

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

САДЧИКОВ ПАВЕЛ ЕВГЕНЬЕВИЧ

ПРОТЕКТИВНЫЕ ФАКТОРЫ ПИТАНИЯ И ОСОБЕННОСТИ
СТАНОВЛЕНИЯ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ У ДЕТЕЙ
В ПЕРВЫЕ 500 ДНЕЙ ОНТОГЕНЕЗА

3.1.21. Педиатрия

3.2.7. Иммунология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор РАН

Беляева Ирина Анатольевна

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Намазова-Баранова Лейла Сеймуровна

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Актуальность темы исследования	4
Степень разработанности темы исследования	5
Цель исследования	6
Задачи исследования	7
Научная новизна.....	7
Теоретическая и практическая значимость работы.....	9
Методология и методы исследования.....	10
Основные положения, выносимые на защиту	11
Степень достоверности и апробация результатов	12
Внедрение результатов исследования.....	13
Соответствие диссертации паспорту научной специальности	13
Личный вклад автора	13
Публикации	14
Объем и структура диссертации.....	14
ГЛАВА 1. ФОРМИРОВАНИЕ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ – ГЛОБАЛЬНАЯ ПАРАДИГМА ЗДОРОВЬЯ РЕБЕНКА	15
1.1 Комплекс протективных факторов грудного молока. Значимость лактоферрина как биологически активной субстанции, бактерицидного и иммуномодулирующего фактора.	15
1.2 Возможная роль лактоферрина в формировании кишечной микробиоты	22
1.3 Особенности становления кишечной микробиоты у детей раннего возраста с пищевой аллергией. Потенциальное участие лактоферрина.	25
1.4 Препараты лактоферрина и перспективы их использования.....	33
ГЛАВА 2. ОБЪЕМ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1 Общая характеристика этапов исследования	41
2.2 Методы клинико-лабораторного обследования пациентов	42
2.3 Методы исследования <i>in vitro</i>	49
2.4. Статистические методы, использованные в работе.....	52
ГЛАВА 3. ЛАКТОФЕРРИН КАК ИНДУКТОР ИНДИГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В СТРУКТУРЕ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ДОНОШЕННЫХ И НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ	53

3.1 Первый этап исследования: содержание лактоферрина в материнском молоке и фекалиях младенцев различного гестационного возраста во взаимосвязи с формированием протективных систем у детей в раннем постнатальном онтогенезе	53
3.1.1. Общая характеристика исследуемых групп детей и матерей	55
3.1.2. Показатели содержания лактоферрина в молозиве и зрелом материнском молоке	63
3.1.3. Показатели содержания лактоферрина в фекалиях у доношенных и недоношенных новорожденных в раннем постнатальном онтогенезе ...	66
3.1.4. Корреляция уровней лактоферрина в биологических субстратах и содержание индигенных микроорганизмов в составе кишечной микробиоты доношенных и недоношенных детей.....	69
3.1.5 Корреляционные взаимосвязи уровней фекального лактоферрина с количеством лейкоцитов и моноцитов в периферической крови в раннем периоде постнатальной адаптации	72
3.2 Второй этап исследования: оценка бифидогенного эффекта аналога человеческого лактоферрина в эксперименте <i>in vitro</i>	75
ГЛАВА 4. ФОРМИРОВАНИЕ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ВО ВЗАИМОСВЯЗИ С ОСОБЕННОСТЯМИ ВСКАРМЛИВАНИЯ У ДЕТЕЙ С НАЧАЛЬНЫМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ АЛЛЕРГИИ.....	80
4.1 Третий этап исследования: особенности формирования кишечной микробиоты у детей 2-3 месяцев жизни с начальными проявлениями аллергии	80
4.2. Четвертый этап исследования: особенности состава кишечной микробиоты у детей с аллергией во втором полугодии жизни	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
ВЫВОДЫ	124
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	127
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	129

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В последние десятилетия сформулирована концепция «первых 1000 дней», постулирующая важное значение ранних этапов онтогенеза для всей последующей жизни индивидуума [226,126,242,239]. В этой связи широко обсуждается медико-социальная и саногенетическая значимость грудного вскармливания и полноценного питания ребенка раннего возраста, как решающего фактора оптимального развития и профилактики отсроченных нарушений здоровья [222,31,14,15]. Принимая во внимание наибольшую пластичность/сенситивность стартового этапа этого периода, а именно первых 500 дней (270 дней внутриутробного и 230 дней постнатального онтогенеза), соответствующих хронологическому возрасту ребенка неполных 8 месяцев, необходимость обеспечения адекватного питания на этом этапе имеет решающую значимость. Саногенетические свойства грудного молока связаны с его уникальным составом, прежде всего с наличием широкого спектра протективных субстратов. Эти субстраты определяют созревание и индукцию различных звеньев противомикробной защиты организма, важнейшим из которых является микробиота кишечника [180,192,8,175].

На формирование микробиома младенца оказывают влияние, как генетические факторы, так и условия внешней среды, среди которых особенности вскармливания в течение первых месяцев жизни являются доминирующими. Такие субстраты женского молока, как олигосахариды, нуклеотиды, иммунорегулирующие белки (в т.ч. лактоферрин, секреторные антитела, цитокины) обеспечивают оптимальное становление микробиоты ребенка, находящегося на грудном вскармливании [70,218,72,257,55]. Бактериостатическое действие лактоферрина грудного молока объясняется его способностью связывать железо, необходимое для роста патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [213,149,38]. Лактоферрин обладает как бактериостатическим эффектом (связывая необходимое бактериальным

патогенам железо), так и бактерицидным, который осуществляется через взаимодействие лактоферрина с липополисахаридами грамотрицательных бактерий и липотейхоевой кислотой грамположительных микробов [42,39]. Анализ лактоферрина, выделенного из различных фракций грудного молока, выявил широкий спектр ферментативной активности с потенциальной антимикробной ролью, включая сериновую протеазу, мальтазу, амилазу и нуклеазу [131,194,256]. Защиту против бактериальных и вирусных патогенов обеспечивают также иммуномодулирующие и цитопластические свойства лактоферрина: активация иммунных клеток, стимуляция пролиферации кишечного эпителия, что усиливает барьерные функции кишечной стенки. Все это способствует индукции защиты против патогенных микробов, особенно важной для детей с аллергией. Увеличение распространенности аллергических заболеваний во всем мире, принявшее характер «новой эпидемии», сопровождается сдвигом манифестации этой патологии на все более ранний возраст, что требует поиска эффективных профилактических стратегий [108,95,54].

Таким образом, научная и практическая значимость данного исследования, направленного на оценку роли одного из главных протективных субстратов грудного молока – лактоферрина – в модулировании микробиоты у здоровых и больных младенцев, не вызывает сомнения; а тема является актуальной для неонатологии и педиатрии на современном этапе.

Степень разработанности темы исследования

В большинстве отечественных и зарубежных исследований изучалась структура и свойства лактоферрина, выделенного из женского и коровьего молока, были обнаружены две структурные формы лактоферрина – гололактоферрин (holoLf) – замкнутая структура, и аполактоферрин (apoLf) – открытая структура; обе эти формы способны к высвобождению лактоферрина, связывающегося с мембранами бактериальных клеток [225].

