

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Арзуманян В.Г.¹, Колыганова Т.И.^{1,2}, Миронов А.Ю.^{3,4}

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ ГРУДНОГО МОЛОКА

¹ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, 105064, Москва, Россия;

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия;

³ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

⁴Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, 115682, Москва, Россия

Грудное молоко, является не только ценным питательным субстратом, но и обеспечивает защиту ребёнка от условно-патогенных микроорганизмов. Гуморальная противомикробная защита грудного молока складывается из совокупного действия антимикробных полипептидов (АМП), в частности лактоферрина, иммуноглобулинов класса А (IgA) сывороточного альбумина.

Цель: оценить влияние физиологических, биологических и физических факторов на антимикробную активность сыворотки грудного молока.

Материал и методы. Общую активность сыворотки грудного молока и активность её фракции, содержащей АМП, оценивали ранее описанным методом спектрофотометрии. **Результаты.** Общая активность зависит не от вида микроорганизма (*Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), а от дозы сыворотки. Активность АМП-фракции возрастает в указанном ряду микроорганизмов. Активность сыворотки грудного молока значительно снижается по мере увеличения срока лактации ($r=-0,942$), не зависит от возраста матери ($r=-0,287$). Показано, что антимикробная защита молока варьирует в зависимости от вида млекопитающего: наибольшей активностью обладают сыворотки молока мыши и человека, наименьшей - молока козы. Способ консервации молока - пастеризация, хранение в замороженном состоянии (3 месяца) и лиофильное высушивание/восстановление - снижают активность сыворотки грудного молока человека на 5.2%, 25.7%, 7.3% соответственно; сыворотки коровьего молока на 21.1%, 49.2%, 49.6% соответственно.

Заключение. Полученные данные расширяют возможности применения использованного метода определения антимикробной активности сыворотки молока в клинической лабораторной диагностике его защитных свойств.

Ключевые слова: грудное молоко; антимикробная активность; консервация молока; молоко млекопитающих

Для цитирования: Арзуманян В.Г., Колыганова Т.И., Миронов А.Ю. Клиническая лабораторная диагностика антимикробной активности сыворотки грудного молока. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (2):87-91.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-2-87-91>

Для корреспонденции: Арзуманян Вера Георгиевна, зав. лаб. физиологии грибов и бактерий; e-mail: veraar@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования НИИВС им. И. И. Мечникова при финансовой поддержке проекта Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.12.2023

Принята к печати 20.12.2023

Опубликовано 15.02.2024

Arzumanyan V.G.¹, Kolyganova T.I.^{1,2}, Mironov A.Yu.^{3,4}

CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BREAST MILK SERUM

¹Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

³G.N. Gabrichevsky research institute for epidemiologyµbiology, Moscow, Russia;

⁴Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies, Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia

Breast milk is not only a valuable nutritious substrate, but also protects the baby from opportunistic pathogens. Humoral antimicrobial protection of breast milk consists of the combined effect of antimicrobial polypeptides (AMPs), in particular lactoferrin, immunoglobulins (IgA) and serum albumin.

Objective. To assess the influence of physiological, biological and physical factors on the antimicrobial activity of human milk serum.

Material and methods. The total activity of human milk serum and the activity of its fraction containing AMP were assessed by the previously described spectrophotometry method.

Results. The total activity does not depend on the type of microorganism (*Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), but on the dose of serum. The activity of the AMP fraction increases in this range of microorganisms. The activity of serum in breast milk decreases significantly as the lactation period increases ($r=-0.942$) and does not depend on the age of the mother ($r=-0.287$). It has been shown that the antimicrobial protection of milk varies depending on the species of mammal: mouse and human milk serum have the highest activity, goat milk has the least. The method of milk preservation - pasteurization, frozen storage (3 months) and freeze drying/reconstitution - reduce the activity of human breast milk serum by 5.2%, 25.7%, 7.3%, respectively; cow's milk whey by 21.1%, 49.2%, 49.6%, respectively. *Conclusion.* The obtained data expand the possibilities of using the method used to determine the antimicrobial activity of milk serum in clinical laboratory diagnostics of its protective properties.

