной активности этого гликопротеина отсутствуют. В грудном молоке концентрация лактадгерина максимальна в молозиве и составляет около 0,139 мг/мл, затем происходит постепенное снижение в зрелом молоке до 0,066 мг/мл (Peterson J. A. et al., 1998).

Гаптокоррин представляет собой гликопротеин, связывающий витамин В12 и содержащийся во многих биологических жидкостях организма, включая грудное молоко (Burger R.L. et al., 1975). В грудном молоке гаптокоррин существует в двух формах: апо-гаптокоррин, который ненасыщен витамином В12, и гологаптокоррин, который насыщен витамином В12. Ранее считалось, что основная функция этого гликопротеина заключается только в транспортировке и всасывании витамина В12 у младенцев ввиду недостаточности развития их желудочной секреции. При этом превалирование в грудном молоке витамин В12-дефицитного апо-гаптокоррина привело к мысли о косвенном антимикробном действии гаптокоррина на патогенные бактерии путем связывания с витамином В12 в кишечнике младенца (Adkins Y., Lönnerdal B., 2003). Так, было показано, что гаптокоррин, подвергшийся воздействию пищеварительных ферментов, в равной степени, как и непереваренный гаптокоррин, ингибировали рост энтеропатогенной *E.coli*. Однако, более поздние исследования показали, что очищенный гаптокоррин не проявлял ожидаемой

бактерицидной/бактериостатической активности, и, по всей вероятности, его антимикробный эффект обусловлен синергией с другими антибактериальными пептидами (Jensen H.R. et al., 2011). Грудное молоко содержит примерно от 5 мкг/мл в молозиве до 3 мкг/мл в зрелом молоке апо-гаптокоррина, что значительно превышает концентрацию гологаптокоррина (Haschke F. et al., 2016).

Сывороточный альбумин. Показано, что сывороточный альбумин содержался в молозиве в концентрации порядка 1,2 г/л, а в зрелом грудном молоке - 0,5 г/л и сохранялся практически на неизменном уровне в течение всего исследуемого послеродового периода (35). Есть данные о том, что сывороточный альбумин в концентрациях, близких к физиологическим в сыворотке крови (50 мг/мл), проявлял антимикробную активность в отношении культур грибов *C. albicans*, *Cr. neoformans* и бактерий *E. coli*, *S. aureus* (Арзуманян В.Г. с соавт., 2019).

Иммуноглобулины (Ig) являются важным компонентом гуморального звена адаптивного иммунитета. Существовая в различных формах (мономерных, димерных, пентамерных, гексамерных и т. д.), они принимают участие во множестве реакций иммунитета - от нейтрализации и опсонизации антигена, до активации мономерными формами иммуноглобулинов НК-клеток и запуска антителзависимой клеточной цитотоксичности, связывания белков системы комплемента с последующей активацией классического пути.

Иммуноглобулины молока матери обуславливают естественный пассивный иммунитет новорожденного, выполняя компенсаторную роль для еще созревающей иммунной системы ребенка.

В грудном молоке человека присутствуют sIgA (секреторный иммуноглобулин класса А), IgM и IgG. Превалирующим по концентрации является sIgA – на его долю приходится до 90 ÷ 95% от общего пула иммуноглобулинов, IgM 2 ÷ 5% и IgG менее, чем 1% (Lepage P., Van de Perre P.,

2012; Rio-Aige K. et al., 2021). Молозиво содержит высокие концентрации sIgA – более 7 г/л, что составляет до 25% от общего количества сывороточных белков, тогда как зрелое молоко содержит примерно $0.47 \div 1$ г/л. Концентрации IgM в молозиве и зрелом молоке составляют 0,34 г/л и 0,14 г/л соответственно. Установлено, что уровни IgA и IgM в молозиве среди первородящих матерей достоверно выше, чем у повторнородящих матерей, тогда как корреляции с возрастом матери обнаружено не было (Kaplan D.S. et al., 2019). Кроме того, у младенцев женского пола наблюдалось достоверно более высокое содержание IgA и IgM в молозиве матери по сравнению с младенцами мужского пола. Показана возможность снижения содержания sIgA в молоке у матерей с воспалительными заболеваниями кишечника (Meng X. et al., 2019). Концентрации IgG в молозиве и зрелом молоке составили 0,08 г/л и 0,04 г/л соответственно (Telemo E., Hanson L.A., 1996). Предполагают, что, несмотря на снижение концентрации антител с течением периода лактации, увеличение потребления молока может компенсировать количество иммуноглобулинов, полученных ребенком (Goldblum R. et al., 1996). Димерное строение и наличие секреторного компонента, высокая устойчивость и стабильность к действию протеаз желудочно-кишечного тракта делают sIgA незаменимым компонентом грудного молока в защите слизистых новорожденных от патогенных микробов, токсинов и отдельных антигенов, и аллергенов (Chatterton D.E.W. et al., 2004; Brandtzaeg P., 2013). Показано амёбоцидное действие очищенных sIgA, апо-лактоферрина и лизоцима в отношении *E. histolytica* в течение первого часа экспозиции с этими препаратами (León-Sicairos N. et al., 2006). При этом выраженность микробоцидного эффекта во всех экспериментах возрастала в ряду лизоцим-sIgA-апо-лактоферрин, а жизнеспособность культуры в среде с низким содержанием железа соответствовала 78%, 66% и 62%. Показана прямая микробоцидная активность специфичного моноклонального IgA по отношению к культуре клеток *C. albicans* (Kavishwar A., Shukla P. K., 2006). Инкубация клеток *C. albicans* с моноклональными IgA в течение 16 ч при 35,8°C приводила к снижению КОЕ

культуры на 79% по сравнению с контролем. За этот же период времени амфотерицин В снижал содержание живых клеток до 90%, а неспецифические антитела - лишь на 18%. Сывороточный IgA в сочетании с трансферрином или лактоферрином продемонстрировал выраженный бактериостатический эффект в отношении *E. coli* посредством ингибирующего действия специфического антитела на продукцию сидерофоров, хелатирующих железо веществами, вырабатываемыми *E. coli* (Funakoshi S, et al., 1982).

1.2. Факторы, влияющие на антимикробную активность грудного молока

1.2.1. Срок лактации

Грудное молоко способно обеспечивать защиту младенца от инфекционных патогенов не только благодаря его качественному и количественному составу компонентов, обеспечивая потребности детей первого года жизни. Изменения в составе грудного молока происходят на протяжении всего периода вскармливания, при переходе от молозива к зрелому грудному молоку и даже в течение одних суток вскармливания. Так, планомерное изменение концентраций основных белков, проявляющих антимикробную активность, происходит от момента начала вскармливания до 24 недели (Goonatilleke E. et al., 2019). При этом концентрации К-казеина, ЛФ, IgA и IgM также постепенно снижались: к-казеин и ЛФ снизились менее чем на 50%, тогда как IgA и IgM - более чем на 89%. Напротив, концентрация лизоцима увеличивалась к 24-й неделе (Goonatilleke E. et al., 2019). Кроме того, с течением периода кормления, от молозива к зрелому грудному молоку отмечается снижение дефензинов, дермцидина, гепцидина, лактопероксидазы, лактадгерина, гаптокоррина и увеличение мРНК кателицидина (Peterson J.A. et al., 1998; Murakami M. et al., 2005; Buys E.M., 2011; Aydin S. et al., 2013; Wang X.F. et al., 2014; Haschke F. et al., 2016; Ustebay S. et al., 2019).

1.2.2. Термическая обработка и сроки хранения

Термическая обработка грудного молока с последующей заморозкой является универсальным способом сохранения микробиологической безопасности молока, предупреждающим передачу большинства вирусных и бактериальных патогенов, что особенно важно при невозможности своевременного вскармливания младенца. При этом может быть использовано как молоко матери, так и донорское молоко, которое ввиду макро- и микронутриентного состава является вторым по приоритетности по сравнению с молочными смесями. Донорское грудное молоко может быть использовано для удовлетворения потребностей недоношенных и доношенных младенцев в случае невозможности прямого вскармливания по медицинским показаниям. Неоспоримая значимость грудного вскармливания в полноценном развитии новорожденного привела к заинтересованности роддомов в создании банков хранения грудного молока. В настоящее время пастеризация при 62,5 °С в течение 30 мин по методу Холдера является золотым стандартом для подготовки молока для хранения в банках грудного вскармливания ввиду оптимального соотношения качество - микробиологическая безопасность (НМБАНА. Milk Banking Guidelines, 2009). На территории Российской Федерации порядок сбора, хранения, требования к безопасности грудного молока изложены в сборнике Санитарно-эпидемиологических требований к медицинским организациям СанПиН 2.1.3.-15, раздел 4 «Правила содержания структурных подразделений акушерских стационаров и перинатальных центров», подраздел 4.5 «Порядок сбора, пастеризации, хранения грудного молока, приготовления и хранения молочных смесей». Однако, помимо обеспечения микробиологической безопасности грудного молока, термическая обработка может отрицательно сказываться на биологической ценности молока, поскольку большая часть белков денатурируется под воздействием тепла. Ряд исследований показали, что предварительная пастеризация в некоторой степени снижает активность некоторых антимикробных компонентов грудного молока (Evans T.J. et al., 1978). При нагревании образцов

грудного молока при температурах 60 °С, 62.5 °С, 65 °С, 67.5 °С, 70 °С и выше в течение 30 минут наблюдались изменения в концентрациях как антимикробных пептидов, так и иммуноглобулинов. При температуре 72°-73°С наблюдалось значительное снижение концентраций IgA, IgG, лактоферрина и лизоцима. Пастеризация при 62,5 ° С приводила к потере 23,7% лизоцима, 56,8% лактоферрина, 34% IgG, но без потери IgA. При этом на потери лизоцима влиял также и pH – наименьшие потери установлены при pH 6 (Evans T.J. et al., 1978). Отмечено снижение антибактериальной активности пастеризованного грудного молока в отношении важнейших бактериальных контаминатов грудного молока *S. aureus* и *E. coli*, играющих ключевую роль в развитии неонатальной инфекции (Van Gysel et al., 2012). Последующая инкубация пастеризованного молока при 37°С, имитирующей температуру тела, с *S. aureus* и *E. coli* показала пониженную способность пастеризованного человеческого молока сдерживать размножение бактерий. Это наблюдение *in vitro* косвенно может свидетельствовать о том, что новорожденные, вскормленные пастеризованным человеческим молоком, могут быть более восприимчивы к бактериальным инфекциям, чем вскормленные непастеризованным свежим молоком. При этом глубокая заморозка при -20°С в течение 3 месяцев не приводила к заметной потере лактоферрина, лизоцима, IgG, IgA (Evans T.J. et al., 1978). Измерение концентрации лактопероксидазы показало значительное снижение концентрации в течение 3 месяцев при температуре хранения -25°С (P <0,05) (Friend B.A. et al., 1983). Замораживание на срок до 9 месяцев при температуре -20° С не влияло на общий белок, жир, лактоферрин, секреторный IgA ни в одной из изученных групп (Ahrabi A.F. et al., 2016).

1.3. Характеристика молока различных видов млекопитающих

Протеом молока млекопитающих чрезвычайно сложен из-за наличия генетических вариантов, посттрансляционных модификаций и процессов протеолиза. Белки молока - отличный источник незаменимых аминокислот.

Кроме того, научные исследования экспериментально подтвердили другие функции и биоактивные свойства отдельных пептидов молочного белка.

Традиционно молочные белки подразделяются на три основные группы: казеины, истинно растворимые белки (сывороточные белки) и белки, связанные с мембранами глобул молочного жира (MFGMP) (Conti A. et al., 2007; Roncada P. et al., 2013; Wada, Y., Lönnerdal, B., 2014). Кроме того, в молоке млекопитающих присутствуют антимикробные пептиды - белки с низкой молекулярной массой, которые проявляют антимикробную активность против бактерий, простейших, грибов и вирусов (Li Y. et al., 2012).

АМП грудного молока представлены олиго- и полипептидами, состоящими из различного числа аминокислот (Rutherford-Markwick K.J., Moughan P.J., 2005). К ним относят такие белки, например, как - сывороточный альбумин, иммуноглобулины, лактоферрин, лактопероксидаза и прочие АМП. Содержание белковых компонентов в молоке варьирует в зависимости от породы, генетических особенностей организма, сезона, стадии лактации и корма. Главными компонентами небелковой азотной фракции являются мочевины, свободные аминокислоты, нуклеозиды, нуклеотиды и полиамины (Selvaggi M. et al, 2014).

Далее представлена краткая характеристика молока человека, коровы, козы, лошади и верблюда. Данный выбор обусловлен актуальностью применения как цельного продукта, так и его компонентов, для детей, находящихся на искусственном вскармливании, а также обогащение рациона взрослого человека. Описание молока мыши служит примером межвидового разнообразия в качественном и количественном составе молока. В Таблице 1 представлены общие биохимические показатели наряду с мажорными антимикробными факторами молока.

Коровье молоко. Содержание белка в коровьем молоке варьирует от 2,5% до 4,2%, что примерно в 1,5–2 раза выше, чем в человеческом молоке (Pastuszka

R. et al., 2016). Белки коровьего молока включают около 80% казеинов, остальную часть традиционно относят к сывороточным белкам. Казеины - фосфопротеины, к которым относят α_{s1} -, α_{s2} -, β - и κ -казеины. Сывороточные протеины - глобулярные протеины, представленные β -лактоглобулином, α -лактальбумином, бычьим сывороточным альбумином и иммуноглобулинами (Kopf-Bolan K.A. et al., 2012).

К важнейшим аллергенам коровьего молока относят β -лактоглобулин (отсутствует в человеческом молоке) и α_{s1} -казеин. Аллергия на белки коровьего молока характерна не только для младенцев, у которых ферментная система еще не развита, но и для людей в зрелом возрасте. (Pastuszka R. et al., 2016).

Козье молоко. Процентное содержание белка в козьем молоке примерно равнозначно составу коровьего молока. В козьем молоке, наряду с другими домашними жвачными животными, казеин составляет примерно 80% от общего количества белков, а сывороточные белки составляют оставшиеся 20% (Ambrosoli R., 1988). Среди казеинов в козьем молоке присутствуют α_{s1} -казеин, α_{s2} -казеин, β -казеин и κ -казеин. Белки сыворотки представлены β -лактоглобулином, α -лактальбумином, иммуноглобулинами, гликомакропептидами, сывороточным альбумином. Козье молоко отличается от коровьего молока лучшей усвояемостью, более высокими значениями pH и буферной емкости (Park Y.W., 1994).

Козье молоко в сравнении с коровьим, имеет более высокое содержание б-ти из 10-ти незаменимых аминокислот: треонина, изолейцина, лизина, цистина, тирозина, валина (Haenlein G. F. W., 2004).

Ввиду наличия полиморфизма генов, в козьем молоке одинаковое количество κ -казеина и α_{s2} -казеина, но более высокое содержание β -казеина и более низкий уровень α_{s1} -казеина по сравнению с коровьим молоком, что позволяет применять его у индивидуумов с аллергией (Clark S., Sherbon J.W., 2000; Martin P. et al., 2002).

Лошадиное молоко. Кобылье молоко по белковому составу близко к молоку человека. Общее содержание сывороточного белка в кобыльем молоке на 20% ниже, чем в коровьем молоке и на 50% больше, чем в молоке человека (Malacarne M. et al., 2002). Казеины кобыльего молока состоят из равных количеств β -казеина и α_{s1} и α_{s2} -казеина, а также γ -казеина и небольшого количества κ -казеина. Общее содержание сывороточного белка в кобыльем молоке на 20% выше, чем в коровьем молоке и схоже с содержанием в молоке человека. Кобылье молоко, наряду с молоком человека, ввиду преобладания альбуминовой фракции белков, относят к молоку альбуминового типа, молоко коровы относят к казеиновому типу. Схожесть молока лошади и молока человека по соотношению казеина и сывороточных белков служит важным критерием усвояемости, а преобладание мелкодисперсных альбуминов характеризует кобылье молоко как молоко с пониженной аллергенностью (Malacarne M. et al., 2002).

Верблюжье молоко. Белковый состав верблюжьего молока имеет ряд отличий от молока других млекопитающих. Верблюжье и коровье молоко имеют одинаковое содержание казеина (α_{s1} , α_{s2} , β и минорный κ -казеин), но различаются по содержанию сывороточных белков. Для молока верблюдов казеин является основным белком и составляет 52 ÷ 87% от общего содержания белка. Основным казеином в верблюьем молоке является β -казеин (65% от общего казеина), он выше, чем в коровьем молоке (36%). С другой стороны, в верблюьем молоке содержится меньше α_{s1} -казеина (21%) по сравнению с бычьим α_{s1} -казеином (38%) (Khaskheli M. et al., 2005).

Соотношение сывороточного протеина и казеина в верблюьем молоке выше, чем в коровьем и грудном молоке (Park Y.W., Haenlein G.F.W., 2013).

Подобно грудному молоку человека, верблюжье молоко содержит большое количество α -ЛА и практически не содержит β -ЛГ (El Hatmi H. et al., 2007).

Таблица 1 – Биохимические показатели молока млекопитающих

Млекопитающее	Жир, мг/мл	Лактоза, мг/мл	Общий белок, мг/мл	Казеин, мг/мл	Лактоферрин, мг/мл	Сывороточный альбумин, мг/мл	sIgA, мг/мл	Лизоцим, мг/мл
Человек	37 (Musaev A. et al., 2021)	67 (Ballard, O., 2013)	14,2 (Musaev A. et al., 2021)	1.92±0.72 (Donovan S. M., 2019)	1,5÷2,0 (Claeys W. L. et al., 2014)	0,4–0,5 (Claeys W. L. et al., 2014)	0,94 ÷ 1,3 (Bo Lonnerdal et al., 2017)	0,24 (Montagne P. et al., 2001)
Коза	34 (Jennes R., 1980)	44 (Nur Sofuwani ZA. et al., 2017)	37,20 (Selvaggi M. et al., 2014)	24,00 (Selvaggi M. et al., 2014)	0,02÷0,2 (Tafes A. G. et al., 2020)	0,5 (Tafes A. G. et al., 2020)	0,03÷0,08 (Park Y.W. et al., 2007)	0,25 (Chandan R.C. et al., 1968)

Продолжение Таблицы 1

Лошадь	12 (Musaev A. et al., 2021)	64 (Musaev A. et al., 2021)	21,4 (Malacarne M. et al.,2002)	10,7 (Malacarne M. et al.,2002)	0,1÷2,0 (Claeys W. L. et al., 2014)	0,37 (Claeys W. L. et al., 2014)	0,47 (Claeys W. L. et al., 2014)	0,79 (Chandan R.C. et al., 1968)
Корова	36 (Musaev A. et al., 2021)	32 (Musaev A. et al., 2021)	32,5 (Malacarne M. et al.,2002)	25,1 (Malacarne M. et al.,2002)	0,02 ÷ 0,5 (Claeys W. L. et al., 2014)	0,3–0,4 (Claeys W. L. et al., 2014)	0,05÷0,14 (Claeys, W. L. et al., , 2014)	0,13 (Chandan R.C. et al., 1968)
Верблюд	29 (Yoganandi J. et al., 2015)	37 (Yoganandi J. et al., 2015)	36,1 (Benmeziane – Derradji F. 2021)	28 (Benmeziane – Derradji F. 2021)	0,45÷0,55 (El-Hatmi H et al., ,2006)	1,5÷2,1 (El-Hatmi H et al.,2006)	Нет данных	2,88 (Barbour E.K. et al.,1984)
МЫШЬ	20,1 (Görs S. et al., 2009)	1,13 (Görs S. et al., 2009)	125 (Boumahrou N. et al., 2009)	80 (Boumahrou N. et al., 2009)	5,7 (Boumahrou N. et al., 2009)	4,8 (Boumahrou N. et al., 2009)	0,7÷1,3 (Parr EL et al., 1995)	Нет данных

1.4. Микробиом зрелого грудного молока и молозива: нормобиота и условно-патогенные микроорганизмы

1.4.1. Видовое разнообразие микроорганизмов грудного молока на разных сроках лактации - сравнение различных методов идентификации

Ранее считалось, что наличие микроорганизмов является неблагоприятным фактором, свидетельствующим о контаминации протоков молочных желез с кожи матери или из ротовой полости ребенка как результат несоблюдения гигиены или эндогенного инфекционного процесса молочной железы. На данный момент в ходе многочисленных исследований подтверждено, что в дополнение к микро-, макронутриентам и биологически активным соединениям, грудное молоко и ткани молочной железы представляют собой специфический биотоп, населенный множеством различных бактерий *per se*. Количество бактерий в грудном молоке варьирует: в среднем молоко содержит приблизительно 10^6 КОЕ/мл, являясь постоянным источником комменсальных, мутуалистических и/или потенциально пробиотических бактерий для кишечника развивающегося младенца (Voix-Amorós A. et al., 2019).

Безусловно, грудное молоко, как вещество с высоким нутритивным потенциалом может являться фактором передачи инфекционных заболеваний при наличии инфекции у роженицы, а также ввиду неправильного сбора и хранения. Однако доказана бактериологическая безопасность хранения сцеженного грудного молока в холодильнике до 48 часов (Larson E. et al., 1984).

Происхождение микробиома грудного молока представляет собой предмет многочисленных дискуссий и до сих пор находится в процессе изучения. Показано наличие так называемого энтеромаммарного пути - сложного взаимодействия между эпителиальными и иммунными клетками, осуществляющими эндогенный перенос живых бактерий из кишечника матери в молочную железу (Rodríguez J.M., 2014). Механизм включает физиологическую

транслокацию иммунных клеток, в частности, дендритных клеток и CD18 экспрессирующих клеток, фагоцитировавших бактерии из просвета кишечника и мигрировавших через брыжеечные лимфатические узлы в лактирующую молочную железу (Rescigno M. et al., 2001).

Микробиом грудного молока, являясь вторым по значимости после микробиома родовых путей, играет важную роль в колонизации кишечника новорожденных, обеспечивает выработку антимикробных соединений, препятствует адгезии патогенных бактерий к кишечному эпителию и стимулирует выработку муцина клетками кишечника (Olivares M. et al., 2006).

Среди ранних исследований по изучению микробиома грудного молока можно считать данные Gavin и Ostovar, которые выделили виды бактерий, принадлежащих к пяти семействам: *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Lactobacillaceae* и *Neisseriaceae* (Gavin A., Ostovar K., 1977).

На сегодняшний день, благодаря достижениям в области технологий секвенирования более детальный анализ грудного молока позволил лучше понять состав и разнообразие микробиома, при этом было идентифицировано более нескольких сотен родов бактерий. В систематическом обзоре 44 исследований, включивших суммарно 3105 образцов грудного молока, описано более 590 родов бактерий 1300 видов, а также выявлена грибная, архейная и вирусная ДНК. Наиболее часто встречающимися родами были *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Rothia*, *Cutibacterium*, *Veillonella* и *Bacteroides* (Collado M. C. et al., 2009; Zimmermann P, Curtis N., 2020).

В другом систематическом обзоре микробиома тканей молочной железы и молока человека были проанализированы 242 исследования, включившие более 15 489 образцов грудного молока. Было детектировано наличие более 820 видов бактерий, в основном состоящих из Proteobacteria и Firmicutes. Наиболее часто обнаруживаемыми видами были *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Cutibacterium*

acnes, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium breve*, *E. coli*, *Streptococcus sanguinis*, *Lactobacillus gasseri*, и *Salmonella enterica* (Togo A. et al, 2019).

Однако, несмотря на обилие представленных родов и видов бактерий, показано, что так называемый «core», то есть, основу микробиома грудного молока составляют роды *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* и *Propionibacterium* (Ojo-Okunola A. et al., 2018).

Различия в микробиоме молока могут быть обусловлены многими факторами, такими как питание матери, индекс массы тела, генетические особенности организма, соматический статус, использование антибиотиков во время беременности, способ родоразрешения, демографические или экологические различия (Zimmermann P, Curtis N.,2020). Так показано, что роды с помощью кесарева сечения связаны с более высокой общей концентрацией бактерий в начале лактации (дни 1–16), со значительно более высокими уровнями *Streptococcus spp.* и значительно более низкими уровнями *Bifidobacterium spp.* по сравнению с традиционными родами (Khodayar-Pardo P. et al., 2014).

Помимо этого, стоит отметить, что на изменение показателей микробиома могут влиять особенности сбора образцов, методы извлечения ДНК и методы секвенирования (Douglas C.A. et al., 2020).

1.4.2. Взаимосвязь между микробиомом грудного молока и его антимикробной активностью

Микробиом грудного молока тесно взаимосвязан с его антимикробной активностью в отношении патогенов. Присутствие в грудном молоке пробиотических микроорганизмов обуславливает механизмы действия *in vivo* – антагонизм и конкурентное исключение потенциальных патогенов, поддержание барьерной функции, взаимодействие с олигосахаридами грудного молока для усиления барьерной функции кишечника, иммуномодуляция врожденного и адаптивного иммунитета, а также проявление антимикробной активности через

продукцию метаболитов, в том числе таких как бактериоцины (Vaugher J.L., Klaenhammer T.R., 2011).