Отмечено, что антимикробные свойства лактоферрина, выделенного из коровьего молока, выражены слабее, т.к. этот лактоферрин имеет более низкое сродство к железу из-за особенностей строения его гликановых цепей [122]. Достаточно широко изучались иммуномодулирующие, бактерицидные и бактериостатические свойства лактоферрина, в том числе возможности его терапевтического использования при сепсисе и некротизирующем энтероколите у новорожденных [210,236]. Было отмечено отсутствие бактерицидного эффекта лактоферрина в отношении полезных (индигенных) микроорганизмов кишечной микробиоты [256]. В то же время сведения о влиянии лактоферрина на конкретные виды индигенных микробов противоречивы (на некоторые виды лактоферрин оказывает ингибирующее действие, на другие – стимулирующее); они основаны на результатах преимущественно экспериментальных исследований [256]. Недостаточно изучены взаимосвязи особенностей кишечной микробиоты здоровых и больных младенцев с их обеспеченностью лактоферрином материнского молока; практически отсутствуют отечественные исследования, посвященные обоснованию применению препаратов лактоферрина в педиатрической практике.

Все вышеизложенное свидетельствует о необходимости изучения на современном уровне возможностей лактоферрина в отношении формирования микробиоты здоровых и больных младенцев с целью разработки подходов к профилактическому и терапевтическому использованию препаратов лактоферрина.

Цель исследования

Повышение эффективности профилактического использования протективных субстратов грудного молока у детей с начальными проявлениями аллергических заболеваний.

Задачи исследования

1. Определить концентрацию лактоферрина в молозиве и зрелом грудном молоке женщин, родивших в срок и преждевременно.
2. Оценить уровни фекального лактоферрина у доношенных и недоношенных новорожденных в динамике неонатального периода и сопоставить взаимосвязи дотации / экскреции лактоферрина в диадах «мать-дитя».
3. Исследовать взаимосвязи концентрации лактоферрина в биологических субстратах с содержанием индигенных микроорганизмов в клеточных культурах в эксперименте *in vitro* и в микробиоте кишечника младенцев.
4. Изучить качественные и количественные характеристики состава кишечной микробиоты у младенцев с начальными проявлениями аллергических заболеваний в первые 500 дней онтогенеза.
5. Определить взаимосвязи состава микробиоты у младенцев с аллергическими заболеваниями с профилями их сенсibilизации и обеспеченностью протективными факторами грудного молока.

Научная новизна

Впервые в России определена концентрация одного из важнейших протективных белков – лактоферрина – в грудном молоке женщин после своевременных и преждевременных родов в раннем послеродовом периоде (в молозиве) и к окончанию первого месяца лактации (в зрелом молоке); полученные данные сопоставлены с уровнями выделения лактоферрина в фекалиях доношенных и недоношенных новорожденных в динамике. Впервые установлено более высокое содержание лактоферрина в фекалиях недоношенных младенцев по сравнению с детьми, рожденными в срок, а также взаимосвязь между содержанием лактоферрина в зрелом молоке женщин и уровнем лактоферрина в фекалиях их детей.

Впервые были сопоставлены уровни содержания лактоферрина в грудном молоке и фекалиях младенцев, с одной стороны, и количество

индигенных микроорганизмов (бифидо- и лактобактерий) в микробиоте детей в динамике на протяжении первого месяца жизни – с другой. В отношении недоношенных детей были установлены достоверные прямые корреляции между концентрацией фекального лактоферрина и содержанием бифидо- и лактобактерий в микробиоте, что свидетельствует о наибольшей значимости протективного эффекта лактоферрина для незрелых организмов младенцев с пониженным уровнем иммунной защиты.

Впервые выявлена прямая взаимосвязь между количеством лейкоцитов и моноцитов в периферической крови у доношенных детей в возрасте 3-5 дней с уровнем лактоферрина в их меконии, что отражает системное участие лактоферрина в процессе постнатальной адаптации ребенка.

Впервые в России в эксперименте *in vitro* изучено модулирующее действие отечественного генно-инженерного аналога человеческого лактоферрина в отношении индигенных микроорганизмов; установлено разнонаправленное действие различных концентраций лактоферрина в среде на отдельные виды представителей бифидобактерий.

Установлены характеристики дизонтогений кишечной микробиоты у младенцев первых девяти месяцев жизни с начальными проявлениями аллергических заболеваний во взаимосвязи с факторами наследственной отягощенности, перинатального периода и особенностями вскармливания; обнаружено количественное доминирование энтеробактерий и снижение уровней бифидо- и лактобактерий в их микробиоте; причем указанные нарушения состава микробиоты и ассоциированные с ними уровни пищевой сенсibilизации при динамическом обследовании пациентов были более выраженными. Нарастание негативных изменений в микробиоте достоверно коррелировало с фактом искусственного вскармливания во втором полугодии жизни ребенка, что позволило обосновать рекомендацию по пролонгированию грудного вскармливания для детей с аллергией, а при отсутствии материнского молока – в перспективе решить вопрос о

профилактическом и лечебном использовании аналога человеческого лактоферрина.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе исследования изучены взаимосвязи меняющегося на протяжении периода лактации обеспечения младенца лактоферрином грудного молока и особенностей структуры кишечной микробиоты, управление становлением которой признано в настоящее время одной из перспективных профилактических и лечебных стратегий в отношении различной патологии у детей и взрослых. В эксперименте *in vitro* и в процессе клинического обследования новорожденных установлен протективный эффект лактоферрина в отношении основных микроорганизмов здоровой кишечной микробиоты – бифидо- и лактобактерий.

Определена достоверная связь уровня поступления лактоферрина в кишечник недоношенных детей в первые дни жизни с оптимизацией состава их кишечной микробиоты, что является еще одним доказательством глобальной значимости обеспечения грудного вскармливания, в особенности для незрелых детей и младенцев с разнообразной патологией.

Установлены взаимосвязи между ограничением доступности протективных факторов грудного вскармливания, в том числе лактоферрина, и формированием аллергической сенсibilизации, ассоциированной с нарушением становления кишечной микробиоты у младенцев с начальными проявлениями кожной и гастроинтестинальной аллергии. Таким образом, обоснован важный для практической педиатрии вывод о необходимости сохранения пролонгированного грудного вскармливания в питании этих пациентов, в том числе лактоферрином, с целью обеспечения естественными микробиото-протективными факторами.

Отечественный препарат – генно-инженерный аналог человеческого лактоферрина, избирательные бифидогенные свойства которого установлены *in vitro*, в перспективе может быть использован в качестве пребиотической

добавки для оптимизации состава кишечной микробиоты у детей, не обеспеченных грудным молоком, прежде всего – у недоношенных младенцев и детей с аллергическими заболеваниями.

Показана целесообразность изучения состава кишечной микробиоты у младенцев с начальными проявлениями кожной и гастроинтестинальной аллергии в динамике их наблюдения с целью прогнозирования течения заболевания и в перспективе – для определения подходов по таргетному применению пре- и пробиотиков.

Подтверждена необходимость коррекции рационов кормящих матерей, у младенцев которых выявляется моно- и поливалентная сенсibilизация к пищевым аллергенам, с целью минимизации уровня специфической сенсibilизации и клинических проявлений аллергии.

Методология и методы исследования

Работа проводилась в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, на базе Перинатального центра Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Мытищинская городская клиническая больница» (главный врач – к.м.н. О.А. Мисюкевич) и в Научно-исследовательском институте педиатрии и охраны здоровья детей Научно-клинического центра №2 (руководитель – академик РАН Л.С. Намазова-Баранова) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского (ЦКБ РАН)» (директор – академик РАН К.В. Котенко). Комплекс лабораторных исследований был проведен в лаборатории «Трансгенбанк» ФГБУН Института биологии гена Российской академии наук (заведующий И.Л. Гольдман) и лаборатории «ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского (ЦКБ РАН)» (заведующая – к.м.н. О.В. Дымова).