Key words: breast milk; antimicrobial activity; milk preservation; mammal milk

For citation: Arzumanyan V.G., Kolyganova T.I., Mironov A.Yu. Clinical laboratory diagnostics of antimicrobial activity of breast milk serum. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (2): 87-91 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-2-87-91>

For correspondence: Arzumanyan V.G., Ph.D., prof., head of Laboratory of fungal and bacterial physiology, Mechnikov Research Institute for vaccines and sera; e-mail: veraar@mail.ru

Information about authors:

Arzumanyan V.G., <https://orcid.org/0000-0001-9769-1634>;

Kolyganova T.I., <https://orcid.org/0000-0002-9065-9786>;

Mironov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>.

Conflict of interest. The authors declare absence of conflict of interest.

Funding. The study was carried out on the scientific equipment of the Collective Usage Center «I. I. Mechnikov NIIVS», Moscow, Russia, with the financial support of the project by the Russian Federation represented by the Ministry of Science of Russia, Agreement № 075-11-2021-676 dated 28.07.2021.

Received 15.12.2023

Accepted 20.12.2023

Published 00.02.2024

Введение. Грудное молоко, как и прочие биологические жидкости организма, обладает цитотоксической активностью против условно-патогенных микроорганизмов (УПМ). Эта активность обусловлена не только факторами клеточного звена иммунитета - лейкоцитами и эпителиоцитами, но и гуморального: секреторными иммуноглобулинами класса А (sIgA) [1], антимикробными пептидами, такими как лактоферрин [2], лизоцим [3] и рядом других, подробно описанных [4]. Уровень антимикробной активности сыворотки грудного молока может служить показателем эффективности противомикробной защиты протоков молочных желёз матери и желудочно-кишечного тракта ребёнка. На культуре грибов *Candida albicans* проведено сравнение общепринятого метода определения данного показателя - культурального метода - с методами микроскопии и спектрофотометрии [5]. Культуральный метод позволил проследить, в течение какого времени происходит значимое снижение численности популяции микроорганизмов. Метод микроскопии показал, что инкубация суспензии клеток с сывороткой грудного молока ведёт к разрушению клеточных стенок и цитоплазматических мембран с образованием везикулярного дедбриса. Удобный и относительно быстрый метод спектрофотометрии даёт возможность установить наличие дозозависимого эффекта и обратной корреляционной связи между периодом лактации и цитотоксической активностью сыворотки.

Цель исследования - применение метода спектрофотометрии для изучения факторов (доза сыворотки, микроорганизм, период лактации, метод консервации молока, биологическая природа молока, фракционирование сыворотки), влияющих на клиническую лабораторную диагностику антимикробной активности сыворотки молока.

Материал и методы. Грудное молоко получено

от 134 здоровых кормящих матерей на разных сроках лактации. Молоко различных млекопитающих - мышей ($n=8$), коз ($n=4$), коров ($n=4$), лошадей ($n=7$), верблюдов (пул замороженный («Таууиба Farms», Египт) получено от здоровых самок. Образцы свежего молока через 1,5 часа после получения замораживали и хранили при -25°C не более 1 месяца до получения сывороток. Сыворотки получали описанным ранее методом [6]. В работе использованы штаммы микроорганизмов из коллекции НИИВС им. Мечникова: *Candida albicans* № 927, *Staphylococcus aureus* Wood 46, *Escherichia coli* M 17. Оценку антимикробной активности сыворотки проводили методом спектрофотометрии [5,7]. Метод основан на инкубации клеток микроорганизмов с сывороткой молока и последующем добавлении красителя бромкрезолового пурпурного с повторной инкубацией. В течение инкубации краситель убывает из среды, проникая через повреждённые мембраны клеточных стенок микроорганизмов. После удаления осадка клеток измеряли оптическую плотность образца на спектрофотометре («Genesys 10S UV-VIS», США) при длине волны 440 нм. Антимикробную активность выражали в процентах по отношению к контрольному образцу, содержащему физиологический раствор вместо сыворотки. Сыворотку молока мышей разбавляли изотоническим раствором хлорида натрия в 4 раза для получения адекватных величин активности, после чего полученные значения умножали на 4, поскольку между концентрацией сыворотки молока и её активностью имеет место линейная зависимость. Фракции сыворотки молока получали с помощью фильтрующих насадок с порами размером 100 кДа («Amicon Ultra-0,5», Millipore, Merck), их активность определяли тем же методом. Пастеризацию образцов молока проводили при температуре $62,5^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут, лиофильное высушивание молока