Так, культуральным методом была показана антимикробная активность 4 изолятов лактобактерий *Lactobacillus salivarius* СЕСТ5713, *Lactobacillus gasseri* СЕСТ5714, *L. gasseri* СЕСТ5715, *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716 в отношении *S. Choleraesuis* (Olivares M. et al., 2006)

Ингибирующая активность представителей нормобиоты грудного молока была исследована по отношению к *S. aureus* - одному из потенциальных этиологических агентов в развитии мастита у лактирующих женщин (Semba et al., 1999). В другом схожем исследовании была показана бактерицидная активность комменсалов *L. lactis*, *L. mesenteroides*, *L. rhamnosus*, *E. faecalis*, *S. salivarius*, и *S. epidermidis* по отношению к *S. aureus* (Heikkilä M.P., Saris P.E., 2003).

И наконец, потенциал пробиотических штаммов *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus salivarius*, полученных из человеческого молока, был показан в лечении мастита у 352 женщин. Сообщалось о большем снижении количества бактерий *S. epidermidis*, *S. aureus* и *S. mitis*, а также о значительном снижении боли в группе, получавшей пробиотики, по сравнению с контрольной группой, получавшей антибиотики (Arroyo R. et al., 2010).

1.5. Методы, используемые для оценки антимикробной активности грудного молока

Для оценки антимикробной активности как цельного грудного молока, так и его отдельных компонентов на сегодняшний день используют традиционные методы посевов (Trend S. et al., 2015), которые также используют для изучения действия отдельных антимикробных пептидов (АМП) молока (Lu J. et al., 2021). При использовании метода посевов было продемонстрировано снижение КОЕ *S. albicans* в 1,5 - 5 раз по сравнению с контролем, не содержащим молока, в

результате постепенного повышение концентрации грудного молока в плотной среде от 0,05% до 10% (Andersson Y. et al., 2000).

Так, в одном из подобных исследований антимикробное действие очищенного препарата лактоферрина женского грудного молока оценивали путём микроразведений в 96-луночном планшете с последующем высевом на плотные питательные среды с модельными микробами. С помощью сканирующей электронной микроскопии высокого разрешения дополнительно подтверждали воздействие лактоферрина на биопленки (Lu J. et al., 2021).

Ранее был разработан метод определения совокупной антимикробной активности в биологических жидкостях с помощью метода спектрофотометрии (Патент № 2602298)

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

Одним из ключевых звеньев иммунной защиты младенца являются антимикробные пептиды молока матери. Обладая специфическими противомикробными свойствами в отношении широкого спектра патогенов, они компенсируют незрелость иммунной системы младенца.

На концентрации защитных полипептидов грудного молока влияют как сроки лактации, так и этническое происхождение, регион проживания, особенности питания, наличие сопутствующих патологий со стороны организма матери, включая раннее родоразрешение. Так, при переходе от молозива к зрелому молоку отмечается снижение содержания как высокомолекулярного белка казеина, так и концентраций большинства антимикробных пептидов - лактоферрина, дефензинов, гепцидина, дермцидина, а также лактадгерина и полипептидов – иммуноглобулинов. При этом имеет место возрастание концентрации лизоцима, что может быть обусловлено микробной нагрузкой со стороны условно-патогенной флоры молочной железы матери.

При этом важно отметить, что несмотря на снижение ряда иммунных факторов, объемы потребляемого молока на килограмм веса ребенка с периодом кормления возрастают, компенсируя качественный и количественный состав компонентов грудного молока.

При невозможности осуществления прямого вскармливания ребенка матерью особо остро стоит вопрос создания донорских банков грудного молока. Поэтому особенно важно оценивать сохранность иммунных факторов, в частности антимикробных полипептидов при пастеризации, заморозке и хранении.

Противоречивость данных в ряде исследований по влиянию температуры и времени на хранение образцов грудного молока может быть связана с тем, что замораживание при чрезвычайно низких температурах (-80°C) может повлиять на иммунные белки в грудном молоке во время процессов охлаждения и оттаивания из-за степени денатурации белка, вызванной воздействием

изменения температуры посредством протеолиза, рефолдинга или перекристаллизации (Slutzah M. et al., 2010).

Пастеризация при 62,5 °С в течение 30 мин по методу Холдера является золотым стандартом для подготовки молока для хранения в банках грудного вскармливания ввиду оптимального соотношения качество - микробиологическая безопасность (НМВАНА. Milk Banking Guidelines, 2009).

При сравнении молока человека с молоком млекопитающих обнаруживается значительная разница в концентрационных соотношениях как белковых компонентов, так и антимикробных пептидов. Ввиду этого сравнение иммунологической полноценности молока с точки зрения содержания антимикробных пептидов представляет сложный вопрос, особенно учитывая их полифункциональное взаимодействие друг с другом. И несомненно, в молоке присутствует очень важная составляющая - микробиом грудного молока, который позволяет ребенку проходить постепенную адаптацию к патогенам. С момента, как грудное молоко считалось стерильным субстратом, проведено немало исследований как традиционными, так и молекулярными методами, и показано наличие свыше тысячи видов бактерий, грибов и вирусов, встречающихся в грудном молоке (Ruiz L. et al., 2019; Consales A. et al., 2022).

Однако есть мнение, что обнаружение в этой биожидкости многих видов типичных обитателей воды и почвы может быть связано с их наличием в используемых для анализа реагентах, растворах и наборах. Показано, однако, что так называемый «core», то есть, основу микробиома грудного молока составляют роды *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* и *Propionibacterium* (Ojo-Okunola A. et al., 2018), а по обилию и видовому разнообразию первые два значительно превосходят остальные роды (Hunt K.M. et al., 2011).

До сих пор не проводились комплексные исследования по изучению взаимосвязи между спектрофотометрически определенной антимикробной активностью грудного молока на разных периодах лактации с влиянием

физических факторов, содержанием мажорных АМП, sIgA, а также взаимосвязью с микробиомом.

В связи с вышеизложенным исследование взаимосвязи между антимикробной активностью сыворотки грудного молока с биологическими, микробиологическими и иммунологическими показателями на разных сроках лактации является весьма актуальным вопросом.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты

Молоко млекопитающих. Грудное молоко человека получено от здоровых кормящих матерей, являющихся пациентами ФГБУ НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова Минздрава России и от здоровых доноров на основании информированного добровольного согласия, на разных сроках лактации. Сбор молока (15-20 мл) производили путем сцеживания в стерильные емкости после предварительной тщательной обработки груди мыльным раствором. Верблюжье молоко получали в виде пула замороженного материала, полученного от здоровых самок путем доения («Таууiba Farms», Египт). Зрелое молоко лошадей собирали от здоровых кобыл разных пород путём доения (ВНИИ Коневодства, Россия). Зрелое коровье и козье молоко получали от здоровых коров и здоровых коз путём доения (частное хозяйство, Россия). Зрелое молоко мышей собирали от здоровых особей аутбредных лабораторных мышей ICR (CD-1) после предварительного введения окситоцина и последующего сбора с помощью перистальтического насоса PD 5201, Heidolph (Институт биологии гена РАН, Россия). Свежие образцы молока замораживали через 1,5 часа после получения и хранили при -25°C не более 1 месяца до момента получения сывороток.

Сыворотки. В день получения сыворотки грудное молоко предварительно размораживали. Сыворотку получали путем центрифугирования аликвот грудного молока со скоростью 16000 об/мин в течение 5 минут. Далее отбирали нижнюю фракцию, не содержащую жиров, и добавляли к ней раствор 20% лимонной кислоты из расчета 0,08 мл на 4 мл образца. Смесь выдерживали 10 мин при комнатной температуре, затем подвергали повторному центрифугированию со скоростью 16000 об/мин в течение 10 минут. После центрифугирования удаляли

осадок казеина, а супернатант (сыворотку) использовали для дальнейших исследований (Богатова О. В., Догаева Н.Г., 2002).

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

Полипептидные препараты. Очищенные препараты лактоферрина, лактальбумина и лактопероксидазы получены 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).

2.2. Микробиологические методы

Питательные среды и культивирование. Штамм *Candida albicans* № 927 выращивали на плотной глюкозо-пептон-дрожжевой среде (ГПД). Среду №10 ГРМ с добавлением яичного желтка использовали для выделения *S.aureus* (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия); агар Эндо-ГРМ - для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия); среду Сабуро - для выделения грибов (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия); питательный агар ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) и ГРМ-агар с добавлением 5% стерильной дефибринированной лошадиной крови (ЗАО «Эколаб», Россия); UriSelect 4 - для выделения уропатогенных бактерий (Bio-Rad, Франция). Посевы инкубировали 1–2 суток при температуре 37°C в аэробных условиях.

Для оценки антимикробной активности сыворотки методом посевов аликвоту суспензии 19-ти часовой культуры *Candida albicans* № 927 (конечная плотность 10^5 КОЕ/мл) соединяли с 450 мкл сыворотки и 450 мкл физраствора

(опыт) или 900 мкл физраствора (контроль) во флаконах объемом 8 мл. Флаконы инкубировали в течение заданного времени при 32⁰ С при перемешивании, после чего из каждого флакона отсевали аликвоты по 10 мкл на чашки Петри, содержащие среду ГПД. Посевы инкубировали в течение 24 часов при 32⁰ С до появления колоний.

2.3. Биохимические и биофизические методы

2.3.1. Спектрофотометрический метод

Для определения общей антимикробной активности и АМП активности с молекулярной массой менее 100 кДа методом спектрофотометрии был адаптирован ранее разработанный метод исследования сыворотки крови (Арзуманян В.Г., 2019 патент). Общую антимикробную активность сыворотки молока определяли следующим образом: к 300 мкл цельной сыворотки добавляли 50 мкл суспензии дрожжей *C. albicans* № 927, предварительно полученных культивированием на среде Сабуро в течение 20 часов при температуре 25⁰ С и суспендированных в физрастворе из расчета 1 петля 1 мм на 50 мкл физраствора. В качестве контроля 50 мкл смеси соединяли с 300 мкл физраствора. После этого полученные смеси инкубировали в течение 2х часов при температуре 32⁰ С на шейкере, центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин. По окончании центрифугирования из пробирки Эппендорф аккуратно удаляли супернатант, а к оставшемуся клеточному осадку добавляли 300 мкл раствора бромкрезолового пурпурного в фосфатном буфере рН 4,6 с целью окрашивания клеток с поврежденной мембраной и клеточного дебриса. Полученную смесь суспендировали и инкубировали 45 мин при температуре 32⁰ С на шейкере. После инкубирования смесь центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин, а супернатанты - по 250 мкл – собирали в отдельную пробирку для каждой пробы, перемешивали и оттуда вносили по 50 мкл в заранее подготовленные пробирки, содержащие по

2,5 мл фосфатного буфера pH 4,6; полученные растворы перемешивали и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре («Genesys 10S UV-VIS», США) при длине волны 440 нм в кюветах 1 см; из трех измерений для каждой пробы вычисляли среднее значение оптической плотности, затем производили расчет по формуле:

$A = (OP_{\text{контр.}} - OP_{\text{опыт.}}) * 100 / OP_{\text{контр.}}$, где:

A - противомикробная активность цельной сыворотки или её фракции, выраженная в процентах.

$OP_{\text{контр.}}$ - оптическая плотность смеси из контрольной пробирки;

$OP_{\text{опыт.}}$ - оптическая плотность смеси из опытной пробирки;

2.3.2. Фракционирование сывороток

Фракционирование сывороток, содержащих антимикробные пептиды, проводили с использованием фильтрующих насадок с размером пор 3, 10, 30 и 100 кДа («Amicon Ultra-0,5», Millipore, Merck), а их активность определяли тем же методом. Мышиную сыворотку разбавляли физраствором в 4 раза для получения величин активности, укладывающихся в диапазон, не превышающий 90%, а полученные значения умножали на 4. 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.

2.3.3. Пастеризация, лиофилизация и диализ

Пастеризацию образцов проводили при температуре 62.5 °С в течение 30 минут. Лيوфилизацию 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 $4\div 6^{\circ}\text{C}$.

2.3.4. Микроскопия

Микроскопию окрашенных осадков клеток после действия фракции ниже 100 кДа проводили при суммарном увеличении 1750 (МБИ-6 «ЛОМО», Россия), фотографировали цифровой камерой «Sony» (Япония), после чего подсчитывали процент убитых клеток, окрашенных бромкрезоловым в желтый цвет, по отношению к контролю.

2.3.5. Колориметрический метод

Концентрацию альбумина в образцах определяли с помощью тест-системы «Альбумин Абрис+» (ООО «НПФ» «Абрис», Санкт-Петербург). Метод основан на образовании окрашенных комплексных соединений при взаимодействии альбумина с бромкрезоловым зеленым в слабокислой среде в присутствии детергента. К 10 мкл сыворотки добавляли 2 мл реактива, выдерживали 10 мин при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность при длине волны 628 нм. Для оценки низких концентраций альбумина контрольный раствор разбавляли в 10 раз.

2.3.6. Электрофорез в ПААГ

Вертикальный SDS-электрофорез фракций сывороток выполняли по общепринятому протоколу (Laemmli U., 1970) с использованием стандартного набора оборудования, выпускаемого фирмой LKB – Pharmacia, Швеция; Multitemp II 2219; Power supply 2002; Vertical electrophoresis unit 2001; Slab Gel

dryer 2003. Электрофорез проводили в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) в неденатурирующих условиях. Образец очищенного лактоферрина, полученный из грудного молока человека методом ионообменной хроматографии («Лактобио», Москва), использовали в концентрации 1 мг/мл. Образцы низкомолекулярных фракций сыворотки молока человека, козы и мыши использовали без разведения. Объем образцов, вносимый в лунку, составлял 40 мкл. Калибратором молекулярных масс служила смесь белков («PageRuler Unstained Protein Ladder», Thermo Scientific) с молекулярной массой 10–200 кДа.

2.3.7. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Для анализа чистоты полученного препарата лактоферрина человека использовали систему для ВЭЖХ (Agilent 1100, УФ/ВИД детектор, обратная фаза колонка Symmetry C4 300A компании Waters) на базе компании «Лактобио», Россия.

2.3.8. MALDI-TOF MS

Идентификацию чистых культур микроорганизмов проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии на приборе «MALDI Biotyper Sirius RUO System» («Bruker», США). Для этого одну изолированную колонию свежей чистой культуры микроорганизмов наносили одноразовой микробиологической петлей на лунку мишени специальной пластины (MSP-чипа). Сразу после высыхания биомассы мишени обрабатывали 1-2 мкл 70% муравьиной кислоты для экстракции микробных белков. Далее на мишени наносили 1–2 мкл матрицы (альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты в водном растворе ацетонитрила и трифторуксусной кислоты) для ионизации микробных пептидов, после чего пластину помещали в прибор и проводили идентификацию. Результат

идентификации считали достоверным, если коэффициент соответствия с базой данных (Score) был больше или равен 2.0.

2.3.9. Хромато-масс-спектрометрический и ВЭЖХ-МС/МС анализ низкомолекулярной фракции сыворотки

Анализ проведён на базе Центра коллективного пользования “Передовой масс-спектрометрии” Сколковского института науки и технологий. Для анализа использовали систему ВЭЖХ Waters Acquity UPLC (Thermo Scientific), последовательно соединённую с двухканальным UV-детектором и масс-спектрометрическим детектором Q-Exactive HF-X (Thermo Scientific) с электроспрейным источником ионизации. Для хроматографического разделения использовали колонку Waters Acquity UPLC BEH C8, 1,7 мкм, 2,1 x 100 мм с предколонкой Waters Acquity UPLC BEH C8 VanGuard 1,7 мкм 2,1 x 5 мм. Использовали следующие материалы и реагенты: вода (очищена в системе Milli-Q Integral 3), ацетонитрил (Fisher Scientific). Общая длительность анализа составляла 120 мин. Пробоподготовку проводили согласно принятому протоколу. Объем наносимой пробы 2 мкл. Температура колонки: 45°C. Параметры UV-детектирования пептидов: поглощение на длине волны 214 и 280 нм. Для масс-спектрометрического анализа установлены следующие параметры настроек: напряжение на эмиттере 4.5 кВ, температура капилляра 320°C. Полученные спектры визуализированы в программе Xcalibur QualBrowser (Thermo Scientific). Дополнительно был однократно проанализирован исходный образец фильтрата молока, смешанный с 0,2% муравьиной кислотой в воде (1:1) при аналогичных условиях ВЭЖХ-МС/МС, для тандемного сканирования учитывали ионы $z = 2+$, $3+$, $4+$.

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.

2.4. Иммунологические методы

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

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

2.5. Методы статистической обработки

Статистический анализ полученных данных производили с помощью пакета программ Microsoft Excel 2019. Для оценки достоверности различия выборок применяли критерий Манна-Уитни (Математические методы обработки данных, онлайн расчет).

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Применение спектрофотометрического метода для определения противомикробной активности сывороток грудного молока

3.1.1. Сравнение спектрофотометрического метода определения антимикробной активности сыворотки грудного молока с традиционными методами

На пуловом образце зрелого грудного молока провели исследование активности сыворотки тремя упомянутыми методами в трех повторах каждый: методом посевов (Рисунок 1), методом микроскопии (Рисунок 2) и спектрофотометрическим методом (Рисунок 3).

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.

Исследование влияния сыворотки грудного молока на клетки *C. albicans* методами спектрофотометрии и микроскопии проводили в рамках одного эксперимента в трех независимых повторах. Опыты проводили по описанной методике (см. Главу 2, пп. 2.3.1.), причем клетки для микроскопии отбирали на этапе окрашивания. Результаты микроскопии (Рисунок 2) показали, что при инкубации суспензии в течение 2 ч с физраствором (контроль) часть клеток окрашивалась в жёлтый цвет, т.е. в популяции изначально присутствовали клетки с нарушенной цитоплазматической мембраной. Однако инкубация суспензии с сывороткой приводила к разрушению как мембран, так и клеточных стенок мертвых и живых клеток с образованием везикулярного дебриса, который также поглощал краситель из среды. Инкубация клеток с фракцией сыворотки ниже 100 кДа (см. материалы и методы) также показала наличие антимикробной активности (Рисунок 2В), причем отсутствие дебриса в данном случае сделало

возможным подсчет процента убитых клеток по сравнению с контролем – он составил 32,9%. Результаты по спектрофотометрическому методу из тех же экспериментов приведены на Рисунке 3. В рамках той же серии опытов проведена оценка дозозависимого эффекта цельной сыворотки грудного молока. Метод спектрофотометрии показал наличие данной зависимости при воздействии сыворотки грудного молока на клетки *S. albicans* (Рисунок 4): повышение объема сыворотки по отношению к объему суспензии клеток в 6 раз приводило к увеличению цитотоксической активности в 4,5 раза.

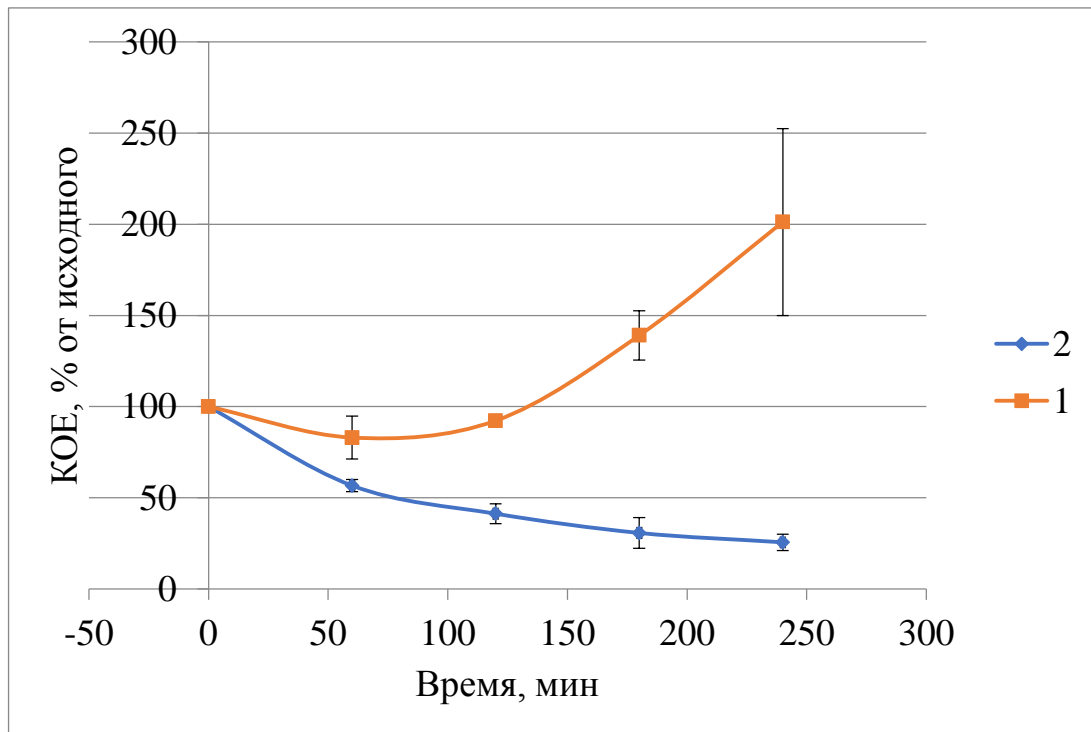


Рисунок 1 – Влияние сыворотки грудного молока на жизнеспособность клеток *S. albicans*, оцененное методом посевов

- 1 - контроль – инкубация в среде с добавлением физраствора;
- 2 - опыт – инкубация клеток в среде с добавлением сыворотки

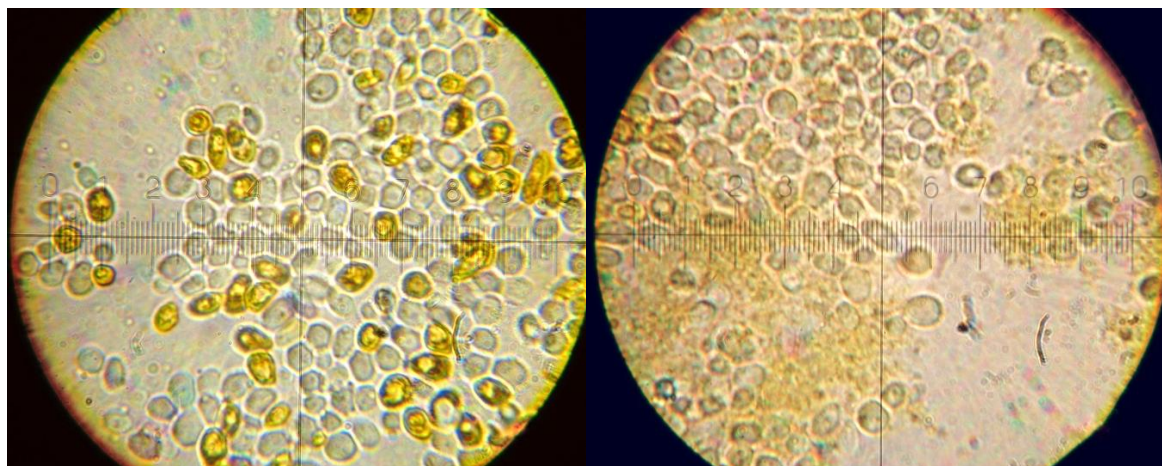
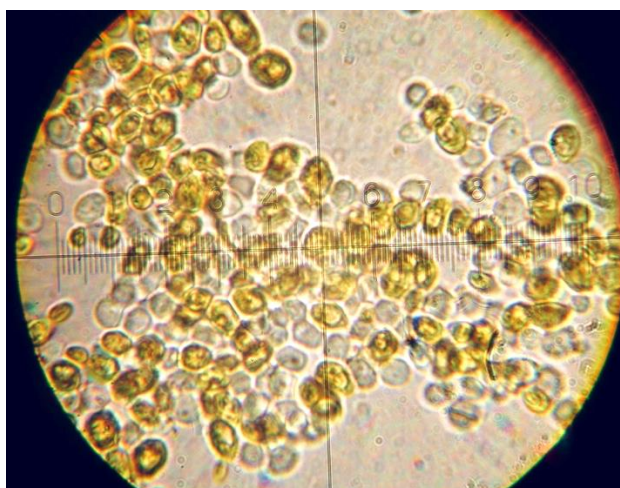
**А****Б****В**

Рисунок 2 – Микроскопия клеток *C. albicans* (увеличение микроскопа $\times 1750$): 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, неокрашенные – живые