Настоящее исследование включает 4 последовательных этапа; оно базируется на результатах анализа комплексного клинико-лабораторного обследования 57 новорожденных детей и их 57 матерей, а также на данных проспективного наблюдения 50 детей первых 6 – 8 месяцев жизни (500 дней онтогенеза) с начальными проявлениями аллергических заболеваний. Помимо этого, работа включает экспериментальный раздел (*in vitro*), базирующийся на оценке модулирующего действия аналога человеческого лактоферрина в отношении 5 видов бифидобактерий.

Диссертационная работа является комплексным клиническим и медико-биологическим исследованием. В работе применен комплекс методов: анализ анамнестических данных (в том числе наследственный анамнез), клиническое наблюдение детей по общепринятой в неонатологии и педиатрии методике, исследования концентрации лактоферрина в биологических субстратах, оценка качества и количества состава кишечной микробиоты младенцев с помощью бактериологического метода; исследование уровней основных классов иммуноглобулинов сыворотки у младенцев в динамике; исследования профилей аллергической сенсibilизации детей (определение специфических IgE в динамике) методом Аллергочип ImmunoCAP ISAC.

Значимость всех полученных результатов оценивалась общепринятыми статистическими методами.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Протективные субстраты грудного молока являются эссенциальными факторами обеспечения формирования здоровой микробиоты кишечника младенца. Среди этих субстратов важная роль принадлежит лактоферрину, обеспеченность которым может служить одним из факторов становления здоровой микробиоты доношенных и недоношенных младенцев.

2. У детей с начальными проявлениями аллергических заболеваний в первые 500 дней онтогенеза нарушения формирования кишечной

микробиоты ассоциированы со степенью выраженности и качественными характеристиками молекулярных профилей сенсibilизации. Одним из ведущих факторов как нарушения состава кишечной микробиоты, так и нарастания частоты сенсibilизации у младенцев с аллергией, является фактор их раннего искусственного вскармливания, что, вероятно, связано с отсутствием в питании детей протективного субстрата – лактоферрина.

3. Пребиотические свойства лактоферрина, подтвержденные экспериментальными и клиническими исследованиями, могут быть признаны особенно важными в отношении профилактики и лечения аллергических заболеваний у детей, в связи с этим необходимо продолжение исследований отечественного препарата генно-инженерного аналога человеческого лактоферрина - для обоснования его применения в практической педиатрии.

Степень достоверности и апробация результатов

Научные положения, явившиеся результатом работы, основаны на репрезентативном статистическом материале. Обоснованность научных положений и рекомендаций, а также достоверность полученных результатов, были подтверждены с помощью современных математико-статистических расчетов. Результаты клинических исследований были сопоставлены с данными эксперимента *in vitro*.

Основные положения работы были заслушаны и обсуждены на практических конференциях, конгрессах и симпозиумах различного уровня, в том числе на Съезде Всемирного союза педиатров (2013 г., Мельбурн, Австралия), VIII Международной (XVII Всероссийская) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (2013 г., Москва), III Общероссийской конференции с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству» (2016 г., Санкт-Петербург), XIX Конгрессе педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии» (2017 г., Москва), XXIII Конгрессе Союза педиатров России с

международным участием (2022 г., Москва), XXIV Конгрессе Союза педиатров России с международным участием (2023 г., Москва).

Внедрение результатов исследования

Материалы исследования использованы при подготовке студентов педиатрического факультета на кафедре факультетской педиатрии ФГАОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также для ординаторов и аспирантов, обучающихся по специальностям «Неонатология» и «Педиатрия».

Результаты диссертационного исследования внедрены в практическую деятельность НИИ педиатрии и охраны здоровья детей НКЦ №2 ФГБНУ «РНЦХ имени академика Б.В. Петровского (ЦКБ РАН)».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспортам специальности 3.1.21 – Педиатрия и 3.2.7 – Иммунология. Результаты работы соответствуют области исследования специальностей, а именно пунктам 1,2,3 паспорта научной специальности педиатрия (медицинские науки) и пунктам 4,5,6,7 паспорта научной специальности иммунология (медицинские науки).

Личный вклад автора

Автором самостоятельно выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы по изучаемой теме, составлен план исследования, изучены и проанализированы анамнестические данные, собраны данные из первичной медицинской документации; проведено клиническое обследование всех пациентов, самостоятельно выполнена обработка полученных результатов. Анализ, интерпретация, изложение полученных данных, формулирование выводов и практических рекомендаций выполнены автором лично.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 11 в рецензируемых изданиях ВАК при Минобрнауки РФ, и 2 патента на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 158 страницах и состоит из: введения, 4-х глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Список литературы включает 19 отечественных и 257 иностранных источников. Работа иллюстрирована 28 таблицами и 20 рисунками, не содержит приложений.

ГЛАВА 1. ФОРМИРОВАНИЕ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ – ГЛОБАЛЬНАЯ ПАРАДИГМА ЗДОРОВЬЯ РЕБЕНКА

1.1 Комплекс протективных факторов грудного молока. Значимость лактоферрина как биологически активной субстанции, бактерицидного и иммуномодулирующего фактора.

Современные исследования показали, что грудное молоко — это не только «живой» продукт питания младенцев, но и комплекс биологически активных веществ — индукторов созревания иммунной системы, пищеварительного тракта и центральной нервной системы, а также важный компонент профилактики отсроченных метаболических заболеваний [180,192,96,4]. Грудное молоко представляет собой динамическую биологическую систему, созданную в результате эволюционного процесса для защиты младенца от инфекции и управления развитием как врожденной, так и адаптивной иммунной системы, а также развивающегося кишечного микробиома [189].

По рекомендации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Американской Академии Педиатрии (ААП), кормление детей исключительно материнским молоком должно продолжаться не менее 6 месяцев, а согласно позиции европейских и российских специалистов – не менее 4-6 мес [<https://www.who.int/ru/publications/i/item/9241562218>]. В нашей стране количество детей на грудном вскармливании в первые 6 месяцев жизни составляет около 40%, тогда, как в некоторых из европейских стран этот процент в 1,5 - 2 раза выше: в Норвегии – 90%, в Венгрии – 87%, в Швеции – 60% [265].

Благодаря наличию в женском молоке многочисленных противовоспалительных и иммунорегулирующих белков, в том числе, секреторных антител, нуклеотидов, лактоферрина, лизоцима, гликанов (олигосахаридов и гликоконъюгатов), лейкоцитов, цитокинов и других биологически активных факторов, обеспечивается противоинфекционная

защита новорожденных детей [276]. В грудном молоке присутствует более 400 видов белка [175,232]. Эти белки стимулируют усвоение питательных веществ и способствуют росту, обеспечивая питание младенца. Грудное молоко содержит олигосахариды [190,202], которые способствуют развитию микробиоты кишечника, а также могут влиять на состав бактериального сообщества молока. Раньше считалось, что грудное молоко стерильно, однако в настоящее время исследования показывают, что оно содержит множество микроорганизмов, спектр которых варьирует в зависимости от здоровья матери, диеты и стадии лактации [61,255].

Факторы роста, присутствующие в грудном молоке, оказывают глубокое воздействие на желудочно-кишечный тракт, сосудистую, нервную и эндокринную системы [243]. Указанные факторы жизненно важны для развития иммунитета и обладают противовоспалительным действием [172,267]. Грудное молоко не только богато антителами, которые важны для развития иммунной системы младенцев, но также содержит множество различных типов клеток крови и тканей молочной железы; а также несколько типов бактерий [147,137]. Исследования показали, что младенцы, находящиеся на грудном вскармливании, менее подвержены таким заболеваниям, как острая диарея, отит, заболевания нижних дыхательных путей, желудочно-кишечные заболевания и астма [137,80,99,41,231,53].