- в асептических условиях соответственно принятому стандарту, замораживание и хранение при температуре -25°C . Статистический анализ полученных данных проведён с помощью пакета программ Microsoft Excel 2019. Для оценки достоверности различия выборок применён критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. Предыдущие исследования, касающиеся антимикробной активности сыворотки молока, проведены на культуре *C. albicans*, поскольку эти дрожжи являются удобным объектом для микроскопии [5, 8]. Данные, полученные при сравнении чувствительности клеток *C. albicans* и прокариот - грамположительных кокков *S. aureus* и грамотрицательных палочек *E. coli* - к пуловой сыворотке грудного молока ($n=5$) представлены на рис. 1, а. Видно, что данный показатель зависит от дозы сыворотки ($p<0,01$), но не от вида микроорганизма ($p>0,05$). Активность фракции, полученной при фильтрации сыво-

ротки молока через мембрану с размером пор 100 кДа, т. е. содержащей АМП, различается у разных видов (рис. 1, б): наибольшую чувствительность проявляли бактерии *E. coli*, наименьшую - дрожжи *C. albicans*. Учитывая тот факт, что основным АМП молока является лактоферрин ($1\div 10$ мг/мл) [4, 8], обратимся к данным литературы: минимальная ингибирующая концентрация лактоферрина по отношению к *C. albicans*, оценённая методом микроразведений, составляет 21-98 мг/мл [9], к *S. aureus* - 10 мг/мл [10], к *E. coli* - $\leq 3,5$ мг/мл [11]. То есть чувствительность к лактоферрину в этом ряду повышается, что следует из данных, представленных на рис. 1, б. Поскольку очевидно, что исследования общей активности сыворотки грудного молока можно проводить на микроорганизмах различных видов, включая дрожжевые грибы, далее приводятся результаты, полученные с использованием клеток *C. albicans*.

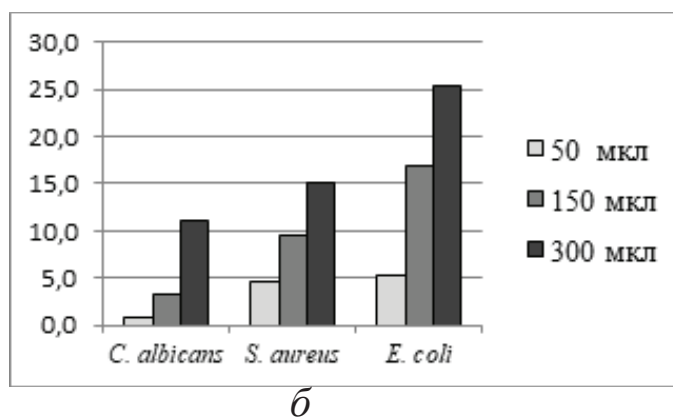
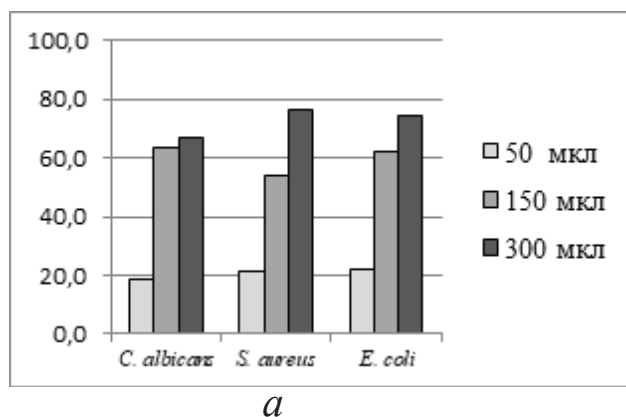