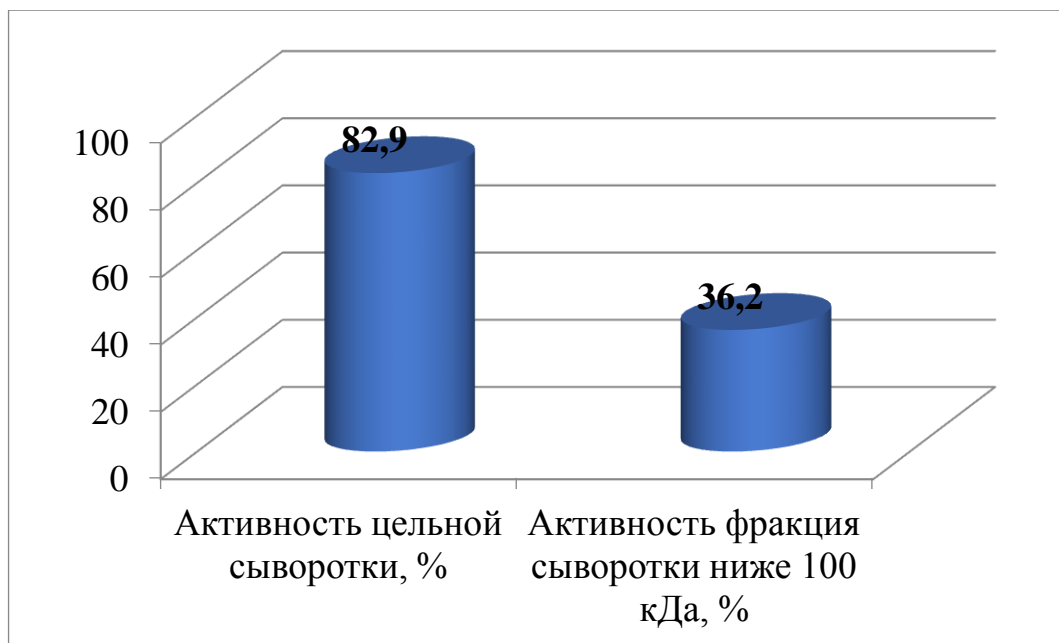


Рисунок 3 – Сравнение данных по активности цельной сыворотки и её фракции ниже 100 кДа, полученных методом спектрофотометрии (медианы)

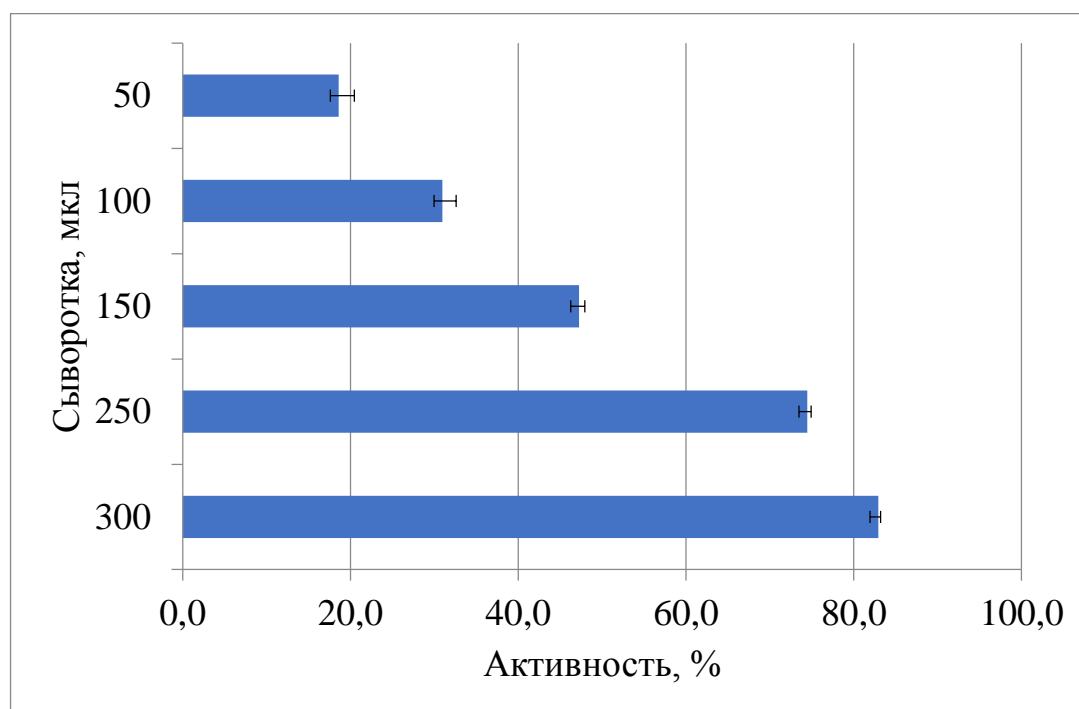


Рисунок 4 – Дозозависимое действие сыворотки грудного молока на клетки *S. albicans*, оцененное методом спектрофотометрии

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.

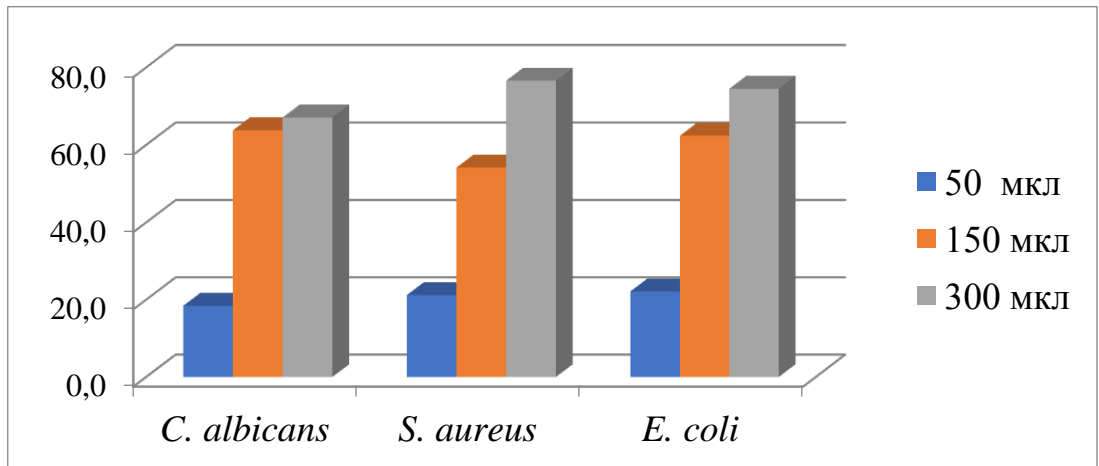
3.1.2. Исследование общей противомикробной активности сыворотки и её фракций ниже 100 кДа сывороток на культурах *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*

На пуловом образце зрелого грудного молока проводили сравнение активности цельной сыворотки и её фракции ниже 100 кДа по отношению к культурам клеток *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* (Рисунок 5). В отношении всех используемых культур выявлен дозозависимый эффект как при применении цельной фракции сыворотки молока (Рисунок 5А), так и её фракции сыворотки ниже 100 кДа (Рисунок 5Б).

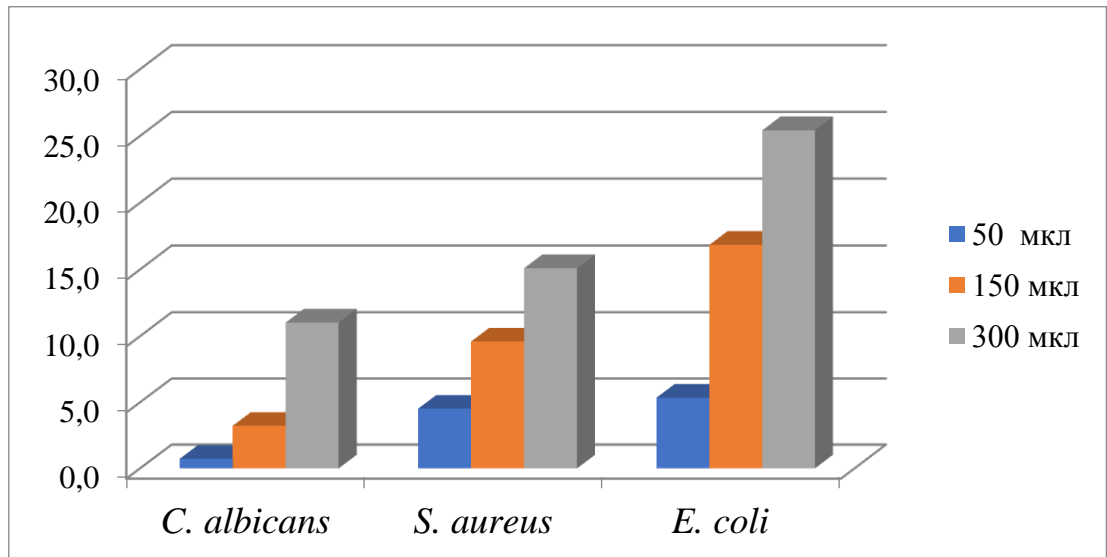
Сравнение активности образцов, обработанных 300 мкл цельной сыворотки, показало, что активность по отношению к клеткам *C. albicans* была достоверно ниже, чем по отношению к клеткам *S. aureus* и *E. coli* ($p \leq 0,01$). В то же время в случае использования фракции ниже 100 кДа активность по отношению к *E. coli* значительно превышала таковую по отношению к *S. aureus* ($p \leq 0,01$), а активность по отношению к *S. aureus* была значимо выше таковой по отношению к *C. albicans* ($p \leq 0,01$).

Следует отметить, что использование метода световой микроскопии в опытах на бактериях не дает возможности проведения качественной визуализации результатов. Таким образом, сравнение метода спектрофотометрии с традиционным методом посевов и микроскопии для оценки противомикробной активности сыворотки грудного молока показало, что методы микроскопии и спектрофотометрии дают не только сравнимые результаты, но и позволяют более быстро, просто и достаточно точно определить антимикробную активность

сыворотки. На основании полученных данных для дальнейших исследований в качестве микробной модели были выбраны дрожжи *C. albicans*, поскольку они являются удобным объектом не только для количественной оценки антимикробного действия цельной сыворотки и её низкомолекулярной фракции, но и для визуализации полученных результатов методом микроскопии.



А



Б

Рисунок 5 – Действие сыворотки грудного молока на клетки *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli*: А - антимикробная активность цельной сыворотки; Б - антимикробная активность фракции сыворотки ниже 100 кДа (медианы)

3.2. Изучение взаимосвязи антимикробной активности сыворотки грудного молока с её основными противомикробными компонентами

3.2.1. 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.

Антимикробную активность цельной сыворотки и её фракции ниже 100 кДа, содержащей комплекс АМП, определяли методом описанным ранее (см. Главу 2, пп.2.3.1.).

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 2).

Из данных, приведенных в таблице видно, 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. Корреляции между возрастом матери с активностью установлено не было.

Таблица 2 – Взаимосвязь биологических и иммунологических показателей сыворотки грудного молока.

Человек в группе, N	Период лактации	Период лактации, месяцы (медиана)	Возраст матери, лет (медиана)	Активность сыворотки общая, % (медиана)	Активность фракции ниже 100 кДа, % (медиана)	Лактоферрин, мг/мл (медиана)	Альбумин сывороточный, 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
Значимость различий между 1 и 5 группами	-	$p \leq 0,01$	$p > 0,05$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$

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.

При оценке содержания лактоферрина в изучаемых образцах сыворотки (Таблица 2) было установлено, что наиболее высокие концентрации обнаруживались в образцах молозива, 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 значимо снижалась по мере увеличения периода лактации, коррелируя с активностью сыворотки (Таблица 2). 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.

3.2.2. Расчет продукции и потребления лактоферрина, лизоцима, сывороточного альбумина и sIgA молозива и зрелого молока

В процессе грудного вскармливания меняются не только концентрации его антимикробных компонентов, но и объем продуцируемого молока. Для оценки количественных показателей потребления основных антимикробных компонентов грудного молока проводили расчет, учитывающий средний объем молока в сутки, средний вес младенца и вышеуказанные данные по концентрациям лактоферрина, лизоцима, сывороточного альбумина и sIgA.

Концентрацию лизоцима в сыворотке грудного молока в данном исследовании не определяли, поэтому для определения количества потребления лизоцима младенцем в сутки пользовались литературными данными (Montagne P. et al., 2001).

Показано, что на протяжении периода лактации концентрация лизоцима изменялась от 0,32 мг/мл в молозиве до 0,85 мг/мл через год от момента начала лактации. Полученные расчетные значения продукции и потребления основных противомикробных компонентов молозива и зрелого молока указаны в Таблице 3.

Таблица 3 – Экспериментальные и расчетные данные по продукции и потреблению лактоферрина, лизоцима, сывороточного альбумина и sIgA на первые сутки и через 12 месяцев от начала лактации

	Средний объем в сутки, мл ^{**}	Средний вес ребенка, кг ^{**}	Лактоферрин		Лизоцим		Сывороточный альбумин		Секреторный иммуноглобулин класса А	
			Макс. конц-я, мг/мл	Макс. потреблен ие, мг/кг×сут	Макс. конц-я, мг/мл ^{**}	Макс. потреблен ие, мг/кг×сут	Макс. конц- я, мг/мл	Макс. потреблен ие, мг/кг×сут	Макс. конц- я, мг/мл	Макс. потреблен ие, мг/кг×сут
Молозиво (1 ^е сут.)	10	3	10,8	36	0,32	1,1	8,8	29	6,8	22,7
Зрелое молоко (12 мес.)	650	10	1,0	65	0,85	55,3	4,7	305	2,0	130,0
Кратность увеличения за 12 мес.			-	1,8	-	50,3	-	10,5	-	5,7

** - приведены данные из литературных источников

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

Действие очищенных препаратов лактоферрина, лизоцима, лактопероксидазы и лактальбумина оценивали в отношении культур *S. aureus* Wood 46, *E. coli* М 17, и *C. albicans* № 927. Методика определения антимикробной активности аналогична описанной в Главе 2, пп. 2.3.1. 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 (Таблица 4). Отсутствие активности ЛА было подтверждено и методом микроскопии – число мертвых клеток в препарате, обработанном ЛА, было одинаковым с контрольным препаратом. Из таблицы видно, что в низких концентрациях наиболее активной против дрожжей была ЛП, а против бактерий – ЛЦ; тогда как в высоких концентрациях – лидером оказался ЛЦ для всех видов микроорганизмов. Далее исследовали сочетанное действие трех препаратов – ЛФ, ЛП и ЛЦ. Сравнение действия АМП, объединенных попарно, приведено на Рисунке 6. Расчетные величины активности парных препаратов получали путем сложения величин активностей монопрепаратов. 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 - 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.

Таблица 4 – Взаимосвязь между концентрацией полипептидов и их антимикробной активностью, оцененной спектрофотометрическим методом, по отношению к разным видам микроорганизмов

Полипептиды	Микроорганизмы	Антимикробная активность разных концентраций полипептидов, % (ср.знач. \pm ср.откл.)			
		2,5 мг/мл	5 мг/мл	10 мг/мл	20 мг/мл
Лактоферрин	<i>C. albicans</i>	6,8 \pm 1,2	11,4 \pm 0,2	26,7 \pm 0,7	37,7 \pm 0,6
	<i>S. aureus</i>	6,2 \pm 0,8	13,2 \pm 2,4	27,5 \pm 0,4	32,5 \pm 2,4
	<i>E. coli</i>	4,6 \pm 0,3	14,4 \pm 0,3	27,0 \pm 2,6	39,5 \pm 1,2
Лактопероксидаза	<i>C. albicans</i>	12,9 \pm 0,4	14,7 \pm 0,9	25,7 \pm 1,6	38,9 \pm 0,8
	<i>S. aureus</i>	1,0 \pm 0,6	6,3 \pm 1,8	19,7 \pm 1,0	23,8 \pm 1,0
	<i>E. coli</i>	6,3 \pm 2,5	9,6 \pm 0,8	24,6 \pm 0,4	24,8 \pm 0,6
Лизоцим	<i>C. albicans</i>	5,3 \pm 0,8	19,4 \pm 0,8	23,0 \pm 0,5	62,4 \pm 0,1
	<i>S. aureus</i>	17,9 \pm 0,5	36,7 \pm 1,3	41,6 \pm 1,2	56,6 \pm 1,8
	<i>E. coli</i>	12,7 \pm 0,6	28,6 \pm 0,1	31,6 \pm 0,2	62,4 \pm 0,5

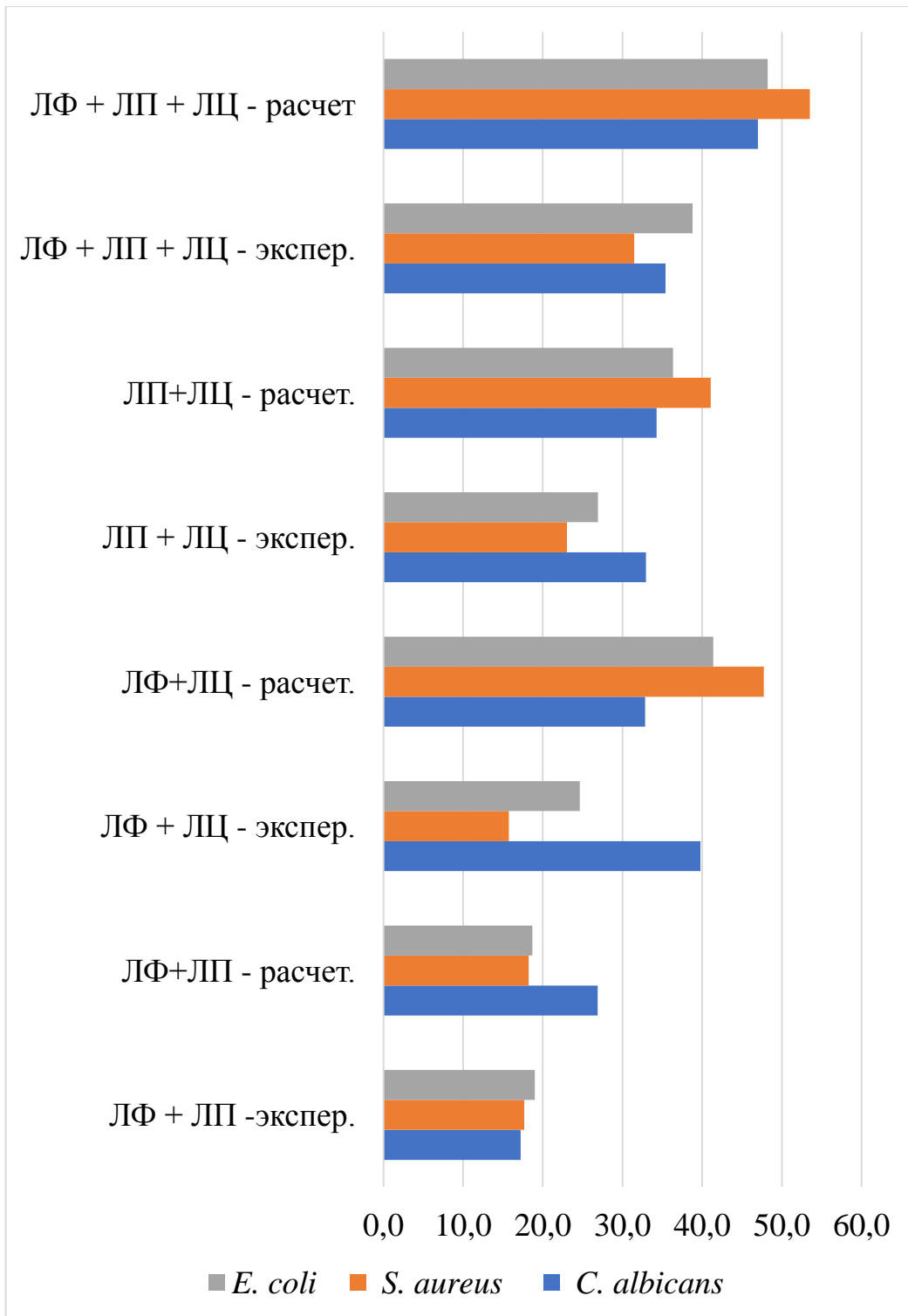


Рисунок 6 – Сравнение экспериментальных и расчетных значений микробицидной активности лактоферрина (ЛФ), лизоцима (ЛЦ) и лактопероксидазы (ЛП) при их сочетанном действии на микроорганизмы

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

Поскольку ранее определены концентрации антимикробных компонентов грудного молока (см. пп.3.2.1) и их активность в отношении культуры клеток *C. albicans* также установлена (см. пп.3.2.3), то представляется возможным проведение оценки вклада этих полипептидов в общую антимикробную активность сыворотки грудного молока.

На Рисунке 7 представлены величины активности чистых препаратов АМП и иммуноглобулина А в сранении с общей активностью сыворотки молозива и зрелого молока.

Активность чистого препарата IgA определяли для двух концентраций, максимально детектированных в молозиве (6,8 мг/мл) (Рисунок 7) 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 оказывает прямое микробицидное действие на клетки *C. albicans*, которое проявляется в разрушении клеточных стенок и мембран этих дрожжей, наблюдаемом через 2 часа от начала эксперимента. Результаты микроскопии представлены на Рисунке 8.

Сумма 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 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 иммуноглобулин А.