Обобщив положительные эффекты грудного вскармливания, специалисты ААП показали, что дети, вскармливаемые материнским молоком, содержащим достаточное количество бактерицидного белка лактоферрина (Лф), реже болеют. Профилактическая доза Лф поступает в организм новорожденного ребенка уже с первым кормлением. В молозиве здоровой матери содержится 5-7 г/л Лф. Концентрация его в зрелом женском молоке на протяжении лактации постепенно снижается, обычно до 1-1,5 г/л. Вместе с тем, достаточная для противомикробной защиты ребенка концентрация Лф продолжает поддерживаться благодаря увеличению общего объема высасываемого молока [58]. В систематическом обзоре, включавшем

анализ сведений за сорокалетний период, были изучены связи концентрации лактоферрина в женском молоке со стадиями лактации, этнической принадлежностью и регионом проживания женщины; а также с паритетом, гестационным возрастом новорожденного и наличием у него инфекционных заболеваний [268]. Установлена достоверная обратная связь уровня лактоферрина со стадией лактации; но в отношении влияния всех других оцениваемых факторов убедительных доказательств их влияния на уровень лактоферрина не обнаружено. В то же время в отдельных публикациях сообщается о возможном влиянии социальных факторов на содержание лактоферрина в грудном молоке [164].

Содержащийся в женском молоке лактоферрин является ключевым защитным белком, что открывает перспективу его использования для профилактики септических состояний у недоношенных детей, родившихся с очень низкой и экстремально низкой массой тела, а также санации их матерей и персонала родильных домов и перинатальных центров для предупреждения возникновения внутрибольничных инфекций [130,10].

Одной из важнейших проблем медицины в сфере лечения заболеваний инфекционно-воспалительной природы является чрезвычайно быстрый рост множественной лекарственной устойчивости бактерий к антимикробным препаратам. В 2017 году ВОЗ объявила лекарственно устойчивые бактерии самой большой угрозой для здоровья человека [272]. В связи с этим все более актуальной задачей становится поиск альтернативных средств, способных подавлять развитие инфекционных агентов. Перспективными с данной точки зрения являются антимикробные белки и пептиды, вырабатываемые клетками самого макроорганизма и выполняющие функции одного из компонентов иммунной системы [93], в том числе такой биологически активный белок, как лактоферрин – биоразлагаемое, хорошо переносимое соединение, вырабатываемое многими живыми организмами, которое может использоваться и как эффективное терапевтическое средство, и в качестве лекарственного наноносителя [169].

Лактоферрин был обнаружен в 1939 г. в коровьем молоке [246] и выделен в 1960 г. как из женского [151], так и из коровьего молока [117]. Лактоферрин представляет собой 80 кДа железосвязывающий гликопротеин семейства трансферринов и входит в состав не только грудного молока, но также молозива, слезной жидкости, слюны, вторичных гранул нейтрофилов, обнаруживается в околоплодных водах [103,173].

Лактоферрин оказывает свое противомикробное действие по отношению к широкому кругу микроорганизмов, таких как бактерии, грибы, вирусы и паразиты. Это действие связано как с его способностью связывать железо, так и с прямым антимикробным воздействием. Важнейшей характеристикой лактоферрина с позиций его антибактериального действия является способность связывать ионы железа, что лишает бактерии этого микроэлемента, вызывая ингибирование их роста [171,170]. К настоящему времени насчитывают около 115 микроорганизмов, в отношении которых как человеческий (чЛф), так и лактоферрин коровьего молока (бЛф) оказывают выраженный бактериостатический эффект, изолируя от них ионы железа [162].

Кроме того, присутствие Лф в инфицированных тканях может усилить действие некоторых антибиотиков, таких как левофлоксацин, рифампицин, кларитромицин и клиндамицин, против различных патологических агентов, что может значительно повысить эффективность лечения различных заболеваний [252,52]. Характеристика антибактериальных эффектов лактоферрина будет неполной, если не указать на способность этого белка влиять на процесс образования микробной биопленки, которая зависит от его изоформы. На модели стрептококковой биопленки было показано, что аполактоферрин усиливает агрегацию *Streptococcus mutans*, то есть способствует формированию биопленки, в то время как хололактоферрин (нагруженный железом) подавляет агрегацию этих бактерий и, соответственно, препятствует образованию биопленки [161].

Противовирусная активность лактоферрина установлена для значительного числа вирусов – возбудителей гриппа (H1N1, H3N2), герпесвирусов, норовируса человека, вируса папилломы человека, вирусов Чикунгунья и Зика, ВИЧ [169,112,75]. Кроме того, лактоферрин может играть профилактическую роль в отношении развития COVID-19 (торможение интернализации вируса SARS-CoV-2) в дополнение к его способности снижать воспалительную реакцию [196]. Было отмечено, что лактоферрин обладает четко выраженными противогрибковыми свойствами, в частности, в отношении представителей родов *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* [171]. Этот эффект проявлялся повреждением клеточной стенки грибов в виде появления «пятен» на ее поверхности с последующей гибелью клеток, а также синергитическим действием лактоферрина с противогрибковыми препаратами [104].

Лактоферрин способствует всасыванию железа у младенцев, что может быть расценено как безопасный способ обеспечения железом грудных детей, так как препараты железа могут отрицательно влиять на микробиом кишечника и вызывать диарею [133].

Таким образом, лактоферрин обладает широким спектром биологических свойств, среди которых отмечены транспортные, метаболические, иммуномодулирующие, нейропротективные, антибактериальные, противовирусные, противогрибковые, противовоспалительные, антиоксидантные и антиканцерогенные функции [270,121,241], что наглядно демонстрируют данные, представленные в Таблице 1.

Таблица 1 – Основные биологические свойства лактоферрина [241]

Основные функции	Механизмы проявления функций
Железосвязывающий белок	• поглощение, транспортировка и связывание железа
Протективные свойства	• против патогенов: бактерии, грибы,

	<p>паразиты, вирусы</p> <ul style="list-style-type: none"> • противовоспалительные свойства; • модулятор иммунных врожденных и адаптивных реакций; • нейропротекция: облегчение психологического стресса; • антиэндотоксин; • противоопухолевые эффекты
Дифференцировочные и регенерирующие функции	<ul style="list-style-type: none"> • развитие мозга; • формирование костей; • развитие желудочно-кишечного тракта; • дифференцировка адипоцитов; • заживление ран
Метаболические функции	<ul style="list-style-type: none"> • антиоксидант: ингибирует перекисное окисление липидов; • ассоциация с другими белками, в т.ч. остеопонтином; • ферментативная активность; • регулирование уровня глюкозы (уменьшение гипергликемии); • модуляция микробиоты кишечника; • транскрипционный регулятор
Транспортные функции	<ul style="list-style-type: none"> • переносчик различных соединений или метаболитов; • адъювант в составе вакцин

Лактоферрин может действовать как антиоксидант, снижая не только внеклеточные, но и внутриклеточные уровни активных кислородных

радикалов, что позволило выдвинуть предположение о способности этого белка подавлять апоптоз, вызванный окислительным стрессом. Предполагается также, что за счет связывания железа эндогенный лактоферрин может предотвращать перекисное окисление липидов [170].