Рис. 1. Антимикробная активность цельной сыворотки грудного молока (а) и фракции её АМП (б) против клеток *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli*, %

Данные, касающиеся изменения общей активности сыворотки грудного молока в зависимости от периода лактации приведены на рис. 2. Ранее подобные исследования проводились, но на меньших выборках [5, 8]. Здесь отражены результаты, полученные на 134 образцах и согласующиеся с предыдущими данными. По

мере увеличения срока лактации активность сыворотки снижается. Коэффициенты корреляции между этими показателями составляют: $r=-0,668$ (по всей выборке) и $r=-0,942$ (по медианам, подсчитанным для приведённых на рис. 2 групп). Корреляции между активностью и возрастом матери практически не наблюдалось, $r=-0,287$.

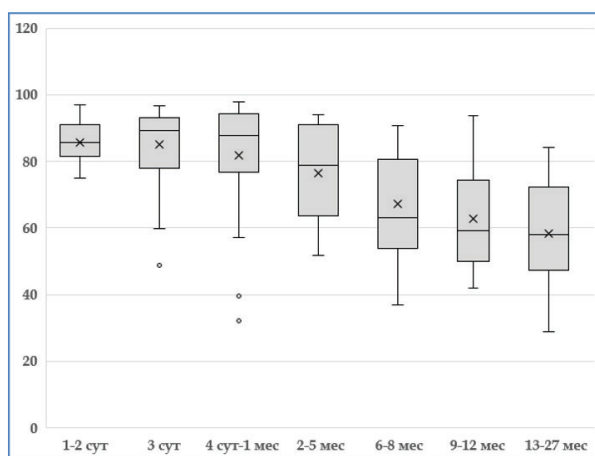


Рис. 2. Зависимость антимикробной активности сыворотки грудного молока (%) от периода лактации.

Одним из важных факторов, влияющих на антимикробную активность сыворотки молока, является биологическая природа самого молока. Сравнивая активность образцов, полученных от разных млекопитающих (рис. 3), можно убедиться, что наиболее активными являлись образцы молока мыши и человека. Возможно, эти особенности связаны с тем, что эти виды млекопитающих являются всеядными, тогда как остальные - травоядными. Концентрации превалирующего АМП молока - лактоферрина - и секреторного иммуноглобулина (sIgA) в молоке мышей примерно такие же, как

у других млекопитающих [12]. Принципиальное отличие молока мыши от прочих изученных заключается в том, что содержание в нём сывороточного альбумина на порядок превышает таковое в остальных образцах. Поскольку ранее установлено биоцидное действие альбумина на клетки эукариот и прокариот [13], можно заключить, что вероятно этим и объясняется высокая активность сыворотки молока мыши. Противомикробная активность сыворотки крови мышей значительно не отличалась от таковой у человека [14], возможно, также из-за одинакового содержания в них альбумина [12].

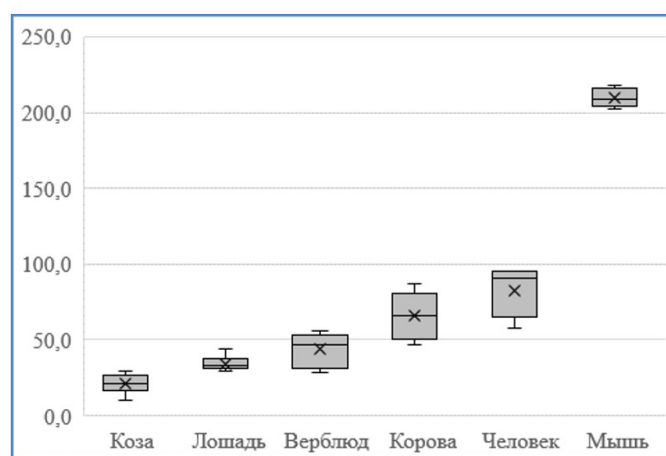


Рис. 3. Антимикробная активность сыворотки молока разных млекопитающих по отношению к клеткам *C. albicans*, %

Влияние физических факторов на антимикробную активность сыворотки молока человека и коровы