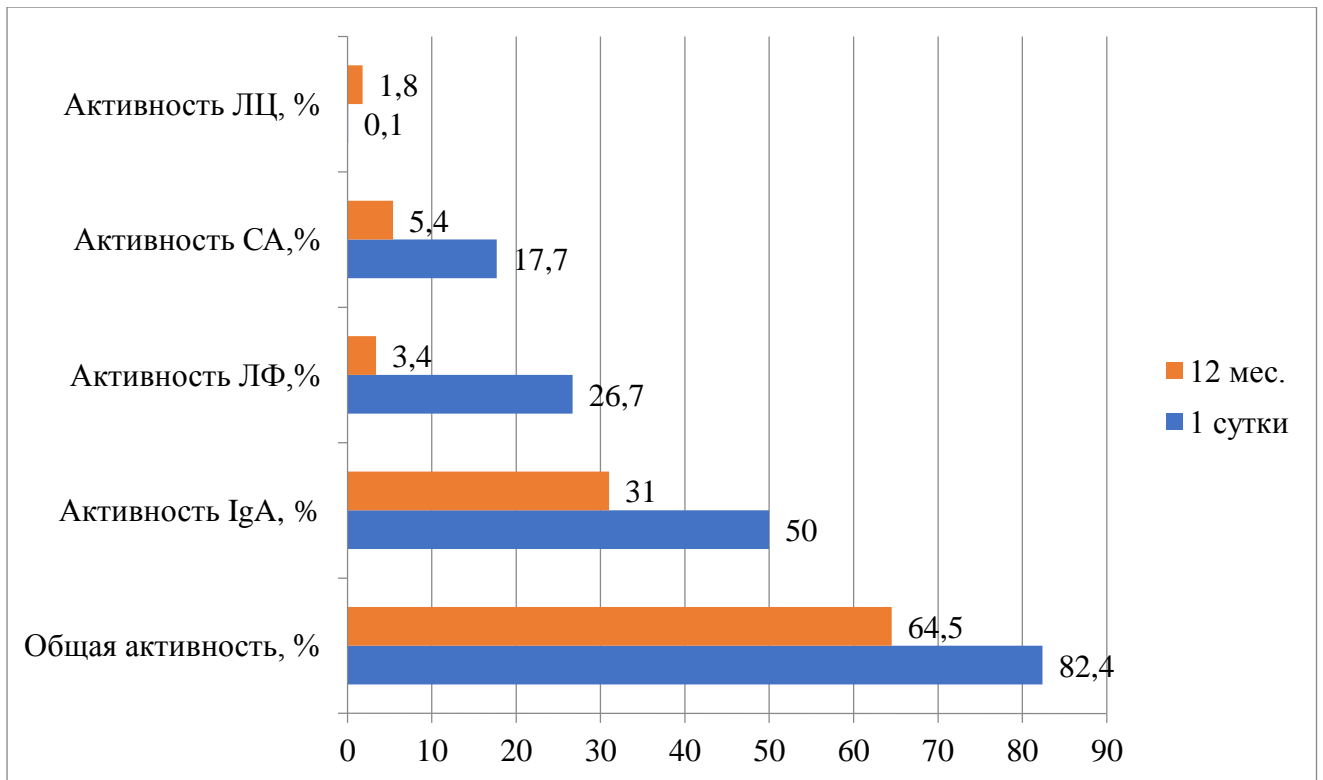
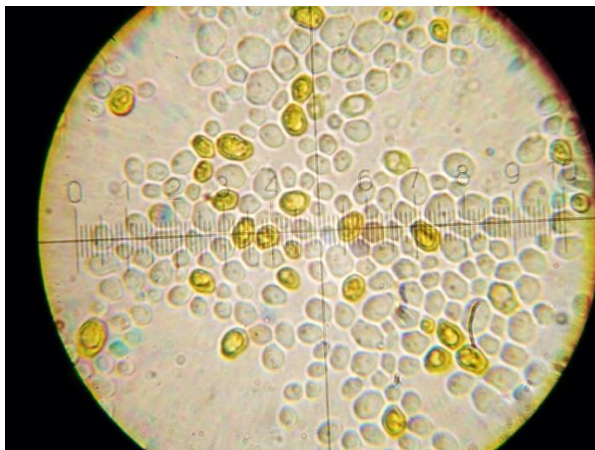
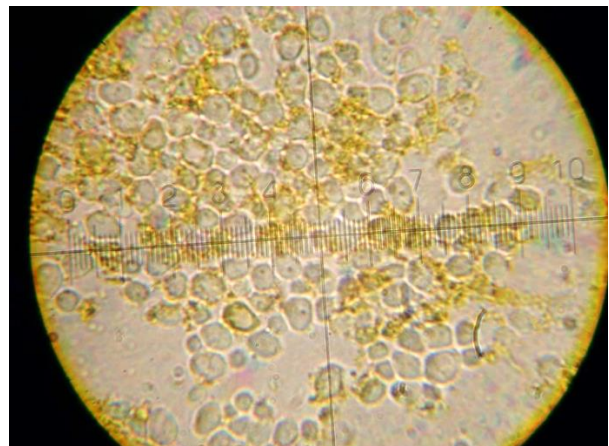


Рисунок 7 – Вклад лактоферрина, сывороточного альбумина, лизоцима и IgA в антимикробную активность сыворотки грудного молока в первые сутки и через 12 месяцев после начала лактации



А



Б

Рисунок 8 – Действие поликлонального препарата иммуноглобулина класса А на культуру *C. albicans*: А – контрольный образец (физиаствор); Б – очищенный препарат IgA (6,8 мг/мл)

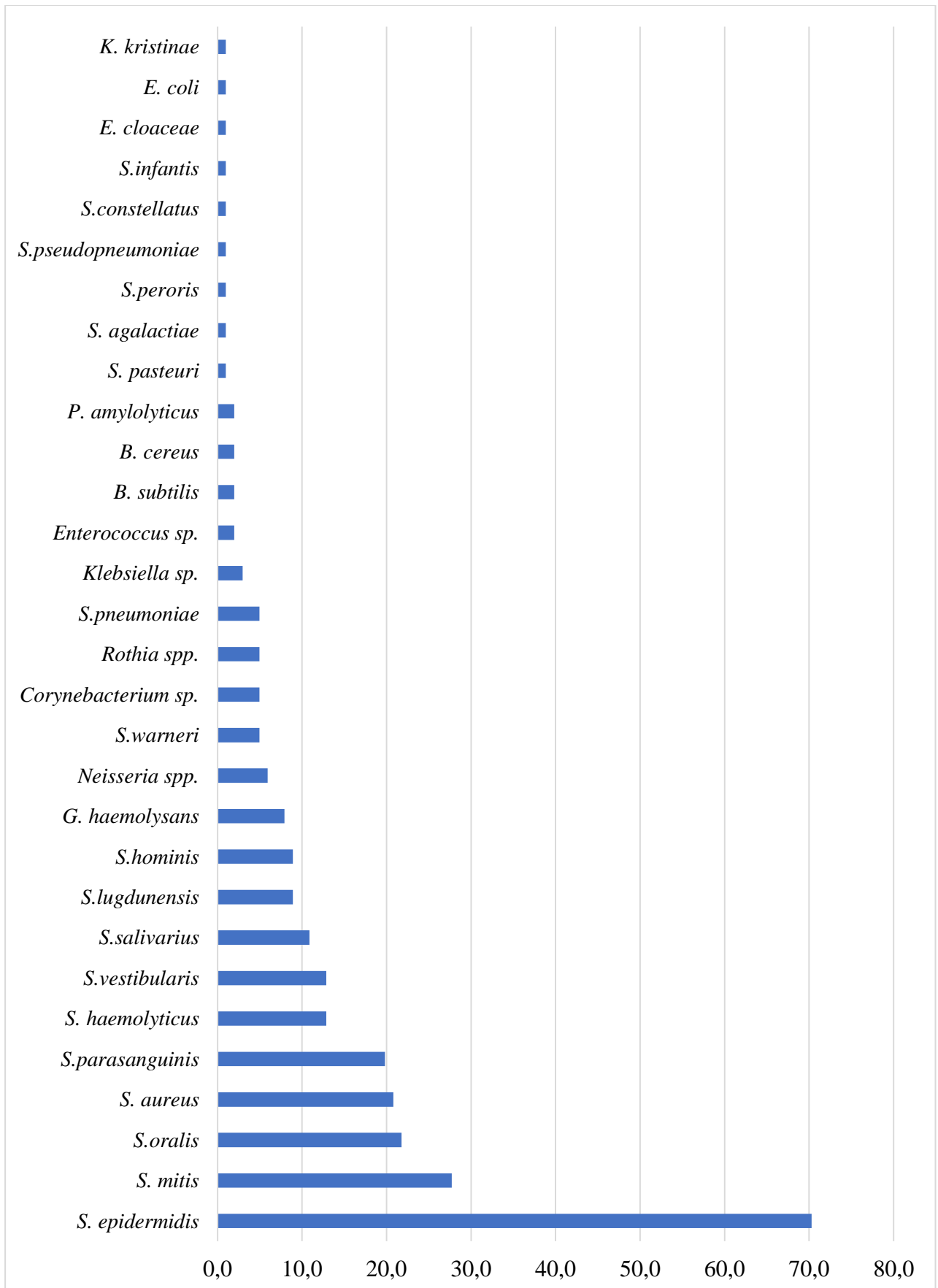
3.3. Изучение взаимосвязи между наличием основных групп условно-патогенных микроорганизмов, антимикробной активностью и периодом лактации

3.3.1. Оценка видового разнообразия условно-патогенных микроорганизмов грудного молока на разных сроках лактации

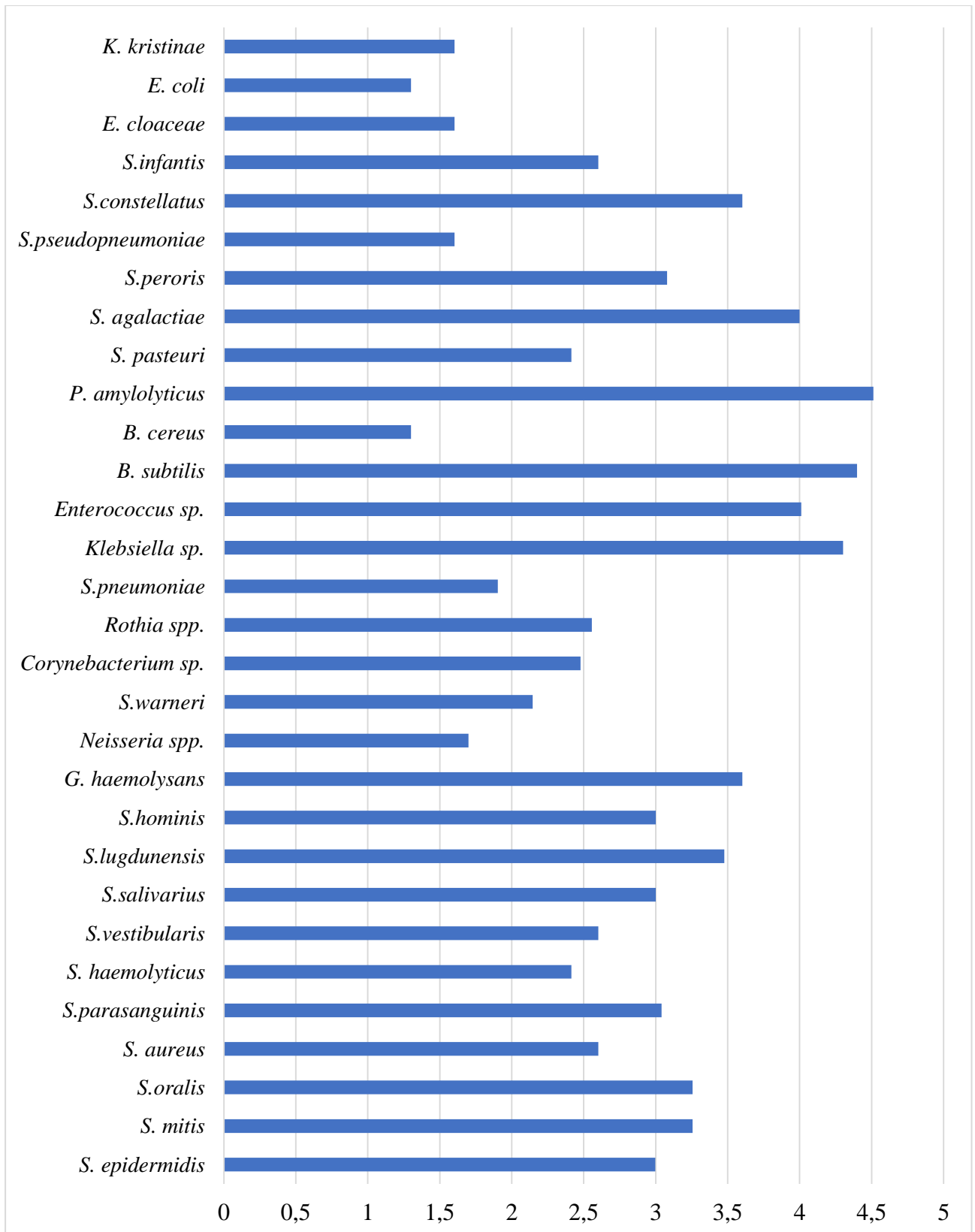
Исследование проводили на 100 образцах грудного молока, полученных на разных сроках лактации. Ни в одном из образцов не были обнаружены условно-патогенные грибы. Методами посевов на селективные среды и последующей MALDI-TOF масс-спектрометрии среди условно-патогенных бактерий был выявлен значительный спектр родов и видов (Таблица 5). 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* (Рисунок 9А). 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. (Рисунок 9Б). Образцы молока были разделены на группы в соответствии с периодом лактации: первая – 1-2^х суточное молозиво; вторая – 3^х 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%.

Таблица 5 – Видовое разнообразие изолятов, полученных из грудного молока (n=100)

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



A



Б

Рисунок 9 – Микробиом грудного молока здоровых женщин:

А – частота встречаемости условно-патогенных микроорганизмов в целом по всей выборке, %; Б – обсемененность (медиана), log (КОЕ /мл)

3.3.2. Сравнительная оценка микробиологических показателей с антимикробной активностью сыворотки и её низкомолекулярной фракции

Данные, касающиеся взаимосвязи между периодом лактации, антимикробной активностью сыворотки и наличием микроорганизмов в грудном молоке представлены в Таблице 6. 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. 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 ($p < 0,001$). Частота встречаемости и обсемененность *S. epidermidis* обратно коррелировали с периодом лактации (Таблица 6), 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. 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 (Таблица 6). 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 (Таблица 6). 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 практически отсутствовала ($r = - 0,333$).

Таблица 6 – Взаимосвязь между периодом лактации, антимикробной активностью сыворотки и наличием микроорганизмов в грудном молоке

* медиана обсемененности по всем видам в пределах всей данной группы;

** видовое разнообразие по всем видам пределах всей данной групп

N	Период лактации	Период лакт., месяцы (медиана)	АМ активность, %, (медиана)	<i>S. epidermidis</i>		<i>S. mitis</i>		<i>S. oralis</i>		<i>S. aureus</i>		Сумм. обсем., КОЕ/мл (медиана)*	Видовое разнообразие, % **
				Частота встреч., %	КОЕ/мл, (медиана)	Частота встреч., %	КОЕ/мл, (медиана)	Частота встреч., %	КОЕ/мл, (медиана)	Частота встреч., %	КОЕ/мл, (медиана)		
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

3.4. Активность различных фракций сыворотки грудного молока

3.4.1. Определение активности фракций сыворотки, содержащих полипептиды молекулярной массой ниже 3, 10, 30 и 100 кДа

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* (см. Главу 2, п.2.3.1.). Каждый пул состоял из трех сывороток – первый – с относительно высокой общей активностью, второй – с относительно низкой (Рисунок 10). Видно, что основная часть активности соответствует белкам с молекулярной массой выше 100 кДа, что согласуется с данными, представленными в Главе 3, пп. 3.4.1. и 3.4.2. Разность между активностью нативной сыворотки и активностью 100 кДа-фракции составила 56,2% (пул1) 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 фильтратами 3 кДа и 30 кДа. Ввиду отсутствия коммерческих фильтров с размером пор 1 кДа, был проведен диализ сыворотки грудного молока через соответствующую мембрану. Исходный образец пуловой сыворотки имел активность 79,0%, тогда как диализованный 63,9%, т.е. потеря активности в результате диализа составила 15,1%. Таким образом, можно заключить, что активные вещества содержатся во фракции с молекулярной массой ниже 1 кДа.

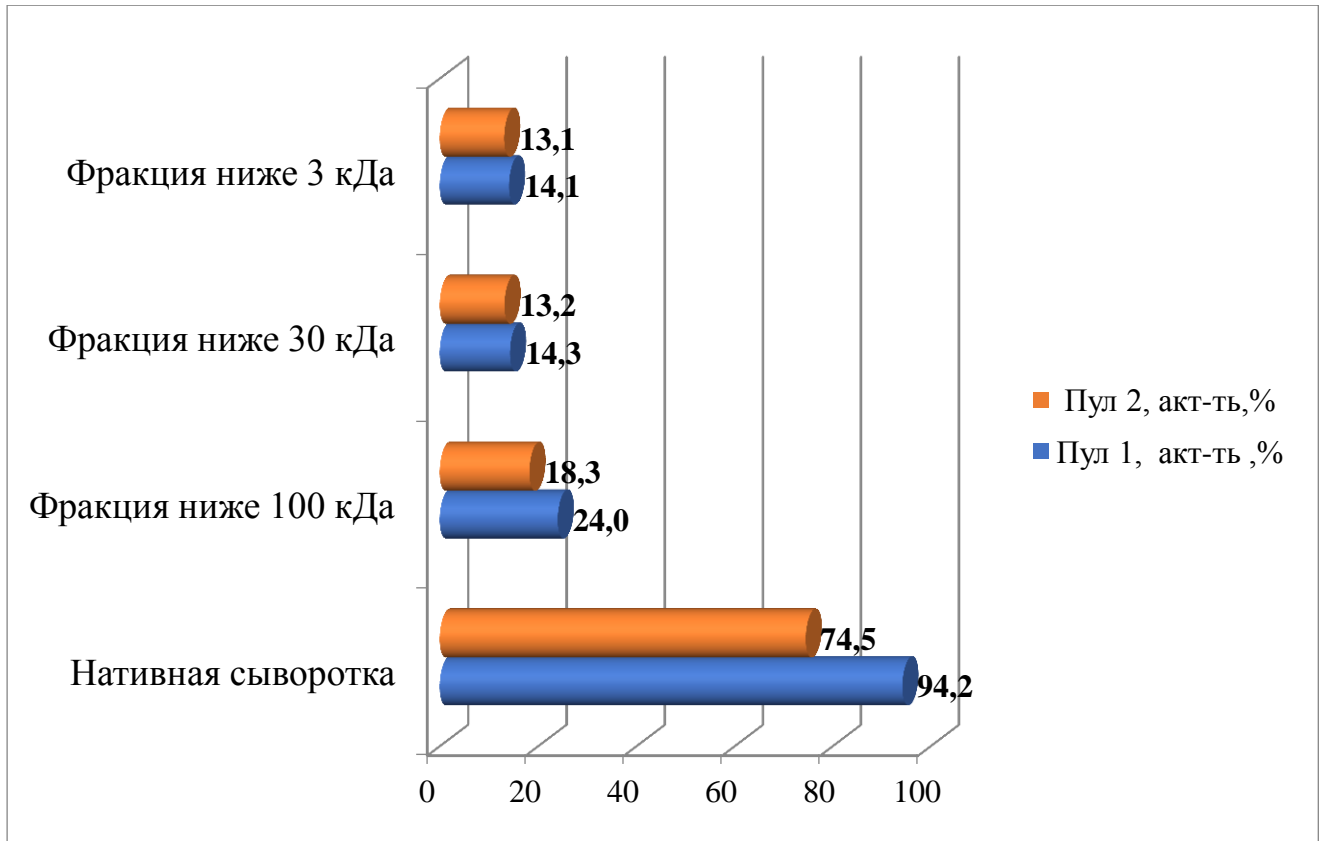


Рисунок 10 – Антимикробная активность фракций двух пулов сыворотки грудного молока (медианы)

3.4.2. Изучение пептидного состава фракции сыворотки ниже 3 кДа

Для выяснения природы активных соединений были проведены ВЭЖХ-МС анализ образцов с UV-детектированием (Рисунок 11) и хромато масс-спектрометрический анализ фильтрата сыворотки с молекулярной массой ниже 3 кДа и концентрацией пептидов (по белку) 700 мкг/мл (Рисунок 12). По сопоставлению хроматограмм с UV и MS детекторов можно видеть, что большая часть пептидов выходит с 0 по 2 минуту (не связывается с колонкой): этому времени выхода соответствовали наиболее интенсивные сигналы, т.е. пептиды с наибольшей концентрацией. Всего наблюдалось 17 397 сигналов, соответствующих ионам с молекулярной массой 2776 Да и ниже. При этом пептиды, соответствующие геномной базе данных человека UniProtKB, достоверно не идентифицированы. Для идентификации последовательности пептидов, не соответствующих базе данных человека UniProtKB, использовали

подход DeNovo секвенирования с помощью компьютерного приложения PEAKS (Таблица 7). Всего обнаружено 513 пептидов с установленной аминокислотной последовательностью.

Все полученные сигналы ранжировали по интенсивности (Таблица 8). Оказалось, что самая высокая интенсивность соответствует 10^8 усл.ед., причем таких сигналов всего 5. Интенсивности порядка 10^7 усл.ед. соответствует 26 сигналов. Некоторые ионы имеют сразу несколько сигналов с одинаковой молекулярной массой, но разной интенсивностью. Если пренебречь сигналами с интенсивностью ниже 10^6 усл.ед., т.е. с концентрацией ионов в 100 раз меньше самых представленных, то можно рассматривать первые – всего 31 сигнал. Эти ионы (с учетом повторений сигналов) представлены в Таблице 8. Видно, что преобладающими по концентрации ионами явились следующие: 380 Да, 364 Да, 1406 Да, 1064 Да и 722 Да. Из них лишь 3 сигнала относятся к веществам пептидного происхождения.

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. Антимикробные пептиды человека с молекулярной массой ниже 3 кДа недектированы, поэтому можно заключить, что сигналы соответствуют каким-либо пептидам бактерий, например, бактериоцинам.

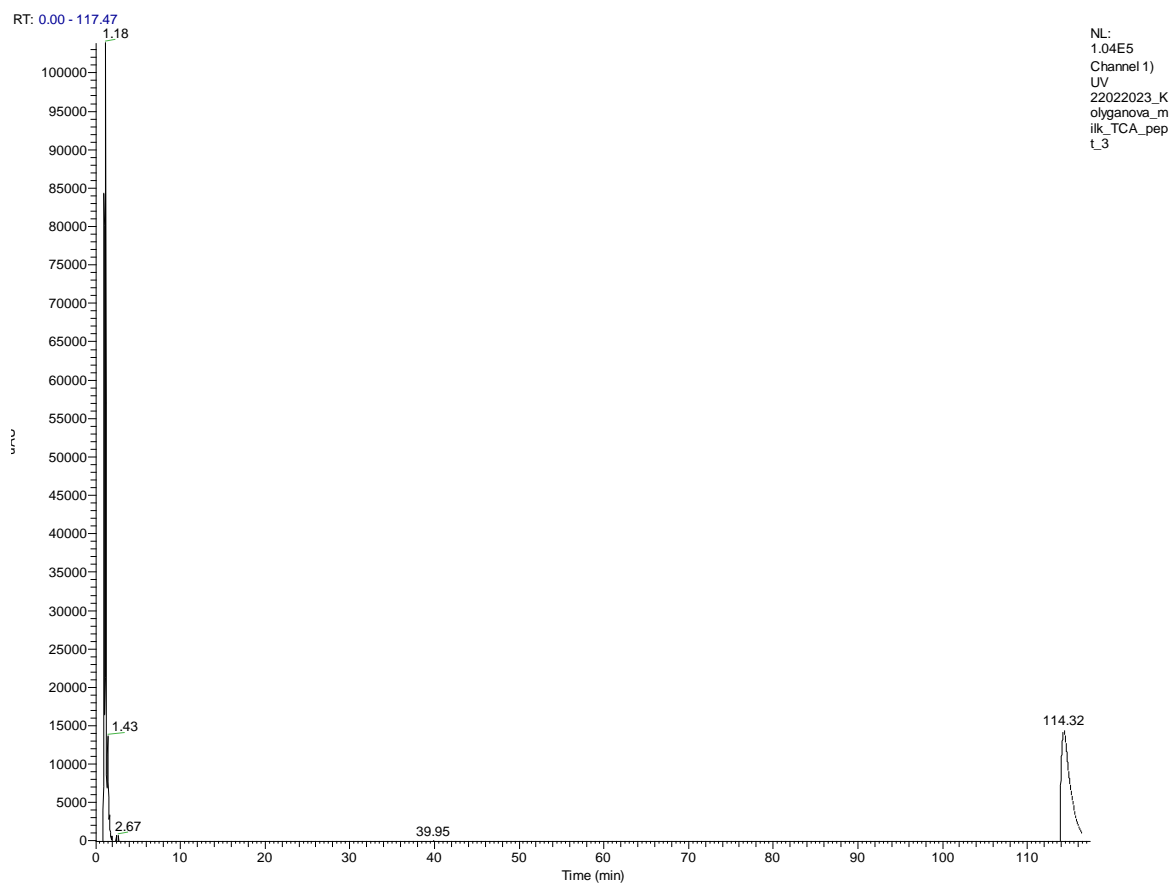


Рисунок 11 – ВЭЖХ-МС анализ образцов с UV-детектированием (280 нм) с 0 по 120 минуту

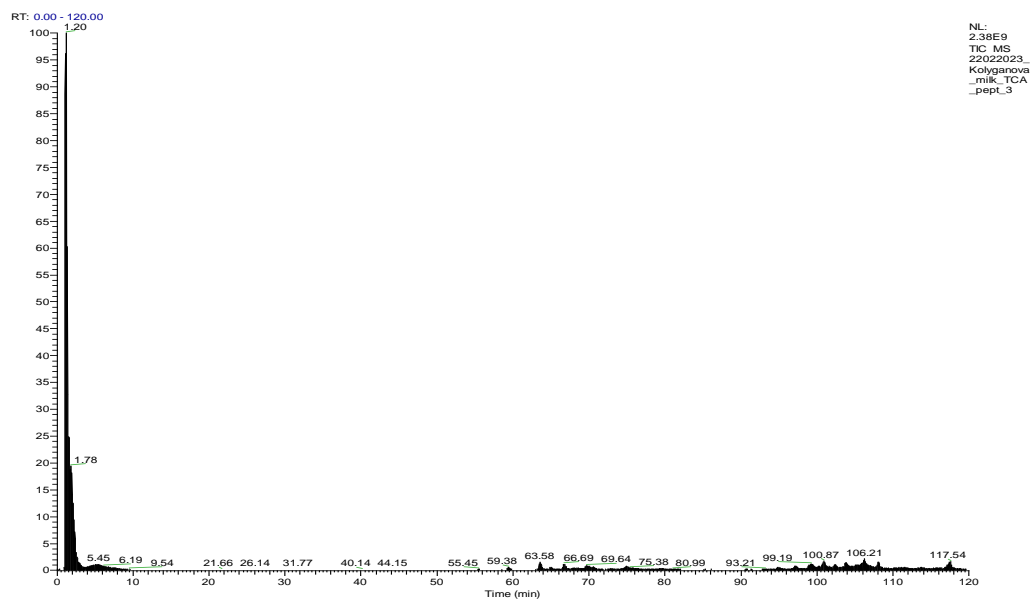


Рисунок 12 – Хромато масс-спектрометрический анализ фракции сыворотки молока молекулярной массой ниже 3 кДа; хроматограмма полного ионного тока (TIC) с 0 по 120 минуту

Таблица 7 – Мажорные ионы по данным хромато масс-спектрометрического анализа низкомолекулярной фракции сыворотки грудного молока (ниже 3 кДа, время выхода 0 ÷ 2 мин)

Мол. масса, Да	Максимальная интенсивность сигнала, усл. ед.	Число повторений данного сигнала	Время выхода первого пика с данной интенсивностью массой, мин	m/z (отношение массы к заряду)	Результаты пептидного анализа (последовательность аминокислот в пептиде)
1748,5	13200000	1	1,10	875.2729	нет данных
1406,4	121000000	2	1,08	704.2150	нет данных
1064,3	101000000	3	1,08	533.1560	NCCGYUCHC
1048,3	15500000	1	1,09	525,1689	CENEGDDHM
758,1	18700000	1	1,10	380,2097	нет данных
722,2	82400000	5	1,08	362.0974	CEENCC, EHCCCE, DDMCHC, ECCHEC
602,1	21800000	1	1,08	603.1454	нет данных
590,1	43700000	2	1,87	591.0711	нет данных
526,1	15200000	2	1,41	527.1379	нет данных
489,2	10200000	1	1,33	490.1772	нет данных
482,1	19500000	1	1,09	483.1027	нет данных
439,9	23900000	2	2,00	440.9811	нет данных
383,1	26900000	1	1,10	384.0796	нет данных
380,1	241000000	3	1,08	381.0794	нет данных
364,1	153000000	2	1,33	365.1055	нет данных

Таблица 8 – Ранжирование сигналов, полученных при MALDI-TOF масс-спектрометрии фракции сыворотки молока молекулярной массой ниже 3 кДа, по интенсивности

№	Интенсивность сигнала, усл.ед.		Кол-во ионов с данной интенсивностью сигнала
	Максимальная	Минимальная	
1	241 000 000	100 000 000	5
2	99 999 999	10 000 000	26
3	9 999 999	1 000 000	254
4	999 999	100 000	2 211
5	99 999	10 000	14 793
6	9 999	1 000	108
7	999	100	0
8	99	10	0
9	9	1	0
			Итого: 17 397

3.5. Влияние физических факторов на антимикробную активность сыворотки молока

В Таблице 2, п. 3.2. показано, что активность сыворотки грудного молока зависит от того, в какой период лактации был получен образец. Поскольку в связи с использованием различных способов консервации для продления срока годности молока применяют различные методы, актуальной является оценка влияния разных физических факторов на сохранение антимикробной активности. К таким факторам можно отнести пастеризацию, замораживание, хранение и лиофилизацию.