Особого внимания и анализа заслуживают иммуномодулирующие свойства лактоферрина [16,28]. Независимо от хелатирования железа, лактоферрин способен связываться с рецепторами иммунокомпетентных клеток, подавляя провоспалительный ответ [247], а основными сайтами связывания лактоферрина на поверхности клеток (до 80%) являются гликозаминогликаны в составе мембранных протеогликанов [28]. Одним из последствий связывания рецептора является подавление выработки провоспалительных цитокинов иммунными клетками [170,135]. В ответ на столкновение с микробной угрозой нейтрофилы подвергаются дегрануляции с высвобождением лактоферрина в среду, которая содержит смесь как клеток врожденного иммунитета (макрофаги, дендритные клетки, NK-клетки), так и лимфоцитов адаптивного иммунного ответа (Т-клетки и В-клетки) [170,128]. Обнаружено у лактоферрина и такое свойство, как активация системы комплемента по классическому пути, что также способствует реализации его иммуномодулирующей роли в организме человека [234]. В эксперименте было показано, что лактоферрин усиливает секрецию противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-4 [163,201]. Модуляция продукции цитокинов с помощью лактоферрина в конечном итоге изменяет баланс Т-хелперов Th1 и Th2, определяющих характер адаптивного иммунного ответа [209,238,165,92,135,156]. Иммунологические механизмы могут влиять и на развитие клеточной противоопухолевой защиты [27,111].

Таким образом, лактоферрин через связывание ионов железа, а также через прямые межмолекулярные взаимодействия проявляет себя как ключевой элемент в борьбе с чрезмерным воспалением и адаптирует иммунную функцию хозяина к противомикробной защите, а благодаря проапоптотическому действию – и к защите от канцерогенов.

Представляет интерес изучение взаимодействия лактоферрина с симбиотическими представителями кишечной микробиоты, на котором мы остановимся ниже.

1.2 Возможная роль лактоферрина в формировании кишечной микробиоты

Управление процессом формирования кишечной микробиоты младенца в последние годы рассматривается как одно из перспективных направлений программирования здоровья и профилактики разнообразной хронической патологии [183,102].

От особенностей микробной колонизации кишечника ребенка во многом зависит риск реализации атопических заболеваний и эндокринопатий [199,152,207]. Существуют отдельные исследования, указывающие на возможность антенатального «старта» контаминации кишечника ребенка [182,127,136], но все же более доказательно начало формирования микробиоты с первых минут постнатальной жизни индивидуума [217,101].

На становление микробиоты ребенка влияют как генетические факторы, так и многочисленные воздействия внешней среды. Поскольку первичная колонизация ребенка осуществляется от матери, значимое влияние на характер стартовой микробиоты оказывает способ родоразрешения: при естественных родах ребенок колонизируется вагинальной микробиотой матери, в которой преобладают лактобациллы и бифидобактерии; при оперативных родах источником микробиоты для новорожденного является кожа матери и микроорганизмы окружающей больничной среды – чаще это стафилококки, кишечная палочка и клебсиелла [248,138,219]. Важное влияние на особенности состава микробиоты оказывает гестационный возраст новорожденных: так, у недоношенных младенцев отмечается более низкое содержание *Bifidobacterium* и *Bacteroidetes* и более высокое содержание *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* и *Lactobacillaceae* по сравнению с доношенными новорожденными [97,82].

Негативное влияние на состав формирующейся микробиоты оказывает прием антибиотиков в перинатальном периоде матерью или ребенком: антибиотики снижают разнообразие состава микробиоты, уменьшают содержание индигенных микроорганизмов, причем эти изменения могут сохраняться в течение нескольких месяцев [200,197,139].

Одним из наиболее значимых факторов, определяющих характеристики микробиоты с первых часов постнатальной жизни, является фактор питания. Грудное вскармливание позволяет обеспечить младенца не только пластическими субстратами, но и жизненно необходимыми протективными компонентами, благодаря которым осуществляется модуляция созревания иммунной системы [50,115,101]. Все составляющие грудного молока связаны с потенциальным воздействием на особенности кишечной микробиоты [259]. Установлено, что наибольшими модулирующими эффектами в отношении состава микробиоты обладают такие компоненты грудного молока, как сложные олигосахариды, иммуноглобулины (прежде всего секреторный IgA), лизоцим, цитокины и лактоферрин [49,132,146]. Ферментация лактоферрина в процессе пищеварения высвобождает антимикробный пептид лактоферрицин, блокирующий мембраны микробных клеток [215,256].

Как было показано выше, лактоферрин тормозит образование на слизистой кишки биопленок, формируемых патогенными микроорганизмами, такими как *Streptococcus mutans*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, условно-патогенных *Escherichia coli* [245,38,87]. В то же время в отношении многих симбиотических представителей микробиоты лактоферрин не проявляет бактерицидных / бактериостатических свойств [256].

При этом защитные свойства лактоферрина, выделенного из женского молока и молока животных, различаются: видоспецифические модели гликозилирования, которые меняются в зависимости от стадии созревания молока, могут объяснить разное влияние лактоферрина и его пептидных производных на рост пробиотиков [134]. Так, в нескольких исследованиях было проанализировано влияние лактоферрина коровьего и женского молока

на рост пробиотических бактерий. В культурах *B. infantis*, *B. bifidum* subsp. *pennsylvanicus* (*B. pennsylvanicus*) и *B. longum* ростостимулирующая активность была выше у лактоферрина женского молока, чем в коровьего или козьего молока [174,221]. Однако *B. bifidum*, *B. infantis* и *B. breve* одинаково стимулировались лактоферрином женского и коровьего молока [221]. Бифидогенная активность в отношении *B. infantis* и *B. breve* наблюдалась для лактоферрина из зрелого молока, но не для лактоферрина из молозива [220], так как стадия лактации влияет на степень гликозилирования лактоферрина.

Несколько исследований показали, что, в зависимости от насыщения железом, лактоферрин проявляет различные эффекты на рост пробиотиков (увеличение, снижение или отсутствие эффекта) и ингибирующую активность в отношении патогенов. Анализ пробиотических культур показал, что apoLf ингибирует или не влияет на рост штаммов лактобацилл и бифидобактерий [62,63,262].

Различия в действии лактоферрина на конкретные виды индигенных бактерий (дивергентность или разнонаправленность эффектов) в некоторых исследованиях объясняется видоспецифичностью паттернов гликозилирования у микроорганизмов, которая изменяется в зависимости от концентрации лактоферрина, в свою очередь зависящей от стадии лактации [274,247,91,33].

Стимулирующий эффект лактоферрина в отношении сообщества индигенных бактерий кишечной микробиоты изучался в эксперименте – установлено модулирующее воздействие рекомбинантного человеческого лактоферрина на микробиоту новорожденных поросят. Было показано, что рекомбинантный пептид лактоферрина, состоящий из лактоферрицина (Lfcin) и лактоферрампина (Lfampin), экспрессируемый в *Pichia pastoris*, проявляет мощное пробиотическое действие на бифидобактерии и лактобактерии во всем желудочно-кишечном тракте поросят-отъемышей [77]. Указывают, что пептиды, образующиеся при переваривании лактоферрина женского молока, с большей вероятностью проявляют

бифидогенную активность в отношении *B. bifidum*, а аналогичные метаболиты лактоферрина коровьего молока – в отношении *B. breve* и *B. infantis* [208]. При сравнении бифидогенных свойств смеси, обогащенной лактоферрином, с таковыми свойствами грудного молока, установлено значимое преимущество последнего; предполагают, что при грудном вскармливании бифидогенный эффект лактоферрина синергитически усиливается олигосахаридами грудного молока [208]. Таким образом, механизмы разнонаправленного влияния лактоферрина на кишечную микробиоту младенца требуют дальнейшего изучения.

Сведения о корреляциях уровней индигенных микробов в микробиоте младенца с обеспеченностью его лактоферрином, также противоречивы – как было представлено в выше цитируемых публикациях [256,179,6], это связывается как с различием свойств лактоферрина на разных стадиях лактации, так и с анализом в исследованиях разных видов и штаммов микроорганизмов – пробиотиков. Поэтому для таргетного использования свойств лактоферрина в перспективе необходимы дальнейшие исследования не только бифидогенных качеств препаратов лактоферрина, но и возможностей их избирательного применения у пациентов с разнообразной патологией.