Образцы молока, способы их консервации	Активность общая, % (M±m)	Достоверность отличий от среднего значения активности исходных образцов
Молоко человека:		
Исходные образцы	91,2±4,8	-
Пастеризованное	86,0±9,8	$p > 0,05$
Замороженное (3 месяца)	65,5±4,5	$p < 0,01$
Высушенное и восстановленное	83,9±1,4	$p > 0,05$
Молоко коровы:		
Исходные образцы	79,0±8,8	-
Пастеризованное	57,9±20,1	$0,01 < p < 0,05$
Замороженное (3 месяца)	29,8±2,2	$p < 0,01$
Высушенное и восстановленное	29,4±5,9	$p < 0,01$

Для продления срока годности молока применяют различные способы консервации, поэтому оценка влияния различных физических факторов на сохранение антимикробной активности является актуальной. К факторам консервации относят пастеризацию, хранение в замороженном состоянии, лиофильное высушивание. На 6-ти образцах грудного молока человека и 6-ти образцах молока коровы оценена антимикробная активность сыворотки по отношению к культуре дрожжей *C. albicans*: исходный образец сравнивали с образцами, подвергнутыми предварительному воздействию указанных факторов (см. таблицу). Минимальное влияние на антимикробную активность образцов молока

человека оказала пастеризация (антимикробная активность снижалась на 5,2% по сравнению с исходной) и высушивание (снижение на 7,3% от исходной). Наибольшее воздействие на антимикробную активность сыворотки молока человека оказало замораживание в течение 3 месяцев - этот показатель снижался на 25,7% от исходного уровня. Пастеризация при температуре не выше 65 °C и лиофильное высушивание практически не влияли на антимикробные свойства очищенного лактоферрина [15], однако, длительное замораживание молока значительно снижало в нём уровень этого АМП [16]. Антимикробная активность сыворотки молока коровы значительно снижалась под действием всех описан-

ных факторов: на 21,1% после пастеризации молока, на 49,6% после высушивания, на 49,2% после замораживания в течение 3 месяцев. Можно предположить, что грудное молоко человека ввиду иного качественного и количественного состава его компонентов более устойчиво к физическим воздействиям, чем молоко коровы.

Заключение. Клиническая лабораторная диагностика антимикробной активности сыворотки грудного молока и молока сельскохозяйственных животных имеет важное практическое значение и зависит от ряда факторов. При использовании данного подхода следует определиться с видом микроорганизма, иметь в виду зависимость антимикробной активности молока от периода лактации, вида млекопитающего, способа консервации молока. Указанный подход полезен при оценке защитных свойств грудного молока - этого уникального природного продукта, способного не только напитать, но и защитить его потребителя - новорожденного ребёнка.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-3, 9-11, 15, 16 см.
REFERENCES)

- Колыганова Т.И., Арзуманян В.Г., Хорошко Н. В, Зверев В.В. Различия гуморальных факторов иммунной защиты грудного молока и молозива. *Вопросы детской диетологии*. 2021;19: 1-8.
- Колыганова Т.И., Арзуманян В.Г., Богданова Е.А., Зверев В.В. Альтернативные методы оценки противомикробной активности сыворотки грудного молока. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021; 171(4): 525-8.
- Богатова О. В., Догаева Н.Г. Определение качества молока: методические указания к лабораторному практикуму. Оренбург: ОГУ; 2002.
- Арзуманян В.Г., Мальбахова Е.Т., Фошина Е.П., Артемьева Т.А., Бутовченко Л.М., Варганова Н.О., Шмельёва О.А. Способ определения совокупной активности антимикробных пептидов как маркера состояния местного иммунитета различных эпителиальных тканей. Патент РФ № 2602298; 2016.
- Арзуманян В.Г., Колыганова Т.И., Свитич О.А., Самойликов П.В., Конаныхина С.Ю., Зайцева Т.А., Зверев В.В. Вклад лактоферрина, сывороточного альбумина и секреторного иммуноглобулина класса А в антимикробную активность сыворотки грудного молока. *Инфекция и иммунитет*. 2022; 12(3): 519-26.
- Колыганова Т.И., Арзуманян В.Г., Матвиенко М.А., Родионова А.А., Коршунова Д.С., Шатунова П.О., Ястребова Н.Е. Антимикробная активность сыворотки молока млекопитающих. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2023; 175(3): 340-4.
- Арзуманян В.Г., Ожован И.М., Свитич О.А. Антимикробное действие альбумина на клетки бактерий и дрожжей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019; 167(6): 722-5.
- Арзуманян В.Г., Артемьева Т.А., Иксанова А.М. Противогрибковая активность сыворотки крови человека и некоторых млекопитающих. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 1: 17-22.