На 6 образцах грудного молока человека и 6 образцах молока коровы была изучена антимикробная активность сыворотки по отношению к культуре *S.*

albicans после предварительного воздействия данных факторов (см. п. 3.1). Результаты исследования приведены в Таблице 9.

Все физические факторы оказали влияние на исходные образцы. Показано, что минимальное влияние на антимикробную активность образцов молока человека оказали пастеризация (отмечено 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 молоко 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.

Таблица 9 – Влияние физических факторов на антимикробную активность сыворотки молока человека и коровы

Факторы	Антимикробная акт-ть общая, %	Достоверность отличий от исходного образца	Кратность снижения антимикробной активности по отношению к контрольному образцу
Молоко человека:			
Нативная сыворотка	91,2 ± 4,8	-	
Пастеризация	86,0 ± 9,8	p > 0,05	1,06
Лиофилизация	83,9 ± 1,4	p > 0,05	1,09
Замораживание	65,5 ± 4,5	p < 0,01	1,40
Молоко коровы:			
Нативная сыворотка	79,0 ± 8,8	-	
Пастеризация	57,9 ± 20,1	0,01 < p < 0,05	1,37
Лиофилизация	29,4 ± 5,9	p < 0,01	2,69
Замораживание	29,8 ± 2,2	p < 0,01	2,65

3.6. 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 (Таблица 10, Рисунок 13). Примерно так же менялась и антимикробная активность фракции ниже 100 кДа,

причем между этими двумя показателями имела место прямая корреляция: коэффициент Пирсона $r = 0,881$. Концентрация сывороточного альбумина изменялась аналогично, корреляция этого показателя с общей активностью сыворотки так же высока: $r = 0,992$. Определение содержания альбумина в сыворотке крови мышей показало величины $30,8 \div 36,8$ мг/мл. Вклад низкомолекулярной активности в общую активность сыворотки молока сильно различался у разных млекопитающих (Рисунок 14): этот показатель был минимальным у мышей, а его величины обратно коррелировали с величинами общей активности сывороток: $r = - 0,725$. Концентрация альбумина в фракции ниже 100 кДа грудного молока человека составила всего 0,14 мг/мл, т.е. примерно всего 3,2% от его концентрации в исходной сыворотке.

Активность фракции 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 по сравнению с контролем составило 29,8% (а с учетом 4-х кратного разведения – 119,2%) против 18,5 % для фракции ниже 100 кДа человека.

Электрофорез в ПААГ (Рисунок 15) показал наличие мажорных полос молекулярной массой порядка 80 кДа (лактоферрин) в фракции ниже 100 кДа человека и мыши, примерно одинаковых по интенсивности, тогда как соответствующая полоса в фракции ниже 100 кДа козы еле различима. Уровни лактоферрина в молоке человека и мыши действительно близки между собой, тогда как в молоке козы этого полипептида очень мало, что согласуется с данными литературы (Таблица 10).

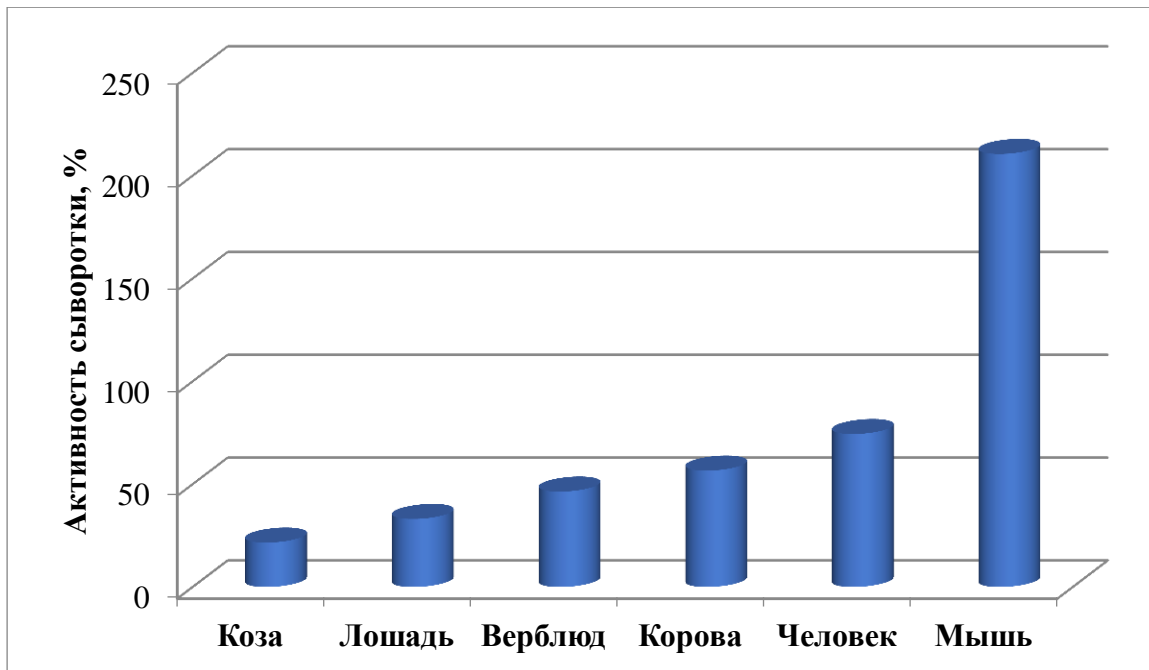


Рисунок 13 – Антимикробная активность сыворотки молока разных млекопитающих по отношению к клеткам *C. albicans*

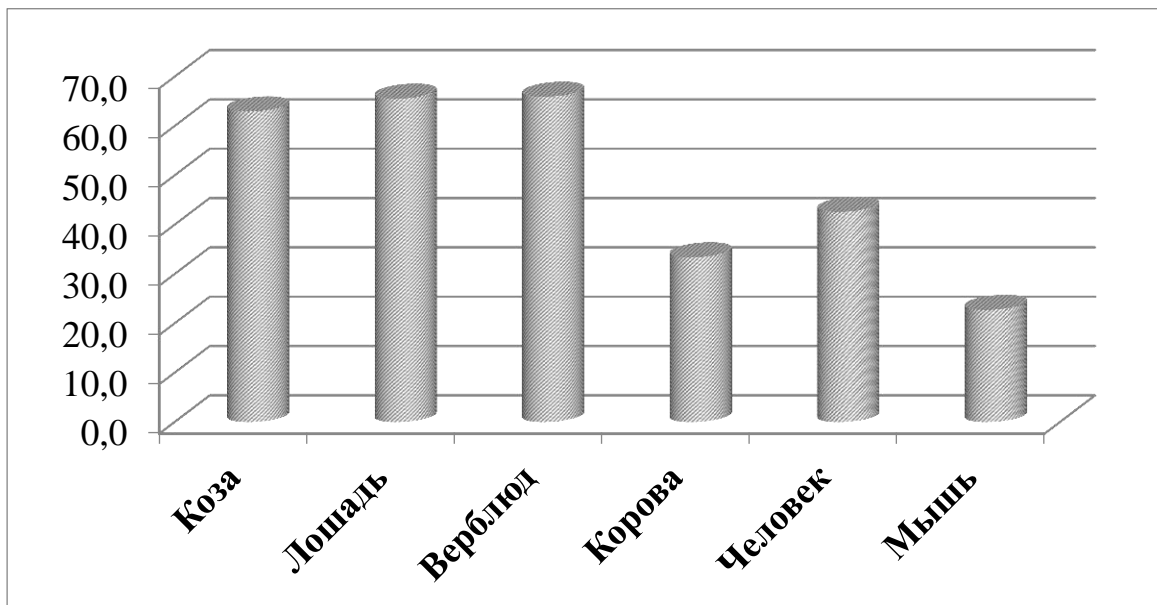


Рисунок 14 – Вклад антимикробной активности фракции ниже 100 кДа в общую антимикробную активность сыворотки молока различных млекопитающих

Таблица 10 – Антимикробная активность сыворотки молока и её факторы у различных млекопитающих по данным настоящего исследования и из источников литературы

Млекопитающие	Собственные данные			Данные из источников литературы		
	Акт-ть общая, % (медианы)	Акт-ть АМП, % (медианы)	Альбумин, мг/мл (медианы)	sIgA, мг/мл	Лактоферрин, мг/мл	Сывороточный альбумин, мг/мл
Коза	21,6	13,6	3,4	0,03÷0,08 (Park Y.W. et al., 2007)	0,02÷0,2 (Tafes A. G. ,2020)	0,5 (Tafes A. G. ,2020)
Лошадь	33,1	21,7	3,3	0,47 (Claeys W. L. et al., 2014)	0,1÷2,0 (Claeys W. L. et al.,2014)	0,37 (Claeys W. L. et al.,2014)
Верблюд	46,4	30,6	3,3	Нет данных	0,45÷0,55 (El-Hatmi H et al.,2006)	1,5÷2,1 (El-Hatmi H et al.,2006)
Корова	56,6	18,9	3,6	0,05÷0,14 (Park Y.W. et al., 2007)	0,02 ÷ 0,5 (Claeys W. L. et al.,2014)	0,3÷0,4 (Claeys W. L. et al.,2014)
Человек	74,4	31,7	4,4	0,94 ÷ 1,3 (Арзуманян В.Г. и др.,2022; Bo Lonnerdal, 2017)	1,5÷2,0 (Claeys W. L. et al., 2014) 0,94÷1,39 (Арзуманян В.Г. и др.,2022)	0,4÷0,5 (Claeys W. L. et al.,2014) 0,93-1,06 (Elwakiel M et al., 019) 4,6÷4,8 (Арзуманян В.Г. и др.,2022)
Мышь	210,6	47,9	38,6	0,7÷1,3 (Parr EL et al.,1995)	5,7 (Boumahrou N. et al., 2009)	17,7÷21,0 (Monks J, Neville MC.,2004)

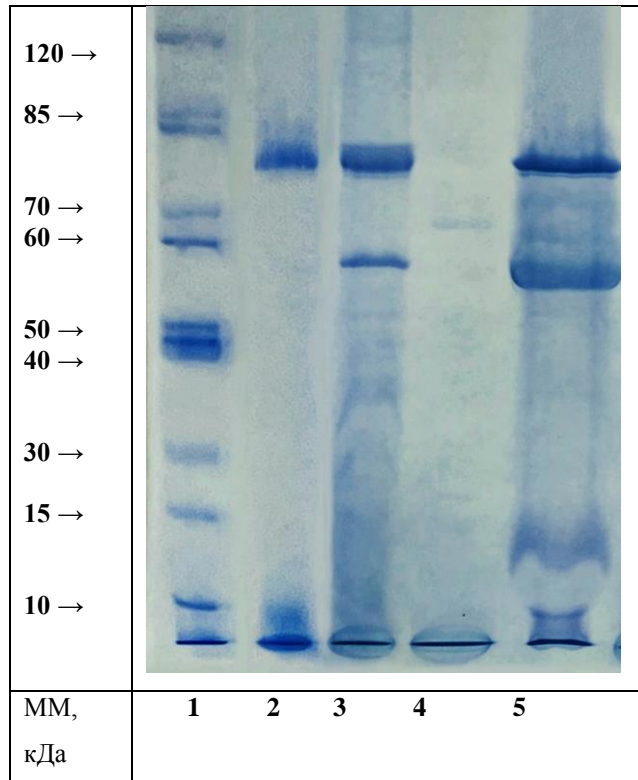


Рисунок 15 – Электрофорез сывороточных белков молока млекопитающих:

1 – маркеры мол. массы (ММ);

2 – очищенный лактоферрин из грудного молока человека (концентрация 1 мг/мл);

3,4 и 5 – образцы пулов фракции сыворотки молока ниже 100 кДа человека, козы и мыши

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для оценки антимикробной активности биологических жидкостей метод посевов является «золотым стандартом». Кроме того, давно применяют метод микроскопии, позволяющий визуально или количественно оценить процент погибших клеток. В данном исследовании проведено сравнение спектрофотометрического метода с этими традиционными методиками. Метод спектрофотометрии позволяет быстро оценить наличие микробицидного действия, связанного с деструкцией цитоплазматической мембраны и клеточной стенки (Арзуманян В.Г. с соавт., 2015). Методом микроскопии показано, что инкубация клеток *C. albicans* с цельной сывороткой приводит к разрушению клеточных стенок и мембран с образованием везикулярного дебриса, который поглощает краситель из среды (Рисунок 2А). При воздействии на клетки *C. albicans* фракции сыворотки ниже 100 кДа клетки не разрушались (Рисунок 2В), а по-видимому, повреждались с образованием пор в клеточной стенке и ЦПМ, что согласуется с данными литературы о механизме воздействия АМП на микроорганизмы (Tornesello AL et al., 2020). Оценка антимикробной активности цельной сыворотки молока и её фракции ниже 100 кДа спектрофотометрическим методом выявила наличие дозозависимого эффекта на клетки *C. albicans*, *E. coli* и *S. aureus*. Получение результатов в течение рабочего дня от момента доставки пробы в лабораторию, высокая точность, а также доступность оборудования делают спектрофотометрический метод достойной альтернативой традиционным методам при изучении противомикробных свойств молока.

Использование данного метода дало возможность изучить взаимосвязь антимикробной активности сыворотки грудного молока с её основными противомикробными компонентами. На выборке из 66 образцов сыворотки показано, что с увеличением периода лактации значительно снижалась общая антимикробная активность, что согласуется с данными литературы, полученными при использовании метода посевов (Ramsey KH et al., 1998; Ighanesebhor S.E., Ootobo E.S., 1996). Аналогичный результат был получен при исследовании их 100

кДа-фракций, содержащих АМП. На сегодняшний день известно, что грудное молоко содержит 9 классов антимикробных пептидов (см. Главу 1, п.1.1.) (Wada Y., Lönnerdal B., 2014). Лактоферрин составляет до 20% от общего белка сыворотки (Lönnerdal B. et al., 2017) и оказывает фунгистатическое действие на клетки *C. albicans*, подтвержденное методом посевов (Samaranayake Y.H., et al., 1997). Полученные нами результаты по снижению его концентрации при переходе от молозива к зрелому молоку согласуются с данными других авторов (Lönnerdal B. et al., 2017).

Имеются данные, что сывороточный альбумин продуцируется не молочной железой, а проникает в грудное молоко из сосудов (Lönnerdal B. et al., 2017). Его содержание, оцененное колориметрическим методом, превысило данные, приведенные в литературе (менее 1 мг/мл) (Nagasawa T. et al., 1973), что, вероятно, связано с использованием метода препаративного электрофореза. Ранее нами установлено, что сывороточный альбумин в широком диапазоне концентраций проявлял антимикробную активность (Арзуманян В.Г. с соавт., 2019). Концентрация этого полипептида в процессе лактации менялась не настолько значительно, как у лактоферрина, но его вклад в общую активность и суточное потребление значительно повышались спустя год от начала лактации.

В связи с низкой концентрацией лизоцима в молозиве и зрелом молоке можно предположить, что он не вносит существенного вклада в общую активность сыворотки, однако, его потребление значительно возрастает по мере увеличения периода лактации (Montagne P. et al., 2001).

Полученные нами данные по изменению концентрации секреторного иммуноглобулина класса А на протяжении периода лактации согласуются с результатами других авторов (Lönnerdal B. et al., 2017). В научной литературе есть данные о фунгистатической активности IgA по отношению к дрожжам *C. albicans*, оцененной методом посевов (Funakoshi S. et al., 1982). На моноклональных антителах класса А показано наличие фунгицидной активности против тех же дрожжей, установленной тем же методом (Kavishwar A., Shukla P. K., 2006).

Однако в современных учебных пособиях и научных публикациях указано, что антитела непосредственным микробицидным действием не обладают. На основании полученных данных можно подтвердить, что IgA оказывает прямое микробицидное действие на клетки *C. albicans*, которое проявляется в разрушении клеточных стенок и мембран этих дрожжей.

Показано, что наиболее значимыми по антимикробной активности в сыворотке молозива являются IgA и лактоферрин, тогда как спустя 12 месяцев после начала лактации на первый план выходят IgA и сывороточный альбумин. Расчет потребления указанных антимикробных полипептидов (мг/кг веса x сутки) по средним значениям способности к лактации показал, что через год от начала кормления младенец получает не меньше, как считали ранее, а в несколько раз больше антимикробных веществ, чем при кормлении молозивом.

Изучена активность очищенных препаратов лактоферрина, лизоцима, лактопероксидазы и лактальбумина в отношении микроорганизмов *in vitro*. Показано, что лактальбумин не проявлял непосредственной фунгицидной активности, хотя известно, что он может ингибировать рост микроорганизмов за счет связывания ионов кальция, цинка и железа, а пептиды, образующиеся при его протеолизе, обладают фунгицидным эффектом (Lønnerdal B., Lien E.L., 2003). Установлено, что лактоферрин, лактопероксидаза и лизоцим разрушают клетки микроорганизмов с образованием везикул.

Известно, что лактопероксидаза проявляет бактерицидное и фунгицидное действие на клетки патогенов при комбинации с перекисью водорода и тиоцианатом (лактопероксидазная система), что оценивали методом посевов (Welk A. et al., 2009). В нашей работе с помощью спектрофотометрического метода впервые установлено наличие антимикробной активности этого полипептида на клетки микроорганизмов *per se*, т.е. вне связи с лактопероксидазной системой. В данном исследовании установлено, что фунгицидную активность этот полипептид проявлял в концентрации выше 1 мг/мл, а содержание этого полипептида в грудном молоке варьирует в пределах 0.77 ± 0.38 мг/л (Shin K et al., 2001), поэтому

он, очевидно, не вносит существенного вклада в общую антимикробную активность грудного молока.

Фунгистатическое действие человеческого лактоферрина на клетки *C. albicans* показано ранее методом посевов (Andersson Y. et al., 2000), и определены его минимальные ингибирующие концентрации для этих дрожжей – порядка 6 мг/мл (Fernandes K.E., Carter D.A., 2017). Изучено также одновременное действие лактоферрина и лизоцима методом посевов на те же дрожжи и показано отсутствие синергии (Samaranayake Y.N. et al., 1997). Однако в настоящем исследовании методом спектрофотометрии установлено наличие незначительной синергии при действии этих двух препаратов на *C. albicans*.

Ранее показан синергичный антимикробный эффект лактоферрина и лизоцима на клетки эпидермального стафилококка методом посевов (Leitch E.C., Willcox M.D., 1998). В данном исследовании показано, что при действии этой пары АМП на *S. aureus* и *E. coli* наблюдается антагонистический эффект. Сочетание трех указанных АМП использовали ранее для приготовления протективных составов для зубной пасты (Tenovuo J., 2002), причем, лактопероксидазу применяли в сочетании с тиоцианатом и перекисью водорода. Автор обзора отмечает, что именно в таком варианте она сохраняла активность *in vivo*, продуцируя антимикробный гипотиоцианит. В другом исследовании *in vivo* показано наличие 6 различных устойчивых сочетаний концентраций ЛФ, ЛЦ, пероксидазы и иммуноглобулина А в слюне (Rudney J.D., Smith Q.T., 1985). Эти сочетания авторы объясняют различной способностью к синтезу этих веществ в слюнных железах. Исследование взаимного влияния лактоферрина, лактопероксидазы и лизоцима *in vitro* впервые проведено в настоящем исследовании и показано, что при совместном действии всех трех препаратов имел место антагонистический эффект, т. е. суммарная активность была значимо ниже суммы активностей отдельных препаратов. Возможно, такая ситуация имеет место и *in vivo* в случаях, когда взаимоизменяется синтез какого-либо из компонентов системы.

Молекулярные массы разных антимикробных полипептидов грудного молока варьируют в диапазоне от 3 кДа до 80 кДа, тогда как секреторный иммуноглобулин класса А имеет массу порядка 170 кДа. Для оценки активности фракций, содержащих разные антимикробные субстанции, был использован метод фракционирования с помощью мембранных фильтров на 3, 30 и 100 кДа. Установлено, что наибольшая активность соответствовала фракции выше 100 кДа и, очевидно, была обусловлена присутствием sIgA. Небольшая часть активности соответствовала диапазону 30÷100 кДа, что, скорее всего, связано с наличием лактоферрина. Обращает на себя внимание тот факт, что практически нет различий в величинах активности между фракциями ниже 30 кДа и ниже 3 кДа, т.е. соответствующая активность связана с какими-то низкомолекулярными веществами. ВЭЖХ-МС анализ и хромато масс-спектрометрический анализ фракции ниже 3 кДа показал превалирование пептиды с молекулярной массой ниже 1400 Да, причем среди всех пептидов фракции не обнаружено тех, которые соответствовали бы геномной базе данных человека UniProtKB. На этом основании можно предположить, что полученные сигналы принадлежат пептидам бактерий, например, бактериоцинам. Из 31 сигнала с максимальной интенсивностью были отобраны 5 наиболее интенсивных. По двум из них, используя подход DeNovo секвенирования с помощью компьютерного приложения PEAKS, получена информация об аминокислотных последовательностях, которая, однако, не дает возможности определить их принадлежность к пептидам из релевантных баз данных.

Исходя из полученных данных (п. 3.3.) наиболее распространенным видом бактерий грудного молока явился *S. epidermidis*, однако, обсемененность молока бактериями данного вида не превышала 10^3 КОЕ /мл. Более того, активность сыворотки значимо коррелировала с частотой встречаемости и обсемененностью именно этим видом бактерий. В этой связи логично рассмотреть бактериоцины эпидермального стафилококка. Известно, что бактериоцины, выделяемые *S. epidermidis* - epicidin 280, epidermin, epilancin 15X, epilancin K7, Pep5, epidermicin

NI01 и epidermicin ALE-1 – состоят из более чем 50 аминокислот и имеют молекулярную массу выше 3000 Да (Newstead L. et al., 2020). Бактериоцин из *S. aureus*, известный как aureocin A53, имеет массу 6012 Да (Netz D.J. et al., 2002). В другом исследовании показано наличие антагонистической активности *S. aureus*, названной авторами aureocins 4185, которая обусловлена сразу пятью пептидами с молекулярными массами от 2305 Да до 12834 Да (Ceotto H. et al., 2010). В другой работе, касающейся бактериоцина из золотистого стафилококка, описан пептид массой 2074.9 Да, названный BacCh91 (Wladyka B. et al., 2013).

Бактериоцины стрептококков подробно описаны в обзоре Nes с соавторами: 18 штаммов 8 видов рода *Streptococcus* выделяли различные антагонистические пептиды массой 2315 ÷ 5968 Да (Nes I.F. et al., 2007).