1.3 Особенности становления кишечной микробиоты у детей раннего возраста с пищевой аллергией. Потенциальное участие лактоферрина.

У детей раннего возраста наиболее частой причиной аллергии является пищевая сенсibilизация, ее клиническая картина может проявляться и гастроинтестинальными расстройствами, и ранней манифестацией атопического дерматита [79,251,3,11]. Как установлено по результатам фундаментальных и клинических исследований, пищевая аллергия развивается вследствие «срыва» механизмов иммунной толерантности [73,120]. Механизмы формирования иммунной толерантности связаны с

активацией специфических регуляторных Т-клеток (Tregs) [73,21], на которые могут влиять как генетические, так и эпигенетические (средовые) факторы [94]. Изменения состава кишечной микробиоты могут явиться таким ключевым фактором, влияющим на иммунную толерантность [85,205,185]. Микробиота через продукцию метаболитов, в первую очередь короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), наряду с особенностями питания определяет формирование иммунной толерантности к пищевым антигенам [123,264,216,185]. Микроорганизмы, входящие в состав микробиоты здорового младенца, обеспечивают участие Th1 клеток в реакции на антигены [78], в то время как при состояниях, сопровождающихся дисбиозом, в клеточном «ответе» преобладают клетки Th2 [181]. В экспериментальных исследованиях установлено, что выращенные в стерильных условиях мыши (не обладающие микробиотой) не способны к активации Т-клеток [46], которая происходит в слизистой тонкого кишечника, а этот механизм – необходимое условие индукции толерантности к пищевым аллергенам. Такое же активирующее воздействие на Т-клетки оказывают и пищевые пептиды [76].

Формирование пищевой толерантности связано со сложным взаимодействием между кишечной микробиотой, секреторными IgA и индукцией Tregs-клеток, которые, в свою очередь, продуцируют интерлейкин-10 (IL-10) – важный компонент становления толерантности к пищевым антигенам, причем микробы, входящие в состав микробиоты, могут активировать передачу сигналов в фолликулярных дендритных клетках кишечника [184,185,1].

Недавние исследования показали, что нарушения в составе кишечной микробиоты у новорожденных сопровождаются дисфункцией CD4+Т-клеток, ассоциированной с аллергическими заболеваниями [199], причем в первые месяцы жизни существует «окно возможностей» для воздействия на взаимосвязи микробиоты с Т-клеточным звеном иммунитета [152,260]. Получены свидетельства участия здоровой микробиоты в защите от пищевой

сенсibilизации через модуляцию барьерных свойств энтероцитов и взаимодействие с лимфоидным аппаратом слизистой [125]. Клетки этого аппарата продуцируют интерлейкин–22 (IL-22), стимулирующий продукцию антимикробных пептидов и регулирующий кишечную проницаемость [142]. Отдельные комменсалы – представители кишечной микробиоты – способны индуцировать эти процессы. Так, было установлено, что некоторые виды клостридий, свойственные здоровой микробиоте, стимулируют выброс IL-22, что усиливает защиту от сенсibilизации пищевыми аллергенами [66], в то время как при дисбиозе и снижении уровня указанных микробов развиваются абберантные Th-2 – клеточные реакции, характерные для пищевой сенсibilизации [224].

Факторы риска пищевой сенсibilизации совпадают с таковыми для нарушения формирования микробиоты – это рождение путем кесарева сечения, применение антибиотиков в диаде мать-ребенок, раннее искусственное вскармливание – все эти факторы связаны с повышенным риском пищевой аллергии, в частности, аллергии на белок коровьего молока (БКМ) [214,120,193,8]. Сведения об особенностях кишечной микробиоты у младенцев с пищевой аллергией разноречивы, что связано с различиями изучаемых когорт пациентов [114,120,73]. Указывается на более высокое общее количество анаэробных бактерий при аллергии на БКМ [261] и низкое разнообразие состава кишечной микробиоты в раннем младенчестве [176,237,84]. У младенцев с аллергией были выявлены значительные стартовые особенности кишечной микробиоты: в возрасте одного месяца у этих пациентов преобладали представители рода *Bacteroides*, в возрасте двух месяцев – микробы из родов *Propionibacterium* и *Klebsiella*; в то время как представительство родов *Acinetobacter* и *Clostridium* было снижено в сравнении с здоровыми детьми [25]. Отмечена диссоциация в составе микробиоты у младенцев с аллергией: высокий уровень *Bacteroides* и *Klebsiella* у них сочетался со сниженным уровнем *Clostridium*, что связывают с антагонизмом между этими микробами, так как *Clostridium* продуцируют

КЦЖК, к которым чувствительны *Bacteroides* [81]. Azad MB. и соавт. обнаружено, что повышенное соотношение Enterobacteriaceae/Bacteroidaceae и низкое содержание *Ruminococcaceae* (класс Clostridia) в раннем младенчестве связаны с последующей пищевой сенсibilизацией [64]. Напротив, Penders J. и соавт. показали, что колонизация Clostridia у 5- и 13-недельных детей была связана с более высоким риском развития атопического дерматита [98]. West C.E. и соавт. продемонстрировали, что дети с IgE-ассоциированным атопическим дерматитом имеют более низкий уровень грамположительных Ruminococcaceae, что связано с избыточным ответом Th2; указывается, что микробиота кишечника младенцев может быть связана с развитием экземы посредством модуляции иммунных сигналов [119]. Та L.D.H. и соавт. показали, что у младенцев с атопическим дерматитом траектория развития кишечного микробиома изменена. Наблюдалось обогащение Enterobacteriaceae в возрасте трех недель жизни и задержка колонизации Bacteroidaceae, что приводило к увеличению соотношения Enterobacteriaceae/Bacteroidaceae у младенцев с атопическим дерматитом [20]. Arrieta M.C., и соавт. продемонстрировали транзиторный дисбиоз кишечной микробиоты у детей с риском развития астмы в течение первых месяцев жизни. У этих детей уменьшено содержание *Lachnospira*, *Veillonella*, *Rothia* и *Faecalibacterium* в кишечном микробиоме в возрасте трех месяцев. Кроме того, было показано, что инокуляция стерильных мышей этими четырьмя микробами уменьшает воспаление дыхательных путей, что позволяет предположить, что они могут играть защитную роль в развитии астмы [84], в рамках развития «атопического марша» в том числе.

Таким образом, значимость уровня клостридий как маркера «аллергической микробиоты» неоднозначна – так, у детей с IgE-опосредованной пищевой аллергией отмечены повышенные уровни *Clostridium sensu stricto* и *Anaerobacter* при сниженных уровнях не только *Clostridium XVIII*, но и *Bacteroides*, причем уровни *Clostridium sensu stricto* коррелировали с уровнями IgE [34]. Современные методы исследования

(дифференцирование бактериальных таксонов) позволили выявить снижение конкретных таксонов рода *Clostridium* в микробиоте, связанной с развитием пищевой аллергии; в то же время при более благоприятном течении аллергии (в частности, на БКМ) наблюдается обогащение содержания таксонов из класса Clostridia и типа Firmicutes (совр. Bacillota) [83]. В эксперименте установлено, что спорообразующие кластеры рода *Clostridium* способствуют активации Tregs-клеток, играющих важную роль в обеспечении пищевой толерантности [258].

Связь между микробиотой и иммунной системой осуществляется через продукцию микробами активных метаболитов, к которым относятся КЦЖК [67]; при этом виды класса Clostridia, относящиеся к кластерам IV и XIV-а являются основным продуцентом этих метаболитов, повышающих барьерную защиту слизистой и активирующих Tregs-клетки [40]. Отдельные исследования показали сниженный уровень одного из таких метаболитов – бутирата – у младенцев с аллергическими заболеваниями [109].