REFERENCES

- Brandtzaeg, P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J. Pediatr.* 2010; 156(2): 8-15.
- Rai D., Adelman A.S., Zhuang W., Rai G.P., Boettcher J., Lönnerdal B. Longitudinal changes in lactoferrin concentrations in human milk: a global systematic review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2014; 54(12):1539-7.
- Montagne P., Cuillière M.L., Molé C., Béné M.C., Faure G. Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001; 501: 241-7.
- Kolyganova T.I., Arzumanyan V.G., Khoroshko N.V., Zverev V.V. Differences in the humoral factors of the immune defence of breast milk and colostrum. *Voprosy detskoy dietologii*. 2021; 19: 1-8. (in Russian)
- Kolyganova T.I., Arzumanyan V.G., Zverev V.V., Bogdanova E.A. Alternative methods of evaluation of antimicrobial activity of breast milk serum. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2021; 171(4): 504-7. (in Russian)
- Bogatova O.V., Dogaeva N.G. Determination of milk quality: method. instructions to the laboratory workshop. Orenburg: Orenburgskiy gosudarstvennyi universitet; 2002. (in Russian)
- Arzumanyan V.G., Malbakhova E.T., Foshina E.P., Artemeva T.A., Butovchenko L.M., Vartanova N.O., Shmeleva O.A. Method for determining antimicrobial peptide total activity as a marker of tissue immunity state of various epithelial tissues. Patent RF № 2602298; 2016. (in Russian)
- Arzumanyan V.G., Kolyganova T.I., Svitich O.A., Samoylikov P.V., Konanykhina S.Y., Zaytseva T.A., Zverev V.V. An impact of lactoferrin, serum albumin and secretory immunoglobulin A in antimicrobial activity of breast milk whey. *Infektsiya i immunitet*. 2022; 12(3): 519-26. (in Russian)
- Kuipers M.E., de Vries H.G., Eikelboom M.C., Meijer D.K., Swart P.J. Synergistic fungistatic effects of lactoferrin in combination with antifungal drugs against clinical Candida isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43(11): 2635-41.
- Al Haby S.H., Ali D.N. Efficiency of lactoferrin to eradicate multi-drug resistant staphylococcus aureus isolated from some dairy products. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 2023; 11(1): 35-44.
- Biernbaum E.N., Gnezda A., Akbar S., Franklin R., Venturelli P.A., McKillip J.L. Lactoferrin as an antimicrobial against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O₁₅₇: H₇ in raw milk. *JDS Commun.* 2021; 2(3): 92-7.
- Kolyganova T.I., Arzumanyan V.G., Matvienco M.A., Rodionova A.A., Korshunova D.S., Shatunova P.O., Yastrebova N.E. Antimicrobial activity of mammalian milk whey. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2023; 175(3): 340-4. (in Russian)
- Arzumanyan V.G., Ozhovan I.M., Svitich O.A. Antimicrobial effect of albumin on bacteria and yeast cells. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2019; 167(6): 763-6. (in Russian)
- Arzumanyan V.G., Artemeva T.A., Iksanova A.M. Antifungal activity of human and some mammals sera. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; 1: 17-22. (in Russian)
- Wang B., Timilsena Y.P., Blanch E., Adhikari B. Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019; 59(4): 580-96.
- Rollo D.E., Radmacher P.G., Turcu R.M., Myers S.R., Adamkin D.H. Stability of lactoferrin in stored human milk. *J. Perinatol.* 2014; 34(4):284-6.