В настоящем исследовании изучали лишь оппортунистическую микробиоту грудного молока, в то время как молочнокислые бактерии родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* также могут быть источником бактериоцинов. Их обилие в грудном молоке не так велико – порядка 2-3% (Hunt K.M. et al., 2011). В обзоре, касающемся бактериоцинов, продуцируемых *Bifidobacterium* spp., приведено 8 видов этих соединений, имеющих молекулярную массу от 3000 Да до 127000 Да (Martinez F.A. et al., 2013). В более поздней работе приведен еще один бактериоцин из *B. longum* массой 14972 Да (Javvadi S.G. et al., 2022). Есть данные о продукции бактериоцинов лактобациллами разных видов: в основном это пептиды выше 2000 Да - 2572 Да (Song D.F. et al., 2014), 3547 Да (Dai M. et al., 2021), 6433 Да (Dimitrijević R. et al., 2009), 7500 Да (Gaspar C. et al., 2018), однако, есть единственная публикация о низкомолекулярном бактериоцине из *L. plantarum*, названном авторами plantaricin P1053, масса которого составила 1053 Да (De Giani A., et al., 2019).

Исходя из приведенных данных видно, что обнаруженные в низкомолекулярной фракции пептиды могут являться низкомолекулярными бактериоцинами. Наиболее вероятными кандидатами в бактериоцины из обнаруженных пептидов, судя по их наиболее высокой концентрации и

молекулярной массе, могут быть пептиды 1406.4 Да и 1064.3 Да. Каким микроорганизмам они могут принадлежать еще предстоит выяснить, поскольку само присутствие их в грудном молоке в качестве нормобиоты стало известно относительно недавно.

До 2003 года грудное молоко считалось стерильным субстратом, пока Мартин с соавторами, используя культуральные методы, не показали наличие в нем молочнокислых бактерий (Martin R. et al., 2003). С тех пор проведены многочисленные исследования традиционными и молекулярными методами, показавшими наличие в грудном молоке свыше тысячи видов бактерий, грибов и вирусов (Consales A. et al., 2022). Есть мнение, однако, что обнаружение в молоке многих видов типичных обитателей воды и почвы может быть связано с их присутствием в используемых для анализа реагентах, растворах и наборах. Установлено, что так называемый «core» / основу микробиома грудного молока составляют роды *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* и *Propionibacterium* (Ojo-Okunola A. et al., 2018), причем, по обилию и видовому разнообразию первые два рода значительно превосходят остальные (Hunt K.M. et al., 2011). Ввиду этого молочнокислые и пропионовые бактерии не включали в настоящее исследование, а изучали лишь условно-патогенную микробиоту грудного молока на разных сроках лактации во взаимосвязи со способностью данного субстрата противостоять микробным агентам.

Традиционный культуральный метод учета микроорганизмов дает возможность оценить количество жизнеспособных клеток, а новый метод идентификации – MALDI-TOF спектрометрия – расширяет спектр идентифицируемого микробиома. Установлено, что полученные нами данные о видовом разнообразии грудного молока во многом согласуются с данными других авторов. Так, наиболее часто встречающимся видом оказался *S. epidermidis*, который является маркером, отличающим микробиом кишечника младенцев, находящихся на грудном вскармливании, от таковых на искусственном (Jiménez E. et al., 2008). Этот вид бактерий населяет здоровую кожу человека, поэтому

вполне понятен источник его в грудном молоке. Некоторые виды стрептококков, а также *Gemella spp.* и *Rothia spp.* являются нормобиотой полости рта, поэтому они могут попасть в грудное молоко непосредственно от младенца (Biagi E. et al., 2018). Однако, возможен и обратный перенос, поскольку эти микроорганизмы обнаруживали в дородовых выделениях из молочных желез (Ruiz L. et al., 2019). В пользу этого свидетельствует обнаруженное в данном исследовании наличие *G. haemolysans* именно в 1-3^x суточном молозиве.

Данные литературы по обсемененности условно-патогенными микроорганизмами в разные периоды лактации противоречивы. В работе Khodayar-Pardo показано, что общее количество микроорганизмов в молозиве составляло 10^4 - 10^5 КОЕ/мл, а в зрелом и переходном молоке - примерно на порядок выше (Khodayar-Pardo P. et al., 2014). При этом количество стрептококков и стафилококков составляло по 10^3 - 10^4 КОЕ/мл и практически не менялось с увеличением срока лактации. Напротив, в работе Cabrera-Rubio показано, что стафилококки и стрептококки, наряду с некоторыми другими видами, преобладали в микробиоме молозива, тогда как их содержание в переходном и зрелом молоке было значительно ниже (Cabrera-Rubio R. et al., 2012). Оба этих исследования проведены с применением молекулярных методик. В нашем исследовании показано, что по мере увеличения срока лактации снижалось не только содержание жизнеспособных клеток стафилококков и стрептококков, но и общая биомасса условно-патогенных бактерий. Однако видовое разнообразие в молозиве было несколько выше, чем в переходном и зрелом молоке, что согласуется с данными других авторов (Stinson L.F. et al., 2021). Обращает на себя внимание тот факт, что раннее молозиво (1-2 сутки) по видовому составу менее разнообразно, чем 3^x - суточное молозиво. Антимикробная активность сыворотки была максимальной в начале лактации, но по мере увеличения периода лактации значительно снижалась, коррелируя с концентрациями секреторного иммуноглобулина класса А, лактоферрина и сывороточного альбумина, которые составляют наибольший противомикробный потенциал сыворотки. В работе

Mastromarino показано, что содержание основного АМП грудного молока – лактоферрина – не коррелировало с содержанием бифидо- и лактобактерий: лактоферрин снижался при переходе от молозива к зрелому молоку, тогда как концентрация нормальной микробиоты оставалась на том же уровне – 10^2 КОЕ/мл лактобацилл и 10^3 КОЕ/мл бифидобактерий (Mastromarino P. et al., 2014). Снижение антимикробной активности сыворотки подтверждено и в настоящем исследовании, при этом установлено, что общая обсемененность молока условно-патогенными микроорганизмами и их видовое разнообразие также уменьшались в указанный период. При этом значимое снижение обсемененности отмечено после 1 месяца от начала лактации, тогда как значимое снижение антимикробной активности – после 8 месяцев. То есть, изменение факторов антимикробной защиты сыворотки грудного молока происходит в ответ на изменение биомассы условно-патогенной микробиоты. Подобных исследований в доступной литературе не обнаружено. Причиной первичного снижения биомассы условно-патогенных бактерий могут быть как их конкурентные взаимоотношения с нормобиотическими видами, так и растущий объем производимого молока при переходе к зрелому молоку. Сохранение антимикробных свойств грудного молока имеет большое практическое значение ввиду необходимости его использования в качестве источника донорского молока в случаях невозможности осуществления грудного вскармливания. В этой связи исследование влияния хранения, пастеризации, лиофилизации и диализа на противомикробную активность грудного молока в пределах одной серии опытов дает основание для практического использования. По данным разных авторов эти факторы в той или иной степени снижают антимикробные свойства грудного молока, что подтверждено микробиологическими методами (Van Gysel et al., 2012; Friend B.A. et al., 1983). Использование спектрофотометрического метода позволило оценить влияние упомянутых факторов на противомикробные свойства сыворотки молока человека и коровы. Установлено, что максимальное отрицательное влияние на антимикробную активность молока человека оказало хранение в течение 3

месяцев, в то время как пастеризация, лиофилизация и диализ снижали её незначительно. На молоко коровы как хранение, так и лиофилизация оказали максимально отрицательное влияние, тогда как пастеризация и диализ снижали активность незначительно. Полученные данные позволяют предположить, что антимикробная активность грудного молока человека ввиду его качественного и количественного состава более устойчива к физическим воздействиям в сравнении с молоком коровы.

Поскольку оказалось, что молоко коровы имело более низкую активность, чем молоко человека, провели исследование межвидовых особенностей млекопитающих на противомикробные свойства их молока. В качестве объектов были взяты образцы молока человека, коровы, козы, лошади, верблюда и мыши. Установлено, что наибольшая антимикробная активность сыворотки соответствует молоку мыши, а наименьшая - молоку козы, а именно, уровень общей активности у мышей в 3 раза превосходит соответствующую активность человека и в 10 раз – козы. По питательной ценности зрелого молока мыши превосходит молоко прочих упомянутых млекопитающих (п. 3.6.). Такие важные факторы иммунной защиты сыворотки молока, как sIgA, лактоферрин и сывороточный альбумин, были также наиболее высокими именно у мышей. Кроме того, общая активность имела высокую степень корреляции с концентрацией альбумина, которая в сыворотке молока мышей была идентична таковой в сыворотке крови этих животных. Напротив, содержание альбумина в сыворотке крови человека на порядок выше, чем в сыворотке молока. Расчет показывает, что такой уровень альбумина в сыворотке мышинного молока может давать величину активности против *C. albicans* примерно 66 %, уровень лактоферрина - 7 %, уровень sIgA - 25 %, что может дать совокупную активность порядка 98 %, тогда как уровень активности мышинной сыворотки оказался 210%. Можно не без основания предположить, что в мышинном молоке, помимо указанных антимикробных полипептидов, действует еще какое-либо соединение или несколько соединений. Что касается фракции сыворотки молока ниже 100

кДа, содержащей относительно низкомолекулярные АМП, то она также была наиболее активной именно у мышей, однако, её вклад в общую активность у этих млекопитающих был минимальным по сравнению с другими. Можно предположить, что неизвестное микробицидное вещество мышино́го молока имеет молекулярную массу выше 100 кДа. Наличие четких полос молекулярной массой около 55-58 кДа в этой фракции человека и мыши, по-видимому, связано с присутствием сывороточного альбумина, поскольку форе́з проводили в неденатурирующих условиях (Kluz M. et al., 2019). Важно, что концентрация альбумина фракции ниже 100 кДа сыворотки молока человека составляла всего 3,2% от его концентрации в исходной сыворотке, из чего можно заключить, что, как и в сыворотке крови, в грудном молоке альбумин присутствует в двух формах – в виде мономеров и в виде димеров (Naldi M. et al., 2021), которые могут задерживаться мембраной с размером пор 100 кДа. Межвидовые различия в активности сывороток молока среди млекопитающих могут быть связаны с качественной и количественной вариабельностью состава антимикробных полипептидов, а также их синергическим или антагонистическим взаимодействием друг с другом. Настоящее исследование выявило значимые различия в уровнях антимикробной активности сывороток молока человека и других млекопитающих. Наибольший уровень противомикробной защиты у мышей можно объяснить условиями их обитания, а именно, постоянным контактом с инфекционными агентами, а также естественным отбором наиболее устойчивых особей. Сыворотка молока человека по антимикробной активности занимает второе место среди изученных сывороток млекопитающих. Человек и мышь являются близкими по способу питания – оба вида относятся к всеядным животным, в то время как остальные – лошадь, коза, корова и верблюд – к травоядным, что также может влиять на качественный состав молока, в том числе и антимикробные факторы.

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 \times 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 действии 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМП – антимикробные пептиды

ЛФ – лактоферрин

ЛЦ – лизоцим

ЛП – лактопероксидаза

DСD – дермцидин

sIgA – секреторный иммуноглобулин класса А

MFGMP – белки, связанные с мембранами глобул молочного жира

Да – дальтон

кДа – килодальтон

ММ – молекулярные массы

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

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

ГПД – глюкозо-пептон-дрожжевая среда

Ig – иммуноглобулины

SCN – тиоцианат

(SCN)₂ – тиоцианоген

OSCN – гипотиоцианат

HOСCN – гипотиоциановая кислота

NC-SCN – тиоцианат циана

HO₂SCN – циано-сернистая кислота

HO₃SCN – циано-серная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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.
3. Антимикробные пептиды и белки в биожидкостях человека/ А. М. Иксанова, В. Г. Арзуманян, С. Ю. Конаныхина, П. В. Самойликов // MIR Journal. – 2022. –Т.9. –№1. – С. 37–55.
4. Арзуманян, В.Г. Антимикробное действие альбумина на клетки бактерий и дрожжей/ В.Г. Арзуманян, И.М. Ожован, О.А. Свитич // БЭБМ. – 2019. – Т. 167. – № 6. – С. 722–725.
5. Арзуманян, В.Г. Модифицированный метод оценки целостности цитоплазматической мембраны клеток эукариот / В.Г. Арзуманян, И.М. Ожован // Бюллетень эксперим. биологии и медицины. – 2002. – Т. 134. № 7. – С. 118–120.
6. Богатова, О.В. Определение качества молока: метод. указания к лаб. практикуму / Н.Г. Догарева; О.В. Богатова – Оренбург: ОГУ, 2002. – 39 с. – URL: <https://rucont.ru/efd/176691> (дата обращения: 12.05.2023).
7. 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.
8. Влияние микрофлоры матери на состав микроценоза кишечника ребенка в период грудного вскармливания/ И. В. Николаева, В. М. Бондаренко, С.В. Фиалкина, Г. Н. Коновалова, Л.А. Купчихина, В. А. Анохин// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008; – № 5. – С. 87–92.

9. Исследование роли β -дефенсина-2 в грудном молоке при атопическом дерматите у детей/ Ю.А. Бунина (Богуславская), А.В. Кудрявцева, Е.П. Быстрицкая, Г.Н. Усатова, К.Ю. Левина, О.А. Свитич // Врач. – 2020. – Т. 31. – №5. – С. 85-87.
10. Математические методы обработки данных (онлайн расчёт): сайт: некоммерч. интернет-версия. – URL: <https://medstatistic.ru/calculators/calcmann.html> (дата обращения: 12.05.2023)
11. Особенности стафилококковой микрофлоры кожи у спортсменов разных специализаций / В.А. Заборова, В.Г. Арзуманян, Т.А. Артемьева, Л.М. Бутовченко, К.Г. Гуревич, М.В. Ивкина // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2015. – №1. – С.78-82.
12. Оценка стафилококковой и нелипофильной дрожжевой микрофлоры кожи у больных с кожной патологией при контактном способе посева/ В.Г. Арзуманян, Е.В. Зайцева, Т.И. Кабаева, Р.М. Темпер // Вестник дерматологии и венерологии. – 2004. – № 6. - С.3-6.
13. Патент № 2602298 Российская Федерация, МПК G01N 33/48 (2006.01), C2 (2006.01). Способ определения совокупной активности антимикробных пептидов как маркера состояния местного иммунитета различных эпителиальных тканей: N 2015113069: заявл. 10.04.2015: опубл. 21.10.2016/ Арзуманян В.Г., Мальбахова Е.Т., Фошина Е.П., Артемьева Т.А., Бутовченко Л.М., Вартанова Н.О., Шмелёва О.А. Патентообладатель ФГБНУ НИИВС им. Мечникова // яндекс ру: электрон. справочник патентов России URL: https://yandex.ru/patents/doc/RU2602298C2_20161120 (дата обращения: 12.05.2023).
14. Патент № 2686337 Российская Федерация, МПК G01N 33/50 (2006.01), C1 (2006.01). Способ определения противомикробной активности цельной сыворотки и фракции её антимикробных пептидов: N 2018124240: 03.07.2018: опубл. 25.04.2019 /Арзуманян В.Г., Михайлова Н. А., Артемьева Т. А., Бутовченко Л.М., Вартанова Н. О., Ерофеева Т.В., Костинов М.П., Киселевский М.В.,

- Полищук В.Б. // яндекс ру: электрон. справочник патентов России URL: https://yandex.ru/patents/doc/RU2686337C1_20190425 (дата обращения: 12.05.2023).
15. 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.
 16. Самсонова, А.И. Влияние сроков родоразрешения на содержание лактоферрина в женском молоке / А.И. Самсонова // БМИК. – 2017. – Т. 7. – №5. – С.698.
 17. Современный взгляд на протеом грудного молока / И.В. Мачнева, С.Н. Афонина, И.В. Карнаухова, Е.Н. Лебедева // Журнал ГрГМУ. – 2020. – Т. 18., – № 1. – С. 5-10.
 18. Условно-патогенная микробиота грудного молока и антимикробная активность сыворотки на разных сроках лактации / В. Г. Арзуманян, Т. И. Колыганова, Н. О. Варганова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2023. – Т. 100. – № 1. – С. 74-83.
 19. Absolute quantification of human milk caseins and the whey/casein ratio during the first year of lactation / Y. Liao, D. Weber, W. Xu, B.P. Durbin-Johnson, B.S. Phinney, B. Lönnerdal // J Proteome Res. – 2017. – Vol.16. – №11. – P.4113-4121.
 20. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils / J. Turner, Y. Cho, N.N. Dinh, A.J. Waring, R.I. Lehrer // Antimicrob Agents Chemother. – 1998. – Vol.42. – №9. – P.2206-2214.
 21. Activity of breast milk antimicrobial peptides in experiments in vitro / Т. Kolyganova, V. Arzumanian, O. Svitich, N. Vartanova, V. Zverev, E. Budanova // – 2021. – Vol. 22. – P. 77-83.
 22. Adkins, Y. Potential host-defense role of a human milk vitamin B-12-binding protein, haptocorrin, in the gastrointestinal tract of breastfed infants, as assessed with porcine haptocorrin in vitro/ Y. Adkins, B. Lönnerdal // Am J Clin Nutr. – 2003. – Vol. 77. – № 5. – P. 1234-1240.

23. A folding variant of alpha-lactalbumin with bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* / A. Håkansson, M. Svensson, A.K. Mossberg, H. Sabharwal, S. Linse, I. Lazou, B. Lönnerdal, C. Svanborg // *Mol Microbiol.* – 2000. – Vol.35. – P.589–600.
24. A high confidence, manually validated human blood plasma protein reference set / S. Schenk, G.J. Schoenhals, G. de Souza, M. Mann // *BMC Med Genomics.* – 2008. – Vol.1. – P.41.
25. Alpha-lactalbumin and serum albumin in human milk / T. Nagasawa, I. Kiyosawa, Y. Fukuwatari, T. Kitayama, M. Uechi // *J Dairy Sci.* – 1973. – Vol.56. – №2. – P.177-180.
26. Ambrosoli, R. Content of alpha S1-casein and coagulation properties in goat milk / R. Ambrosoli, L. Di Stasio, P. Mazzocco // *J Dairy Sci.* – 1988. – Vol.71. №1. – P. 24-28.
27. A metagenomic study of diet-dependent interaction between gut microbiota and host in infants reveals differences in immune response / S. Schwartz, I. Friedberg, I.V. Ivanov, L.A. Davidson, J.S. Goldsby, D.B. Dahl, D. Herman, M. Wang, S.M. Donovan, R.S. Chapkin // *Genome Biol.* – 2012. – Vol.13. – №4 – r32.
28. Amoebicidal activity of milk, apo-lactoferrin, sIgA and lysozyme / N. León-Sicairos, F. López-Soto, M. Reyes-López, D. Godínez-Vargas, C. Ordaz-Pichardo, M. de la Garza // *Clin Med Res.* – 2006. – Vol.4. – №2. – P.106-113.
29. A multinational study of alpha-lactalbumin concentrations in human milk / J.G. Jackson, D.B. Janszen, B. Lonnerdal, E.L. Lien, K.P. Pramuk, C.F. Kuhlman // *J Nutr Biochem.* – 2004. – Vol.15. – №9.– P. 517-521.
30. Anderson, R.C. Antimicrobial fragments of the pro-region of cathelicidins and other immune peptides/ R.C. Anderson, M. Rehders, P.L. Yu// *Biotechnol Lett.* – 2008. – Vol.30. – № 5.– P. 813-818.
31. A novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* has dual antimicrobial and immunomodulatory activity / S.G. Javvadi, M. Kujawska, D. Papp,

A.M. Gontarczyk, A. Jordan, A.E. M. Lawson, I. J. O'Neill, C. Alcon-Giner, R. Kiu, P. Clarke, N. Beraza, L. J. Hall // *bioRxiv*. – 2022. – 01.27.477972

32. A novel initiation mechanism of death in *Streptococcus pneumoniae* induced by the human milk protein-lipid complex HAMLET and activated during physiological death / E.A. Clementi, L.R. Marks, M.E. Duffey, A.P. Hakansson // *J Biol Chem*. – 2012. – Vol. 287. – № 32. – P. 27168-27182.

33. Antibacterial and anti-biofilm activity of the human breast milk glycoprotein lactoferrin against group B *Streptococcus* / J. Lu, J.D. Francis, M.A. Guevara, R.E. Moore, S.A. Chambers, R.S. Doster, A.J. Eastman, L.M. Rogers, K.N. Noble, S.D. Manning, S.M. Damo, D.M. Aronoff, S.D. Townsend, J.A. Gaddy // *Chembiochem*. – 2021. – Vol.22. – №12. – P.2124-2133.

34. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin/ W. Bellamy, M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase, M. Tomita // *J Appl Bacteriol*. – 1992. – Vol. 73. – № 6. – P. 472-479.

35. Anticancer activities of bovine and human lactoferricin-derived peptides/ M. Arias, A.L. Hilchie, E.F. Haney, J.G. Bolscher, M.E. Hyndman, R.E. Hancock, H.J. Vogel//*Biochem Cell Biol*. – 2017. – Vol. 95. – №1. P. 91-98.

36. Antifungal action of human cathelicidin fragment (LL13-37) on *Candida albicans* / J.H. Wong, T.B. Ng, A. Legowska, K. Rolka, M. Hui, C.H. Cho // *Peptides*. – 2011. – Vol.32. – №10. – P.1996-2002.

37. Antimicrobial activity and mechanism of the human milk-sourced peptide Casein201 / F. Zhang, X. Cui, Y. Fu, J. Zhang, Y. Zhou, Y. Sun, X. Wang, Y. Li, Q. Liu, T. Chen // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2017. – Vol.485. – №3. – P.698-704.

38. Antimicrobial activity and mechanism of the PDC213, an endogenous peptide from human milk / Y. Sun, Y. Zhou, X. Liu, F. Zhang, L. Yan, L. Chen, X. Wang, H. Ruan, C. Ji, X. Cui, J. Wang // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2017. – Vol.484. – №1. – P.132-137.

39. Antimicrobial effect of human serum IgA / S. Funakoshi, T. Doi, T. Nakajima, T. Suyama, M. Tokuda // *Microbiol Immunol.* – 1982. – Vol.26. – №3. – P.227-239.
40. Antimicrobial peptides as anticancer agents: functional properties and biological activities / A.L. Tornesello, A. Borrelli, L. Buonaguro, F.M. Buonaguro, M.L. Tornesello // *Molecules.* – 2020. – Vol.25. – №12. – P.2850.
41. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk / M. Olivares, M.P. Diaz-Ropero, R. Martin, J.M. Rodriguez, J. Xaus // *Journal of Applied Microbiology.* – 2006. – Vol.101. – №1. – P.72–79.
42. Antimicrobial protein and Peptide concentrations and activity in human breast milk consumed by preterm infants at risk of late-onset neonatal sepsis / S. Trend, T. Strunk, J. Hibbert, C.H. Kok, G. Zhang, D.A. Doherty, P. Richmond, D. Burgner, K. Simmer, D.J. Davidson, A.J. Currie // *PLoS One.* – 2015. – Vol.10. – №2 – e0117038..
43. A peptide antibiotic from human skin / J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, J.M. Schröder // *Nature.* – 1997. – Vol.387. – №6636. – P.861.
44. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR / M.C. Collado, S. Delgado, A. Maldonado, J.M. Rodríguez // *Letters in Applied Microbiology.* – 2009. – Vol.48. – №5. – P. 523–528.
45. Association of maternal microbiota and diet in cord blood cytokine and immunoglobulin profiles / K. Rio-Aige, I. Azagra-Boronat, M. Massot-Cladera, M. Selma-Royo, A. Parra-Llorca, S. González, I. García-Mantrana, M. Castell, M.J. Rodríguez-Lagunas, M.C. Collado, F.J. Pérez Cano // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol.22. – №4. – P.1778.
46. Aureocins 4185, bacteriocins produced by *Staphylococcus aureus* 4185: potential application in food preservation / H. Ceotto, D. Brede, Z. Salehian, S. Nascimento Jdos, P.C. Fagundes, I.F. Nes, C. Bastos Mdo // *Foodborne Pathog Dis.* – 2010. – Vol.7. – №10. – P. 1255-1262.
47. Azwai, S. M. Immunoglobulins of camel (*Camelus dromedarius*) colostrum/ S.M. Azwai, S.D. Carter, Z. Woldehiwet // *Journal of Comparative Pathology.* – 1996. – Vol. 114. – №3. – P. 273–282.