Исследования метаболома (метатранскриптомика) позволяют оценить не только состав, но и функциональную активность кишечной микробиоты при аллергии, что в будущем позволит наметить пути индивидуализированного управления микробиотой. Исследования метагеномных и метаболических особенностей кишечной микробиоты только начаты; в настоящее время перспективы направленной её коррекции при аллергии связывают с изучением метаболического профиля КЦЖК [73,204]; в перспективе с помощью методов ионно-циклотронного и ядерно-магнитного резонанса возможно выявление специфических микробных биомаркеров (сигнальных путей) для определенных типов пищевой аллергии [73]. Перспективным направлением при изучении особенностей микробиома при пищевой аллергии является также протеомика [26]. Протеомные методы (идентификация белков и их посттрансляционных модификаций) позволяют качественно и количественно анализировать различные аллергены [233], к настоящему времени их идентифицировано более 850 [203]. В последние

годы с помощью протеомных методов установлены связи между дисбиозом микробиоты полости рта и структурой белков слюны у полисенсibilизированных пациентов с атопией [266], что открывает возможности направленной коррекции микробиоты. Качественная и количественная оценка нарушений в составе микробиоты может быть также осуществлена с помощью определения пептидных или белковых биомаркеров (метапротеомный анализ) [129]. В процессе метапротеомного исследования были идентифицированы репортёрные белки, отражающие нарушения в микробиоте младенцев с атопическим дерматитом— восемь белков были определены в качестве маркера этого заболевания [37]. В перспективе метапротеомные исследования, как ожидается, позволят персонализировать терапию такого серьезного аллергического заболевания, как бронхиальная астма [65].

Исходя из вышеизложенного, кишечная микробиота ребенка с аллергией в настоящее время признана в качестве одной из основных мишеней для профилактических и лечебных стратегий в отношении пищевой (и не только) аллергии у детей [73,120,9].

Грудное вскармливание младенца из группы риска по развитию аллергии обеспечивает предпосылки формирования здоровой микробиоты, так как олигосахариды грудного молока способствуют росту КЦЖК-продуцирующих комменсальных бактерий [130,14]. Впоследствии, при введении прикорма, продукты с высоким содержанием клетчатки индуцируют рост пробиотических микроорганизмов бифидо- и лактобактерий с увеличением уровня КЦЖК в сыворотке [116,5,18,12].

Рекомендации по использованию препаратов пре- и пробиотиков у детей с аллергией противоречивы. Так, имеются отдельные свидетельства об эффективности пробиотиков при профилактике и лечении детской экземы, хотя уровень доказательности в этих исследованиях низкий [105,17,14]. Следует учитывать, что эффект от такой терапии определяется во многом штаммоспецифичностью избранного препарата пробиотика [100]. В этом

плане описаны профилактические и лечебные эффекты таких штаммов, как *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) [90,253], хотя другие публикации этих эффектов не подтверждают [124]. Заслуживают внимания исследования, оценивающие совместный эффект введения пробиотика и модификации белкового состава молочной смеси [45] – авторы показали, что использование смеси с экстенсивно гидролизованным казеином, обогащенной LGG, индуцирует более сильную эпигенетическую регуляцию генов, определяющих функции клеток Th-1 и Th-2 (по уровню метилирования соответствующих областей их генома), что может обеспечить долгосрочный протективный эффект этой стратегии.

С целью дополнения кишечной микробиоты бутират-продуцирующими анаэробами для пациентов с пищевой аллергией ранее были успешно апробированы добавки некоторых комменсальных микроорганизмов [249,26]. В экспериментах на животных микроорганизмы рода *Bacteroides*, выделенные от человека, способствовали развитию толерантности при пищевой аллергии [187]. В последние годы разработаны пищевые добавки, нацеленные на коррекцию дисбиоза, в том числе и при пищевой аллергии у детей – они содержат пробиотики и синбиотики [32,229,24]. В перспективе рассматривается возможность трансплантации здоровой фекальной микробиоты [275] или отдельных её представителей. Так, имеются экспериментальные и клинические данные о профилактическом и лечебном эффекте повторных введений некоторых видов клостридий в отношении симптомов аллергии [186].

В отношении использования протективных субстанций грудного молока для коррекции микробиоты у детей с аллергией имеются отдельные противоречивые данные. Так, были выполнены исследования влияния добавок лактоферрина на некоторые показатели иммунитета и частоту инфекций дыхательных путей: обнаружен иммуномодулирующий эффект на клеточные популяции и снижение выраженности системного воспаления у пациентов всех возрастов, прежде всего у детей [47].

В то же время, сообщается о возможной связи значительно повышенной концентрации лактоферрина в грудном молоке матерей в раннем послеродовом периоде, у детей которых в последующие месяцы жизни манифестировали проявления атопии; при этом в двухлетнем возрасте проявления атопии сохранялись у детей матерей с наиболее высокими уровнями лактоферрина или при сочетании повышенных уровней лактоферрина в молоке и IL-17 [22]. В некоторых публикациях лактоферрину коровьего молока приписывается одна из основных этиологических ролей в развитии аллергии к БКМ [148]. Имеются также экспериментальные работы, в которых показана возможность поражения дыхательных путей у животных по типу бронхиальной астмы при введении коммерческого препарата человеческого лактоферрина [195].

Многие работы, напротив, свидетельствуют о возможности использования препаратов лактоферрина для профилактики и лечения аллергических реакций. Так, препарат на основе коровьего молока, содержащий комбинацию лактоферрина и иммуноглобулина, обеспечил достоверное улучшение состояния кожи при атопическом дерматите у детей [211]. Лактоферрин может уменьшить аллергическое воспаление кожи (по данным экспериментальных и клинических исследований), что авторы объясняют способностью лактоферрина уменьшать продукцию фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) [271], а также индукцией фагоцитарной активности при аллергии к токсинам стафилококка [178].

Возможная антиаллергическая эффективность рекомбинантного человеческого лактоферрина изучалась в эксперименте; установлено, что при аллергическом рините у мышей интраназальное введение этого препарата облегчает течение болезни, что авторы связывают со стимуляцией экспрессии эндогенного лактоферрина и активацией Th-1-клеток [159].

Суммируя сведения, приведенные в этом разделе, можно сделать вывод о значительном многообразии факторов, определяющих характеристики кишечной микробиоты у младенцев с аллергией. Взаимосвязи этих факторов

с выраженностью дисбиоза, а также векторы влияния потенциальных индукторов кишечной микробиоты на динамику клинико-иммунологических проявлений аллергии остаются недостаточно изученными.

1.4 Препараты лактоферрина и перспективы их использования.

В настоящее время интерес к лактоферрину человека связан с возможностью промышленного биопроизводства этого бактерицидного белка и создания на его основе новых продуктов функционального питания, высокоэффективных и биологически безопасных лекарственных средств нового поколения противoinфекционной направленности, в том числе, для клинической и практической педиатрии. Однако до настоящего времени промышленно выпускается только лактоферрин из коровьего молока, содержание которого составляет всего лишь 0,02 г/л [270]. Известно, что, по набору аминокислот чЛФ и бЛФ совпадают лишь на 67%. Различия в первичной структуре бЛФ и чЛФ обуславливают формирование разной вторичной и третичной структуры этих белков, что может определять их функциональные особенности [244]. В частности, найдены различия в строении рецепторов различных органов и тканей человека к чЛФ и бЛФ. Установлено, что рецепторы тонкой кишки человека более специфичны к чЛФ, чем к бЛФ. Оптимальный показатель рН для связывания чЛФ со специфическими рецепторами равен 6,5 – 7,5, что соответствует значению рН тонкой кишки новорожденных детей. Предполагаемой функцией рецепторов тонкой кишки к чЛФ является содействие всасыванию железа. Рецепторы к чЛФ, аналогичные рецепторам тонкой кишки, удалось найти в слюнных железах, сердце, скелетных мышцах, надпочечниках, поджелудочной железе. Два других типа специфических рецепторов к чЛФ найдены в печени: рецепторный белок липопротеидов низкой плотности (LRP) и асиалогликопротеиновый рецептор (ASGPR) [60]. Различия между чЛФ и бЛФ имеются и в особенностях гликозилирования ЛФ, которое, как известно, существенно влияет на активность белка.