48. Bactericidal action of a complement-independent antibody against relapsing fever *Borrelia* resides in its variable region / T.J. LaRocca, L.I. Katona, D.G. Thanassi, J.L. Benach // *J Immunol.* – 2008. – Vol.180. – №9. – P.6222-6228.
49. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review / F.A. Martinez, E.M. Balciunas, A. Converti, P.D. Cotter, R.P. de Souza Oliveira // *Biotechnol Adv.* – 2013. – Vol.31. – №4.– P.482-488.
50. Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400 / C. Gaspar, G.G. Donders, R. Palmeira-de-Oliveira, J.A. Queiroz, C. Tomaz, J. Martinez-de-Oliveira, A. Palmeira-de-Oliveira // *AMB Express.* – 2018. – Vol.8. – №1– P.50.
51. Ballard, O. Human milk composition: nutrients and bioactive factors/ *Pediatr Clin North Am.* – 2013.- Vol.60.-№1.- P.49-74.
52. Bartlett, J.A. Innate immune functions of the airway epithelium/ J. A. Bartlett, A. J. Fischer, P. B. J. McCray // *Trends in Innate Immunity.* – 2008. – Vol.15 – P.147–163.
53. Baugher, J.L. Invited review: application of omics tools to understanding probiotic functionality/ J.L. Baugher, T.R. Klaenhammer// *J Dairy Sci.* – 2011. – Vol. 94. – P. 4753–4765
54. Becker, K.W. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen / K.W. Becker, E.P. Skaar // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2014. – Vol. 38. – № 6 – P. 1235–1249.
55. Benmeziiane-Derradji, F. Evaluation of camel milk: gross composition—a scientific overview/ F. Benmeziiane-Derradji // *Tropical, Animal and Health Production.* – 2021. – Vol. 53. – №2 – P. 308.
56. Beta-defensin expression in human mammary gland epithelia / C.R. Tunzi, P.A. Harper, B. Bar-Oz, E.V. Valore, J.L. Semple, J. Watson-MacDonell, T. Ganz, S. Ito // *Pediatr Res.* – 2000. – Vol.48. – №1. – P.30-35.
57. Beta-defensin-2 in breast milk displays a broad antimicrobial activity against pathogenic bacteria / J. Baricelli, M. A. Rocafull, D. Vázquez, B. Bastidas, E. Báez-Ramirez, Luz E. Thomas // *Jornal de Pediatria.* – 2014. – Vol. 91. – №1 – P. 36-43.

58. Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus* / D.J. Netz, R. Pohl, A.G. Beck-Sickinger, T. Selmer, A.J. Pierik, C. Bastos Mdo, H.G. Sahl // *J Mol Biol.* – 2002. – Vol.319. – №3. –P.745-756.
59. Biological properties of lactoferrin: an overview / Y. Pan, M. Rowney, P. Guo, P. Hobman // *Australian Journal of Dairy Technology.* – 2007. – Vol.62. – P.31–42.
60. Brandtzaeg, P. Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense/ P. Brandtzaeg // *Front Immunol.* – 2013. – Vol. 46. – № 4. – P. 263-268.
61. Brandtzaeg, P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands/ P. Brandtzaeg // *J Pediatr.* – 2010. – Vol.156. –Suppl. 2. – P. 8-15.
62. Buys, E. M. Enzymes indigenous to milk | Lactoperoxidase / E. M. Buys // *Encyclopedia of Dairy Sciences.* – 2011. – P. 319–323. – ISBN: 978-0-12-374402-9.
63. CAMPR4: a database of natural and synthetic antimicrobial peptides / U. Gawde, S. Chakraborty, F.H. Wagh, R.S. Barai, A. Khandekar, R. Indraguru, T. Shirsat, S. Idicula-Thomas // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – Vol.51. №1. – P.377-383.
64. Chandan, R.C., Parry, R.M., Shahani, K.M. Lysozyme, lipase, and ribonuclease in milk of various species/ R.C. Chandan, R.M. Parry, K.M. Shahani // *J. Dairy Sci.* – 1968. – Vol. 51. – P. 606-607.
65. Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation / P. Montagne, M.L. Cuillière, C. Molé, M.C. Béné, G. Faure // *Adv Exp Med Biol.* – 2001. – Vol.501. – P.241-247.
66. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk / K.M. Hunt, J.A. Foster, L.J. Forney, U.M. Schütte, D.L. Beck, Z. Abdo, L.K. Fox, J.E. Williams, M.K. McGuire, M.A. McGuire // *PLoS One.* – 2011. – Vol.6. – №6 – e21313.
67. Characterisation of whey proteins of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrums / H. El Hatmi, J.M. Girardet, J.L. Gaillard, M.H. Yahyaoui, H. Attia // *Small Ruminant Research.* – 2007. – Vol.70. – P. 267-271.

68. Chemerin and dermcidin in human milk and their alteration in gestational diabetes / S. Ustebay, Y. Baykus, R. Deniz, K. Ugur, S. Yavuzkir, M. Yardim, M. Kalayci, M. Çağlar, S. Aydın // *J Hum Lact.* – 2019. – Vol.35. – №3. – P.550-558.
69. Chemoattraction of macrophages, T-lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family / J. Grigat, A. Soruri, U. Forssmann, J. Riggert, J. Zwirner // *J Immunol.* – 2007. – Vol.179. – №6. – P.3958-3965.
70. Clark, S., Sherbon, J.W. AlphaS1-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk/ Clark S., Sherbon J.W. // *Small Ruminant Research.* – 2000. – Vol.38. – P.123-134.
71. Colostrum immunoglobulins and oxidative capacity may be affected by infant sex and maternal age and parity/ D.S. Kaplan, C. Bağcı, M. Örkmez, Ö. Kömürcü Karuserci, S. Sucu, H. Çelik, S. Taysı // *Turk J Med Sci.* – 2019. – Vol.49. – №1. – P.87-92.
72. Comparison of effects of storage at different temperatures in a refrigerator, upright freezer on top of refrigerator, and deep freezer on the immunoglobulin A concentration and lysozyme activity of human milk / X. Li, P. Siviroj, J. Ruangsuriya, C. Phanpong, W. Sirikul, K. Ongprasert // *Int J Environ Res Public Health.* – 2022. – Vol.19. – №20. – P.13203.
73. Comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide / D. Vandamme, B. Landuyt, W. Luyten, L.A. Schoofs // *Cell Immunol.* – 2012. – Vol.280. – №1. – P.22-35.
74. Concentrations of preptin, salusins and hepcidins in plasma and milk of lactating women with or without gestational diabetes mellitus/ S. Aydın, O. Celik, B. Gurates, I. Sahin, M. Ulas, M. Yilmaz, M. Kalayci, T. Kuloglu, Z. Catak, A. Aksoy A, I.H. Ozercan, S. Kumru//*Peptides.* – 2013. –№49. – P.123-130.
75. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits / W. Claeys, C. Verraes, S. Cardoen, J. De Block, A. Huyghebaert, K. Raes, K. Dewettinck, L. Herman // *Food Control.* – 2014. – Vol. 42. – P. 188-201.

76. Conti, A. Proteomics of Human Milk / A. Conti, M.G., Giuffrida, Cavaletto // Thongboonkerd V. (eds) Proteomics of Human Body Fluids. Humana Press. – 2007. – ISBN 978-1-58829-657-3.
77. Correlation between lactoferrin and beneficial microbiota in breast milk and infant's feces / P. Mastromarino, D. Capobianco, G. Campagna, N. Laforgia, P. Drimaco, A. Dileone, M.E. Baldassarre // *Biometals*. – 2014. – Vol.27. – №5. – P.1077-1086.
78. Daristan, J. Inhibitory effect of breast milk against pediatric bacterial infection / J. Daristan, A. I. Akhter, Abdulilah // *Journal of pure and applied science salahaddin university*. – 2011. – Vol.23. – P.51.
79. Deeth, H. Whey proteins: an overview/ H. Deeth, N. Bansal // *Whey Proteins: from Milk to Medicine*. San Diego: Academic Press, 2019. – 1-50 p. – ISBN 978-0-12812-124-5.
80. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria / M. Rescigno, M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J.-P. Kraehenbuhl., P. Ricciardi-Castagnoli // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol.2. – P.361–367.
81. Detection of dermcidin-derived peptides in sweat by ProteinChip technology / T. Flad, R. Bogumil, J. Tolson, B. Schitteck, C. Garbe, M. Deeg, C.A. Mueller, H. Kalbacher // *J Immunol Methods*. – 2002. – Vol.270. – №1. – P. 53-62.
82. DNA extraction approaches substantially influence the assessment of the human breast milk microbiome / C.A. Douglas, K.L. Ivey, L.E. Papanicolas, K.P. Best, B.S. Muhlhausler, G.B. Rogers // *Sci Rep*. – 2020. – Vol.10. – №1. – P.123.
83. Dobie, K. W. Study of ovine B-lactoglobulin transgene expression in the mouse mammary gland: Ph.D.; University of Edinburgh.: - USA,1996. - 253 p.
84. Donovan, S.M. Human milk proteins: composition and physiological significance / S.M. Donovan // *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*. – 2019. – Vol.90. – P.93-101.

85. Effects of extended freezer storage on the integrity of human milk / A.F. Ahrabi, D. Handa, C.N. Codipilly, S. Shah, J.E. Williams, M.A. McGuire, D. Potak D, G.G. Aharon, R.J Schanler // *J Pediatr.* – 2016. – Vol. 177. – P. 140-143.
86. Effect of lactoperoxidase on the antimicrobial effectiveness of the thiocyanate hydrogen peroxide combination in a quantitative suspension test / A. Welk, C. Meller, R. Schubert, C. Schwahn, A. Kramer, H. Below // *BMC Microbiol.* – 2009. –Vol.9. – P.134.
87. Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk / T.J. Evans, H.C. Ryley, L.M. Neale, J.A. Dodge, V.M. Lewarne // *Arch Dis Child.* – 1978. – Vol.53. – №3. –P.239-41.
88. Effect of the vitamin B12-binding protein haptocorrin present in human milk on a panel of commensal and pathogenic bacteria / H.R. Jensen, M.F. Laursen, D.L. Lildballe, J.B. Andersen, E. Nexø, T.R. Licht // *BMC Res. Notes.* – 2011. – Vol.4. – P.208.
89. Effects of whey protein on calcium and bone metabolism in ovariectomized rats / Y. Takada, N. Kobayashi, K. Kato, H. Matsuyama, M. Yahiro, S. Aoe // *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* – 1997. – Vol.43. – №2. – P.199-210.
90. El-Agamy, E.I. Nutritive and immunological values of camel milk: a comparative study with milk of other species / E.I. El-Agamy, M.A. Nawar // In: *Second International Camelid Conference: Agroeconomics of Camelid Farming, Almaty, Kazakhstan.* – 8–12 September, 2000. –P. 33–45.
91. El-Hatmi H., Camel (*Camelus dromedarius*) immunoglobulin G, alpha-lactalbumin, serum albumin and lactoferrin in colostrum and milk during the early post partum period / H. El-Hatmi H., A. Levieux, D. Levieux // *J Dairy Res.* – 2006. – Vol.73. – №3. –P.288-293.
92. Ellison, R.T. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme / R.T. Ellison, T.J. Giehl // *J Clin Invest.* – 1991. – Vol.88. –P. 1080-1091.
93. Epidemiology and causes of preterm birth // R.L. Goldenberg, J.F. Culhane, J.D. Iams, R. Romero // *Lancet.* – 2008. – Vol.371. – № 9606. – P.75–84.

94. Expression and secretion of cathelicidin antimicrobial peptides in murine mammary glands and human milk / M. Murakami, R.A. Dorschne, L. J. Stern, K.H. Lin, R.L. Gallo // *Pediatric Research*. – 2005. – Vol.57. – №1. – P.10–15.
95. Factors affecting lactoferrin concentration in human milk: how much do we know? / A. Villavicencio, M.S. Rueda, C.G. Turin, T.J. Ochoa // *Biochem Cell Biol*. – 2017. – Vol.95. – №1. – P.12-21.
96. Farnaud, S. Lactoferrin- a multifunctional protein with antimicrobial properties / S. Farnaud, R.W. Evans // *Mol Immunol*. – 2003. – Vol.40. – №7. –P.395-405.
97. Fernandes, K.E. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens / K.E. Fernandes, D.A. Carter // *Front Microbiol*. – 2017. – Vol.8. – P. 2-11.
98. Ganz, T. Heparin- a peptide hormone at the interface of innate immunity and iron metabolism / T. Ganz // *Curr Top Microbiol Immunol*. – 2006. – Vol.306. –P.183-198.
99. Gavin, A. Microbiological characterization of human milk / A. Gavin, K.J. Ostovar // *Food Prot*. – 1977. –Vol.40. – P.614–616.
100. Goldblum, R. The mucosal defense system / R. Goldblum, L.A. Hanson, P. Brandtzaeg – Philadelphia: Saunders: Stiehm E (ed.) *Immunological disorders in infants and children*, 3rd Edn., 1996. – P.159–199.
101. Gunyakti, A. *Lactobacillus gasseri* from human milk with probiotic potential and some technological properties / A. Gunyakti, M.A. Özüsağlam // *LWT*. – 2019. – Vol.109. –P.261–269.
102. Haenlein, G. F. W. Goat milk in human nutrition / G. F. W. Haenlein // *Small Rumin. Res*. – 2004. – Vol.51. – P.155–163.
103. Haschke, F. Nutritive and Bioactive Proteins in Breastmilk / F. Haschke, N. Haiden, S.K. Thakkar // *Ann Nutr Metab*. – 2016. – Vol.69. – Suppl.2. – P.17-26.
104. Hazlett, L. Defensins in innate immunity / L. Hazlett, M. Wu // *Cell Tissue Res*. – 2011. – Vol.343. – №1. – P.175-188.

105. Heikkilä, M.P. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk / M.P. Heikkilä, P.E. Saris // *J Appl Microbiol.* – 2003. – Vol.95. – №3. – P.471-478.
106. Hepcidin as a major component of renal antibacterial defenses against uropathogenic *Escherichia coli* / D. Houamel, N. Ducrot, T. Lefebvre, R. Daher, B. Moulouel, M.A. Sari, P. Letteron, S. Lyoumi, S. Millot, J. Turrett, O. Bouvet, S. Vaulont, A. Vandewalle, E. Denamur, H. Puy, C. Beaumont, L. Gouya, Z. Karim // *J Am Soc Nephrol.* – 2016. – Vol.27. – №3. – P.835-846.
107. High concentrations of haptocorrin interfere with routine measurement of cobalamins in human serum and milk. A problem and its solution / D.L. Lildballe, T.F. Hardlei, L.H. Allen, E. Nexo // *Clin Chem Lab Med.* – 2009. – Vol.47. – №2. – P.182-187.
108. HMBANA. Milk Banking Guidelines. Ref Type: Online Source. URL: <http://www.hmbana.org>. (Application date:13.05.2023).
109. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues / E.V. Valore, C.H. Park, A.J. Quayle, K.R. Wiles, P.B. McCray, T. Ganz // *J Clin Invest.* – 1998.– Vol. – 101. – №8. – P.1633-1642.
110. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung/ R. Bals, X. Wang, Z. Wu, T. Freeman, V. Bafna, M. Zasloff, J.M. Wilson// *J Clin Invest.* – 1998. – Vol. 102. – №5. – P. 874-880.
111. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation / J. Overhage, A. Campisano, M. Bains, E.C. Torfs, B.H. Rehm, R.E. Hancock // *Infect Immun.* – 2008. – Vol.76. – №9. – P.4176-4182.
112. Human lysozyme (origin and distribution in health and disease) / S. Reitamo, M. Klockars, M. Adinolfi, E.F. Osserman // *Ric Clin Lab.* – 1978. – Vol.8. – №4. – P.211-31.
113. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut / R. Martín, S. Langa, C. Reviriego, E. Jiménez, M.L. Marín, J. Xaus, L. Fernández, J.M. Rodríguez // *Journal of Pediatrics.* – 2003. – Vol.143. – P.754-758.

114. Human milk kappa-casein and inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucosa / M. Strömqvist, P. Falk, S. Bergström, L. Hansson, B. Lönnerdal, S. Normark, O. Hernell // *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* – 1995. – Vol.21. – №3. –P.288-296.
115. Human milk proteins and their glycosylation exhibit quantitative dynamic variations during lactation / E. Goonatileke, J. Huang, G. Xu, L. Wu, J.T. Smilowitz, J.B. German, C.B. Lebrilla // *J Nutr.* – 2019. – Vol.149. – №8. – P.1317-1325.
116. Human plasma R-type vitamin B12-binding proteins. II. The role of transcobalamin I, transcobalamin III, and the normal granulocyte vitamin B12-binding protein in the plasma transport of vitamin B12 / R.L. Burger, R.J. Schneider, C.S. Mehlman, R.H. Allen // *J Biol Chem.* – 1975. – Vol. 250. – №19. – P. 7707-7713.
117. Humoral defence factors in the breast milk of Ethiopian women with leprosy and healthy controls. / M. E. Duncan, R.R. Samson, J. McGrath, D.B. McClelland // *The American Journal of Clinical Nutrition.* – 1983. – Vol.38. – №6. –P.921–928.
118. Ighanesebhor, S.E. In vitro activity of human milk against the causative organisms of ophthalmia neonatorum in Benin City, Nigeria / S.E. Ighanesebhor, E.S. Otodo // *J Trop Pediatr.* – 1996. – Vol.42. – №6. –P.327-329.
119. Ibrahim, H. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action / H. Ibrahim, U. Thomas, A. Pellegrini // *Journal of Biological Chemistry.* – 2001. – Vol.276. – №47. – P.43767-43774
120. Identification of a bacteriocin-like compound from *Lactobacillus plantarum* with antimicrobial activity and effects on normal and cancerogenic human intestinal cells / A. De Giani, F. Bovio, M. Forcella, P. Fusi, G. Sello, P. Di Gennaro // *AMB Express.* – 2019. – Vol. 9. – №1. – P.88.
121. Identification of human β -defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia / T. Hiratsuka, M. Nakazato, Y. Date, J. Ashitani, T. Minematsu, N. Chino, S. Matsukura // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1998. – Vol.249. – P.943–947.

122. Identification of sociodemographic and clinical factors associated with the levels of human β -defensin-1 and human β -defensin-2 in the human milk of Han Chinese / X.F. Wang, R.M. Cao, J. Li, J. Wu, S.M. Wu, T.X. Chen // *Br J Nutr.* – 2014. – Vol.111. – №5. – P.867-874.
123. Immunologic factors in human milk: the effects of gestational age and pasteurization / A. Koenig, E.M. de Albuquerque Diniz, S.F. Barbosa, F.A. Vaz // *J Hum Lact.* – 2005. – Vol.21. – №4. – P.439-443.
124. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota / P. Khodayar-Pardo, L. Mira-Pascual, M.C. Collado, C. Martínez-Costa // *J Perinatol.* – 2014. – Vol.34. – №8. – P.599-605.
125. Impact of pasteurization on the antibacterial properties of human milk / M. Van Gysel, V. Cossey, S. Fieuws, A. Schuermans // *Eur J Pediatr.* – 2012. – Vol.171. – №8. – P.1231-1237.
126. Increasing number of implantation failures and pregnancy losses associated with elevated Th1/Th2 cell ratio / K. Kuroda, K. Nakagawa, T. Horikawa, A. Moriyama, Y. Ojio, S. Takamizawa, A. Ochiai, Y. Matsumura, Y. Ikemoto, K. Yamaguchi, R. Sugiyama // *Am J Reprod Immunol.* – 2021. – Vol.86. – №3. – e13429
127. Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections / A.S. Kvistgaard, L.T. Pallesen, C.F. Arias, S. López, T.E. Petersen, C.W. Heegaard, J.T. Rasmussen // *J Dairy Sci.* – 2004. – Vol.87. – №12. – P.4088-4096.
128. Inhibition of pathogenic bacteria by camel's milk: relation to whey lysozyme and stage of lactation/ E.K. Barbour, N.H. Nabbut, W.M. Frerichs, H.M. Al-Nakhli // *J Food Prot.* – 1984. – Vol.47. – №11. – P. 838-840.
129. Investigation into the antimicrobial action and mechanism of a novel endogenous peptide β -casein 197 from human milk / Y. Fu, C. Ji, X. Chen, X. Cui, X. Wang, J. Feng, Y. Li, R. Qin, X. Guo // *AMB Express.* – 2017. – Vol.7. – №1. – P.119.
130. In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 2 against nosocomial strains / J.G. Routsias, P. Karagounis, G. Parvulesku, N.J. Legakis, A. Tsakris // *Peptides.* – 2010. Vol.31. – №9. – P.1654-1660.

131. In vitro digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: research on biological functions / D.E.W. Chatterton, J.T. Rasmussen, C.W. Heegaard, E.S. Sorensen, T.E. Petersen // *Trends in Food Science & Technology*. – 2004. – Vol.15. – P. 373–383.
132. Isolation, biochemical characterization, and cloning of a bacteriocin from the poultry-associated *Staphylococcus aureus* strain CH-91 / B. Wladyka, K. Wielebska, M. Wloka, O. Bochenska, G. Dubin, A. Dubin, P. Mak // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2013. – Vol.97. – №16. – P.7229-7239.
133. Jauregui-Adell, J. Heat stability and reactivation of mare milk lysozyme / J. Jauregui-Adell // *J Dairy Sci*. – 1975. – Vol.58. – №6. – P.835-838.
134. Jennes, R. Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979 / R. Jennes // *Journal of Dairy Science*. – 1980. – Vol.63. – №10. – P.1605-1630.
135. Kavishwar, A. Candidacidal activity of a monoclonal antibody that binds with glycosyl moieties of proteins of *Candida albicans* / A. Kavishwar, P.K. Shukla // *Medical Mycology*. – 2006. – Vol.44. – №2. – P.159–167.
136. Korhonen, H.J. Bovine milk immunoglobulins against microbial human diseases / H.J. Korhonen, P. Marnila, H.J. Korhonen, P. Marnila // *Dairy-Derived Ingredients*. – 2009. –P.269–289.
137. Lactoferrin for prevention of neonatal sepsis / C.G. Turin, A. Zea-Vera, A. Pezo, K. Cruz, J. Zegarra, S. Bellomo, L. Cam, R. Llanos, A. Castañeda, L. Tucto, T.J. Ochoa // *Biometals*. – 2014. – Vol.27. №5. – P.1007-1016.
138. Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk /Y. Andersson, S. Lindquist, C. Lagerqvist, O. Hernell // *Early Human Development*. – 2000. – Vol. 59 – №2. – P. 95–105.
139. Lactoferrin levels in human milk after preterm and term delivery / M. Albenzio, A. Santillo, I. Stolfi, P. Manzoni, A. Iliceto, M. Rinaldi, R. Magaldi // *Am J Perinatol*. – 2016. – Vol.33. – № 11.– P. 1085-1090.
140. Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol.227. – P. 680 – 685.

141. Latuga, M.S. A review of the source and function of microbiota in breast milk / M.S. Latuga, A. Stuebe, P.C. Seed // *Semin Reprod Med.* – 2014. – Vol.32. – №1. – P.68-73.
142. Legrand, D. Lactoferrin, a key molecule in immune and inflammatory processes / D. Legrand // *Biochem Cell Biol.* – 2012. – Vol.90. – №3. – P.252-268.
143. Lehrer, R.I. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells / R.I. Lehrer, A.K. Lichtenstein, T. Ganz // *Annu Rev Immunol.* – 1993. – Vol.11. – №105-128.
144. Leitch, E.C. Synergic antistaphylococcal properties of lactoferrin and lysozyme / E.C. Leitch, M.D. Willcox // *J Med Microbiol.* – 1998. – Vol.47. – №9. – P.837-842.
145. Lepage, P. The immune system of breast milk: antimicrobial and anti-inflammatory properties / P. Lepage, P. Van de Perre // *Adv Exp Med Biol.* – 2012. – Vol.743. – P.121-137.
146. Longitudinal changes in lactoferrin concentrations in human milk: a global systematic review / D. Rai, A.S. Adelman, W. Zhuang, G.P. Rai, J. Boettcher, B. Lönnerdal // *Crit Rev Food Sci Nutr.* – 2014. – Vol.54. – №12. – P.1539-1547.
147. Lönnerdal, B. Nutritional and physiologic significance of alpha-lactalbumin in infants / B. Lönnerdal, E.L. Lien // *Nutr Rev.* – 2003. – Vol.61. – №9. – P.295-305.
148. Lysozyme in the feeding of premature infants with mixed pathology / A.M. Bol'shakova, E.G. Shcherbakova, S.D. Ivanova, M.M. Medvedeva, T.P. Zhuravleva // *Antibiotiki.* – 1984. – Vol. 29. – P. 784–790.
149. Major proteins in goat milk: an updated overview on genetic variability / M. Selvaggi, V. Laudadio, C. Dario, V. Tufarelli // *Mol Biol Rep.* – 2014. – Vol.41. – №2. – P.1035-1048.
150. Mantis, N.J. Oligosaccharide side chains on human secretory IgA serve as receptors for ricin / N.J. Mantis, S.A. Farrant, S. Mehta // *J Immunol.* – 2004. – Vol.172. – №11. – P.6838-6845.

151. Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species/ K. Potocnik, V. Gantner, K. Kuterovac and A. Cividini / *Mljekarstvo*. – 2011. – Vol. 61 – №2. – P.107-113,
152. Mare's milk: composition, properties, and application in medicine / A. Musaev, S. Sadykova, A. Anambayeva, M. Saizhanova, G. Balkanay, M. Kolbaev // *Arch Razi Inst*. – 2021. – Vol.76. – №4. – P.1125-1135.
153. Marks, L.R. The human milk protein-lipid complex HAMLET sensitizes bacterial pathogens to traditional antimicrobial agents / L.R. Marks, E.A. Clementi, A.P. Hakansson // *PLoS One*. – 2012. – Vol.7. – №8. – e43514.
154. Mass spectrometric characterization of human serum albumin dimer: A new potential biomarker in chronic liver diseases / M. Naldi, M. Baldassarre, M. Nati, M. Laggetta, F.A. Giannone, M. Domenicali, M. Bernardi, P. Caraceni, C. Bertucci // *J. Pharm Biomed Anal*. – 2015. – Vol.112. – P.169-175.
155. Mastitis and immunological factors in breast milk of lactating women in Malawi / R.D. Semba, N. Kumwenda, T.E. Taha, D.R. Hoover, Y. Lan, W. Eisinger, L. Mtimavalye, R. Broadhead, P.G. Miotti, L. Van Der Hoeven, J.D. Chipangwi // *Clin Diagn Lab Immunol*. – 1999. – Vol.6. – №5. – P.671-674.
156. McCray, P.B Jr. Human airway epithelia express a beta-defensin / P.B. Jr McCray, L. Bentley // *Am J Respir Cell Mol Biol*. – 1997. – Vol.16. – №3. – P.343-349.
157. McMahan, D.J. Supramolecular structure of the casein micelle / D.J. McMahan, B.S. Oommen // *J Dairy Sci*. – 2008. – Vol.91. – №5. – P.1709-1721.
158. Mestecky, J. Specific antibody activity, glycan heterogeneity and polyreactivity contribute to the protective activity of S-IgA at mucosal surfaces / J. Mestecky, M.W. Russell // *Immunol Lett*. – 2009. – Vol.124. – №2. – P.57-62.
159. Microbial Community Dynamics in Mother's Milk and Infant's Mouth and Gut in Moderately Preterm Infants/ E. Biagi, A. Aceti, S. Quercia, I. Beghetti, S. Rampelli, S. Turrone, M. Soverini, A.V. Zambrini, G. Faldella, M. Candela, L. Corvaglia, P. Brigidi // *Front Microbiol*. – 2018. – Vol. 9. – P.1–10.

160. Microbiota network and mathematic microbe mutualism in colostrum and mature milk collected in two different geographic areas: Italy versus Burundi. / L. Drago, M. Toscano, R. De Grandi, E. Grossi, E.M. Padovani, D.G. Peroni // *ISME J.* – 2017. – Vol.11. – №4. –P.875-884.
161. Microbiota of human precolostrum and its potential role as a source of bacteria to the infant mouth / L. Ruiz, R. Bacigalupe, C. García-Carral, A. Boix-Amoros, H. Argüello, C.B. Silva, M. de Los Angeles Checa, A. Mira, J.M. Rodríguez // *Sci Rep.* – 2019. – Vol.9. – P. 8435.
162. Milk- and solid-feeding practices and daycare attendance are associated with differences in bacterial diversity, predominant communities, and metabolic and immune function of the infant gut microbiome / A.L. Thompson, A. Monteagudo-Mera, M.B. Cadenas, M.L. Lampl, M.A. Azcarate-Peril // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2015. – Vol.5. – №3.
163. Milk fat globule glycoproteins in human milk and in gastric aspirates of mother's milk-fed preterm infants / J.A. Peterson, M. Hamosh, C.D. Scallan, R.L. Ceriani, T.R. Henderson, N.R. Mehta, M. Armand, P. Hamosh // *Pediatr Res.* – 1998. – Vol.44. – №4. – P.499-506.
164. Monks, J. Albumin transcytosis across the epithelium of the lactating mouse mammary gland / J. Monks, M.C. Neville // *J Physiol.* – 2004. – Vol.560. – №1. – P.267-80.
165. Morrow, A.L. Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care / A.L. Morrow, J.M. Rangel // *Semin Pediatr Infect Dis.* – 2004. – Vol.15. – №4. – P.221-228.
166. Mycobiome profiles in breast milk from healthy women depend on mode of delivery, geographic location, and interaction with bacteria/ A. Boix-Amorós, F. Puente-Sánchez, E. du Toit, K.M. Linderborg, Y. Zhang, B. Yang, S. Salminen, E. Isolauri, J. Tamames, A. Mira, M.C. Collado // *Appl Environ Microbiol.* – 2019. – Vol.85. – №9. – e02994-18.

167. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 134611881, antibacterial protein LL-37. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/antibacterial-protein-LL-37>. (Application date:13.05.2023).
168. Neonatal small bowel epithelia: Enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and Lactobacillus GG / M.P. Sherman, S.H. Bennett, F.F. Hwang, C. Yu // *Biometals*. – 2004. – Vol.17. – P.285–289.
169. Nes, I.F. Bacteriocin diversity in Streptococcus and Enterococcus / I.F. Nes, D.B. Diep, H. Holo // *J Bacteriol*. – 2007. – Vol.189. – №4. – P.1189-1198.
170. Novel bacteriocin from lactobacillus pentosus ZFM94 and its antibacterial mode of action/ M. Dai, Y. Li, L. Xu, D. Wu, Q. Zhou, P. Li, Q.A. Gu // *Front Nutr*. – 2021. – Vol.8. – 710862.
171. Nur Sofuwani, Z.A. Benefit of lactose concentration between goat's milk and commercialized powder milk / Z.A. Nur Sofuwani, H. Siti Aslina, M.K. Siti Mazlina // *J Food Process Technol*. – 2017. – Vol.8. – P. 682.
172. Ogawa, H. Isolation and characterization of human skin lysozyme / H. Ogawa, H. Miyazaki, M. Kimura // *J Invest Dermatol*. – 1971. – Vol.57. – №2. – P.111-116.
173. Ojo-Okunola, A. Human Breast Milk Bacteriome in Health and Disease / A. Ojo-Okunola, M. Nicol, E. Du Toit // *Nutrients*. – 2018. – Vol.10. – P.1643.
174. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application / Y. Li, Q. Xiang, Q. Zhang, Y. Huang, Z. Su // *Peptides*. – 2012. – Vol.37. – № 2. – P.207-215.
175. Palmeira, P. Immunology of breast milk / P. Palmeira, M. Carneiro-Sampaio // *Rev Assoc Med Bras*. – 2016. – Vol.62. – №6. – P.584-593.
176. Park, Y.W. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk / Y.W. Park // *Small Ruminant Research*. – 1994. – Vol.14. – P.151–159.
177. Park, Y.W. Milk and dairy products in human nutrition / Y.W. Park, G.F.W. Haenlein G.F.W. – UK: Wiley-Blackwell, 2013. – 728 p.– ISBN: 978-0-470-67418-5.

178. Park, Y.W. Overview of bioactive components in milk and dairy products / Y.W. Park – England: Bioactive Components in Milk and Dairy Products. Wiley-Blackwell Publishers, John Wiley & Sons, Ltd., Publication, 2009. – 439 p. – ISBN 978-0-8138-1982-2.
179. Parr, E.L. Purification and measurement of secretory IgA in mouse milk / E.L. Parr, J.J. Bozzola, M.B. Parr // *J Immunol Methods*. – 1995. – Vol.180. – №2. – P.147-157.
180. Pastuszka, R. Allergenicity of milk of different animal species in relation to human milk / R. Pastuszka, J. Barłowska, Z. Litwińczuk // *Postepy Hig Med Dosw*. – 2016. – Vol.70. – P.1451-1459.
181. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk / Y.W. Park, M. Juárez, M. Ramos, G.F.W. Haenlein // *Small Ruminant Research*. – 2007. – Vol.68. – P.88–113.
182. Physico-chemical quality of camel's milk / M. Khaskheli, M.A. Arain, S. Chaudhry, A.H. Soomro, T.A. Qureshi // *J. Agric. Soc. Sci*. – 2005. – Vol.2. – P.164–166.
183. Physiological secretion of chemokines in human breast milk / C.A. Michie, E. Tantscher, T. Schall, A. Rot // *Eur Cytokine Netw*. – 1998. – Vol.9. – №2. – P.123-129.
184. Pihlanto, A. Bioactive peptides and proteins / A. Pihlanto, H. Korhonen // *Adv Food Nutr Res*. – 2003. – Vol.47. – P.175-276.
185. Potentiation of polarized intestinal Caco-2 cell responsiveness to probiotics complexed with secretory IgA / A. Mathias, M. Duc, L. Favre, J. Benyacoub, S. Blum, B. Corthésy // *J Biol Chem*. – 2010. – Vol.285. – №44. – P.33906-33913.
186. Prevention of mother-to-child transmission of infections during pregnancy: implementation of recommended interventions, United States, 2003-2004 / E.H.A. Koumans, J. Rosen, M.K. Van Dyke, E. Zell, C.R. Phares, A. Taylor, J. Loft, S. Schrag // *Am. J. Obstet. Gynecol*. – 2012. – Vol.206. – №2. – 158.e1-158.e11.

187. Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk / M. Malacarne, F. Martuzzi, A. Summer, P. Mariani // *Int Dairy J.* – 2002. – Vol.12. – №11. – P.869-877.
188. Protein complex from human milk enhances the activity of antibiotics and drugs against *Mycobacterium tuberculosis* / V. Meikle, A.K. Mossberg, A. Mitra, A.P. Hakansson, M.A. Niederweis // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2019. – Vol.63. – №2. – e01846-18.
189. Proteomics as a tool to explore human milk in health and disease / P. Roncada, L.H. Stipetic, L. Bonizzi, R.J. Burchmore, M.W. Kennedy // *J Proteomics.* – 2013. – Vol.88. – P.47-57.
190. Purification, characterization, and inhibition sensitivity of peroxidase from wheat (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*)/S. Altın, H. Tohma, I. Gülçin, E. Köksal// *International Journal of Food Properties.* – 2016. – Vol.20. – № 9. – P. 1949–1959.
191. Ramsey, K.H. The in vitro antimicrobial capacity of human colostrum against *Chlamydia trachomatis* / K.H. Ramsey, C.E. Poulsen, P.P. Motiu // *J Reprod Immunol.* – 1998. – Vol.38. – №2. – P.155-167.
192. Refrigerator storage of expressed human milk in the neonatal intensive care unit / M. Slutzah, C.N. Codipilly, D. Potak, R.M. Clark, R.J. Schanler // *J Pediatr.* – 2010. – Vol.156. – №1. – P.26-28.
193. Repertoire of human breast and milk microbiota: a systematic review / A. Togo, J.C. Dufour, J.C. Lagier, G. Dubourg, D. Raoult, M. Million // *Future Microbiol.* – 2019. –Vol.14. – P.623-641.
194. Reviewing the evidence on breast milk composition and immunological outcomes / A. Boix-Amorós, M.C. Collado, B. Van't Land, A. Calvert, K. Le Doare, J. Garssen, H. Hanna, E. Khaleva, D.G. Peroni, D.T. Geddes, A.L. Kozyrskyj, J.O. Warner, D. Munblit // *Nutr Rev.* – 2019. – nuz019.
195. Revisiting the conformational state of albumin conjugated to gold nanoclusters: A self-assembly pathway to giant superstructures unraveled / M. Kluz, H. Nieznańska, R.

- Dec, I. Dziecielewski, B. Niżyński, G. Ścibisz, W. Puławski, G. Staszczak, E. Klein, J. Smalc-Koziorowska, W. Dzwolak // *PLoS One*. – 2019. – Vol.14. – №6. – e0218975.
196. Rodrigues, G. Antimicrobial peptides controlling resistant bacteria in animal production / G. Rodrigues, L. Souza Santos, O.L. Franco // *Front Microbiol*. – 2022. – Vol.13. – 874153.
197. Rodríguez, J.M. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? / J.M. Rodríguez // *Adv Nutr*. – 2014. – Vol.5. – №6. – P.779-784.
198. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection / D.S. Newburg, J.A. Peterson, G.M. Ruiz-Palacios, D.O. Matson, A.L. Morrow, J. Shults, M.L. Guerrero, P. Chaturvedi, S.O. Newburg, C.D. Scallan, M.R. Taylor, R.L. Ceriani, L.K. Pickering // *Lancet*. – 1998. – Vol.351. – №9110. – P.1160-1164.
199. Role of IgA in the early-life establishment of the gut microbiota and immunity: Implications for constructing a healthy start / J. Guo, C. Ren, X. Han, W. Huang, Y. You, J. Zhan // *Gut Microbes*. – 2021. – Vol.13. – №1. – P.1-21.
200. Rudney, J.D. Relationships between levels of lysozyme, lactoferrin, salivary peroxidase, and secretory immunoglobulin a in stimulated parotid saliva / J.D. Rudney, Q.T. Smith // *Infection and immunity*, –1985. – Vol. 49. – №.3. – P.469-475
201. Rutherford-Markwick, K.J. Bioactive peptides derived from food / K.J. Rutherford-Markwick, P.J. Moughan P.J. // *Journal of AOAC International*. – 2005. – Vol.88. – P.955–966.
202. Safety and tolerability of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11)/ W.J. Velden, T.M. van Iersel, N.M. Blijlevens, J.P. Donnelly // *BMC Med*. – 2009. –Vol.7. – P.44.
203. Sakwinska, O. Host microbe interactions in the lactating mammary gland / O. Sakwinska, N. Bosco // *Front Microbiol*. – 2019. – Vol.10. – P.1863.

204. Santos, L.H. Quantification of alpha-lactalbumin in human milk: method validation and application / L.H. Santos, I.M. Ferreira // *Anal Biochem.* – 2007. – Vol.362. – №2. – P.293-295.
205. Schitteck, B. The multiple facets of dermcidin in cell survival and host defense / B. Schitteck // *J Innate Immun.* – 2012. – Vol.4. – №4. – P.349-360.
206. Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. / E.W. Rogier, A.L. Frantz, M.E. Bruno, L. Wedlund, D.A. Cohen, A.J. Stromberg, C.S. Kaetzel // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2014. – Vol.111. – №8. – P.3074-3079.
207. Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum / M.D. Howell, J.F. Jones, K.O. Kisich, J.E. Streib, R.L. Gallo, D.Y. Leung // *J Immunol.* – 2004. – Vol.172. – №3. – P.1763-1767.
208. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces / V. Martín, A. Maldonado-Barragán, L. Moles, M. Rodriguez-Baños, R.D. Campo, L. Fernández, J.M. Rodríguez, E. Jiménez // *J Hum Lact.* – 2012. – Vol.28. – №1. – P.36-44.
209. Sharma, D. Role of lactoferrin in neonatal care: A systematic review / D. Sharma, S. Shastri, P. Sharma // *J. Matern. Neonatal Med.* – 2017. – Vol.30. – P.1920–1932.
210. Shin, K. Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immunoabsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase / K. Shin, H. Hayasawa, B. Lönnerdal // *Am J Clin Nutr.* – 2001. – Vol.73. – №5. – P.984-989.
211. Staphylococcal-produced bacteriocins and antimicrobial peptides: their potential as alternative treatments for *Staphylococcus aureus* infections / L.L. Newstead, K. Varjonen, T. Nuttall, G.K. Paterson // *Antibiotics (Basel).* – 2020. – Vol.9. – №2. – P.40.
212. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants / E. Jiménez, S. Delgado, A. Maldonado, R. Arroyo, M. Albújar, N. García, M. Jarrod, L. Fernández, A. Gómez, J.M. Rodríguez // *BMC Microbiol.* – 2008. – Vol.8. – №143. – P.143

213. Storage of human breast milk / E. Larson, R. Zuill, V. Zier, B. Berg // *Infect Control*. – 1984. – Vol.5. – №3. – P.127-130.
214. Strong multivariate relations exist among milk, oral, and fecal microbiomes in mother-infant dyads during the first six months postpartum / J.E. Williams, J.M. Carrothers, K.A. Lackey, N.F. Beatty, S.L. Brooker, H.K. Peterson, K.M. Steinkamp, M.A. York, B. Shafii, W.J. Price, M.A. McGuire, M.K. McGuire // *J Nutr*. – 2019. – Vol.149. – №6. – P.902-914.
215. Structure-activity analysis of the dermcidin-derived peptide DCD-1L, an anionic antimicrobial peptide presents in human sweat / M. Paulmann, T. Arnold, D. Linke, S. Özdirekcan, A. Kopp, T. Gutschmann, H. Kalbacher, I. Wanke, V.J. Schuenemann, M. Habeck, J. Bürck, A.S. Ulrich, B. Schitteck // *J Biol Chem*. – 2012. – Vol.287. – №11. – P.8434-8443.
216. Structure of human apolactoferrin at 2.0 Å resolution. Refinement and analysis of ligand-induced conformational change / G.B. Jameson, B.F. Anderson, G.E. Norris, D.H. Thomas, E.N. Baker // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. – 1998. Vol.54. – P. 1319-1335.
217. Synergistic anti-candida activities of lactoferrin and the lactoperoxidase system / M. Nakano, M. Suzuki, H. Wakabayashi, K. Hayama, K. Yamauchi, F. Abe, S. Abe // *Drug Discov Ther*. – 2019. – Vol.13. – №1. – P.28-33.
218. Tafes, A. G. Compositional and technological properties of goat milk and milk products / A. G. Tafes // *Concepts of Dairy & Veterinary Sciences*. – 2020. – Vol.3. – №3. – P.295-300.
219. Takayama, Y. Roles of lactoferrin on skin wound healing / Y. Takayama, R. Aoki // *Biochem Cell Biol*. – 2012. – Vol.90. – №3. – P.497-503.
220. Technical note: Milk composition in mice--methodological aspects and effects of mouse strain and lactation day / S. Görs, M. Kucia, M. Langhammer, P. Junghans, C.C. Metges // *J Dairy Sci*. – 2009. – Vol.92. – №2. – P.632-637.
221. Telemo, E. Antibodies in milk / E. Telemo, L.A. Hanson // *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. – 1996. – Vol.1. – №3 – P.243-249.

222. Temporal changes of major protein concentrations in preterm and term human milk. A prospective cohort study / C.L. Garcia-Rodenas, C.A. De Castro, R. Jenni, S.K. Thakkar, L. Beauport, J.F. Tolsa, C.J. Fischer-Fumeaux, M. Affolter // *Clin Nutr.* – 2019. – Vol.38. – №4. – P.1844-1852.
223. Tenovuo, J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety / J. Tenovuo // *Oral Diseases.* – 2002. – Vol.8. – P.23-29.
224. The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans* / Y.H. Samaranayake, L.P. Samaranayake, P.C. Wu, M. So // *APMIS.* – 1997. – Vol.105. – №11. – P.875–883.
225. The bactericidal effect of a complement-independent antibody is osmolytic and specific to *Borrelia* / T.J. LaRocca, D.J. Holthausen, C. Hsieh, C. Renken, C.A. Mannella, J.L. Benach // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2009. – Vol. 106. – №26. – P. 10752-10757
226. The effect of processing and storage on key enzymes, B vitamins, and lipids of mature human milk. I. Evaluation of fresh samples and effects of freezing and frozen storage / B.A. Friend, K.M. Shahani, C.A. Long, L.A. Vaughn // *Pediatr Res.* – 1983. – Vol.17. – №1. – P.61-64.
227. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation / G. Nicolas, C. Chauvet, L. Viatte, J.L. Danan, X. Bigard, I. Devaux, C. Beaumont, A. Kahn, S. Vaulont // *J Clin Invest.* – 2002. – Vol.110. – №7. – P.1037-1044.
228. The hidden universe of human milk microbiome: origin, composition, determinants, role, and future perspectives / A. Consales, J. Cerasani, G. Sorrentino, D. Morniroli, L. Colombo, F. Mosca, M.L. Gianni // *Eur J Pediatr.* – 2022. – Vol.181. – №5.– P.1811-1820.
229. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery/ R. Cabrera-Rubio, M.C. Collado, K. Laitinen, S.

Salminen, E. Isolauri, A. Mira // *Am J Clin Nutr.* – 2012. – Vol. 96. – № 3. – P. 544-551.

230. The human milk microbiome: who, what, when, where, why, and how? / L.F. Stinson, A.S.M. Sindi, A.S. Cheema, C.T. Lai, B.S. Mühlhäusler, M.E. Wlodek, M.S. Payne, D.T. Geddes // *Nutr Rev.* – 2021. – Vol.79. – №5. – P.529-543.

231. The identification of a low molecular mass bacteriocin, rhamnosin A, produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain 68 / R. Dimitrijević, M. Stojanović, I. Zivković, A. Petersen, R.M. Jankov, L. Dimitrijević, M. Gavrović-Jankulović // *J Appl Microbiol.* – 2009. – Vol.107. – №6. – P.2108-2115.

232. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks / P. Martin, M. Szymanowska, L. Zwierzchowski, C. Leroux // *Reproduction Nutrition Development.* – 2002. – Vol.42. – P.433–459.

233. The importance of human milk for immunity in preterm infants / E.D. Lewis, C. Richard, B.M. Larsen, C.J. Field // *Clin Perinatol.* – 2017. – Vol.44. – №1. – P.23-47.

234. The major protein fraction of mouse milk revisited using proven proteomic tools / N. Boumahrou, S. Andrei, G. Miranda, C. Henry, J.J. Panthier, P. Martin, S. Bellier // *J Physiol Pharmacol.* – 2009. – Vol. 60. – Suppl. 3. – P.113-118.

235. The profile of human milk metabolome, cytokines, and antibodies in inflammatory bowel diseases versus healthy mothers, and potential impact on the newborn / X. Meng, G. Dunsmore, P. Koleva, Y. Elloumi, R.Y. Wu, R.T. Sutton, L. Ambrosio, N. Hotte, V. Nguyen, K.L. Madsen, L.A. Dieleman, H. Chen, V. Huang, S. Elahi // *J Crohns Colitis.* – 2019. – Vol.13. – №4. – P.431-441.

236. The role of breast-feeding in infant immune system: a systems perspective on the intestinal microbiome / P. Praveen, F. Jordan, C. Priami, M.J. Morine // *Microbiome.* – 2015. – Vol.3. – P.41.

237. Transient suppression of *Shigella flexneri* type 3 secretion by a protective O-antigen-specific monoclonal IgA / S.J. Forbes, T. Bumpus, E.A. McCarthy, B. Corthésy, N.J. Mantis // *mBio.* – 2011. – Vol.2. – №3. – e00042-11.

238. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of Lactobacilli isolated from breast milk/ R. Arroyo, V. Martín, A. Maldonado, E. Jiménez, L. Fernández, J.M. Rodríguez// *Clin Infect Dis.* – 2010. – Vol.50. – №12– P. 1551-1558.
239. Valenti, P. Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack / P. Valenti, G. Antonini // *Cell Mol Life Sci.* – 2005. – Vol.62. – №22. – P.2576-2587.
240. Validation of an in vitro digestive system for studying macronutrient decomposition in humans / K.A. Kopf-Bolan, F. Schwander, M. Gijs, G. Vergères, R. Portmann, L. Egger // *J Nutr.* – 2012. – Vol.142. – №2. – P.245-250.
241. Variability of serum proteins in chinese and dutch human milk during lactation / M. Elwakiel, S. Boeren, J.A. Hageman, I.M. Szeto, H.A. Schols, K.A. Hettinga // *Nutrients.* – 2019. – Vol.11. – №3. – P. 499.
242. Wada, Y. Bioactive peptides derived from human milk proteins- mechanisms of action / Y. Wada, B. Lönnerdal // *J Nutr Biochem.* – 2014. – Vol.25. – №5. – P.503-514.
243. Wang, G. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activities of antimicrobial peptides derived from human and bovine cathelicidins / G. Wang, K.M. Watson, R.W. Buckheit // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2008. – Vol.52. – №9. – P.3438-3440.
244. Weinberg, E.D. Nutritional immunity. Host's attempt to withhold iron from microbial invaders / E.D. Weinberg // *JAMA.* – 1975. – Vol.231. – №1. – P.39–41.
245. Xie, X. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity- and complement-dependent cytotoxicity-independent bactericidal activity of an IgG against *Pseudomonas aeruginosa* O6ad. / X. Xie, M.D. McLean, J.C. Hall // *J Immunol.* – 2010. – Vol.184. – №7. – P.3725-3733.
246. Yoganandi, J. B. M. Evaluation and comparison of camel milk with cow milk and buffalo milk for gross composition / J. B. M. Yoganandi, K.N. Mehta, K. D A. Wadhvani // *Journal of Camel Practice and Research.* – 2015. – Vol.21. – №2.– P.259-265

247. Zhao, C. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells / C. Zhao, I. Wang, R.I. Lehrer // FEBS Lett. – 1996. – Vol.396. – P.319-322
248. Zimmermann, P. Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition / P. Zimmermann, N. Curtis // J Infect. – 2020. – Vol.81. – №1. – P.17-47.