Основными направлениями использования продуктов на основе лактоферрина являются:

- в качестве компонента лечебного и функционального питания, в том числе детского;
- в составе БАДов;
- в стоматологической практике;
- в гинекологии;
- в дерматологии;
- в онкологии;

и др.

Основное внимание сегодня приковано к детским смесям с Лф. На рынке детского питания Лф эффективно включается в формулы за счет таких характеристик ЛФ, как антиоксидантный эффект, антибактериальный и противовирусный, поддержка желудочно-кишечного тракта, иммунитета, транспортировка и усвоение железа, снижение *Helicobacter pylori*.

В целом, перед разработчиками детского питания ставится одна задача, чтобы предоставить младенцам все необходимые питательные вещества, в соответствии с их возрастом [35]. Европейское ведомство по безопасности пищевых продуктов, EFSA с 2012 г. одобрило бЛф в качестве нового пищевого ингредиента и подтвердило безопасное потребление – 1,2 г коровьего Лф в день от 0 до 6 месяцев, что отражено во многих продуктах – где содержится 200 мг бЛф в 100 гр сухой смеси детского питания [89].

В большинстве новых научных разработок детского питания, среди ингредиентов, обладающих защитными и трофическими свойствами, для достижения максимального физиологического эффекта на растущий организм ребенка [206], обязательно присутствует Лф. Особое внимание обращено на его функции связанные с его способностью связывать железо. Они очень важны т.к. через них реализуются многие биологические эффекты ЛФ: бактериостатический, антиокислительный и др. [191]. В настоящее время бЛФ добавлен как дополнение к нескольким продуктам в Японии,

включая младенческую формулу йогурта [51]. Такие же младенческие формулы, обогащенные бЛФ, доступны в других странах, включая Индонезию, Южную Корею и Испанию [69].

Поскольку роль лактоферрина в организме ребенка крайне разнообразна – от стимуляции роста слизистой желудочно-кишечного тракта до системного иммунологического ответа, медики и диетологи ищут новые возможности [68] его использования. Например, Лф удачно сочетается с пробиотиками. Коровий Лф может проявлять бифидогенную активность синергично с другими компонентами молока, например олигосахаридами [208]. Поэтому включение Лф в рацион ребенка приносит большую пользу. У младенцев, которым было добавлено к питанию витаминизированное молоко с ЛФ, наблюдалось значительное увеличение содержания общего железа и усиление его абсорбции в кишечнике [206].

Оснований считать Лф необходимым компонентом детского питания уже достаточно [206].

Среди продуктов детского питания исследователей интересуют только смеси на молочной основе. Что касается детского питания с лактоферрином, то в большинстве случаев он интегрирован как один из сопутствующих или доминирующих ингредиентов (вынесен на этикетку), когда он позиционируется в качестве иммунологического триггера или компонента общеукрепляющей направленности. Конечно, наиболее востребованными версиями детского питания с лактоферрином, могли бы стать профилактические комплексы и с указанием на терапевтический эффект.

Компания Морианага (Япония) занимается изучением Лф коровьего молока с 1963 года и является одним из крупнейших в мире производителей этого Лф, а также одним из крупнейших пользователей Лф в коммерческих продуктах питания, таких как молочные смеси, йогурт, молоко и БАДы [<https://www.foodinfotech.com/morinaga-milk-expands-lactoferrin-production-capacity-in-german-subsidiary-milei-gmbh/>]. Оригинальные используемые компанией технологии позволяют извлекать Лф из молока и сыворотки и

стерилизовать его, несмотря на высокую чувствительность этого белка к температуре, что важно для приготовления как продуктов для детей грудного возраста, так и йогурта.

Среди грандов компаний по детскому питанию – Danone S.A., Ella's Kitchen Group Ltd., Nurture Inc. (Happy Family), H.J.Heinz Co, Parent's Choice, Plum Organics, Sprout Foods Inc., и Stonyfield Farm Inc., почти каждая имеет в своих составах детского питания лактоферрин. На одни упаковки выносят возраст детей «infant formula (IF)», «follow-on formula (FOF)» и «growing-up milk (GUM)» на другие более заметно – функциональную особенность.

Все базовые формулы построены на готовых порошках ЛФ. Каждая из компаний, выпускающая Лф (Alcon Laboratories, Metagenics, Vida Nutriscience, MP Biomedicals, Symbiotics, Prohealth Inc. Synlait Milk), обладает своими ноу-хау по его выделению и очистке. Одни из них довольно сложные, другие максимально упрощены.

На многих предприятиях производятся и готовые продукты. Например, в компании Glanbia Nutritionals налажен выпуск различных аминокислот, ингредиентов специального назначения, функциональных ингредиентов, микронутрентных премиксов, сложных пептидов, а также Лф, представленного в 3-х видах:

– Bioferrin ® 1000 Лф, биологически активные молочный белок, выделенный из сыворотки, с использованием технологии фракционирования. Он обеспечивает максимальную биологическую активность Лф путем защиты от денатурации при высокой температуре.

– Bioferrin ® 2000 Лф является биологически активным молочным белком, полученным из сыворотки, с использованием технологии разделения фракционированием. Из него можно производить любые продукты.

– Bioferrin ® 5000 анти-возрастной белок, используется местно, способствует росту кожи, повышает синтез гиалуроновой кислоты кожи, оказывает на кожу сглаживающий эффект

(<http://www.glanbianutritionals.com/products/whey-proteins>)

Существуют готовые коммерческие формулы, в которых кроме ЛФ, присутствуют и иные физиологически важные компоненты. Компания ArlaFoodsIngredients (<http://www.arlafoodsingredients.com>) (Дания-Аргентина) выпускает специализированную формулу – Lactrodan® MFGM-10 представляющая из себя смесь белков и липидов, обогащенных Лф и фосфолипидами.

В Новой Зеландии в компании Fonterra и LactoPharma, разработано мороженное ReCharge ice cream с Лф для снятия отрицательных симптомов после химиотерапии (диарея). Данное клиническое использование включало ежедневный прием 500-1000 мг Лф в 100 граммах клубничного мороженого [235].

Производятся также концентрат для приготовления кефира (продукт содержит молочнокислые бактерии, порошок кефирный, целлюлозу, стеарат кальция, лактоферрина концентрат и др.)

(<http://global.rakuten.com/en/store/sankyosupple/item/0622/>).

Рецептура йогуртов с Лф, основана на привычных ингредиентах поскольку Лф не взаимодействует ни с одним из них. К примеру, коровий Лф добавляли в концентрации 0.5, 1, и 2 мг/мл в формах с железом и без. Подбор физико-химических свойств, таких как рН фактор, концентрация молочной кислоты, структура йогуртов, определялись из расчета максимального хранения – срока годности (28 дн) при 4°C. Основное внимание уделили сохранению стабильности Лф при добавлении в йогурт в течение времени хранения [86].

В последние годы активно развивается рынок биологически активных добавок к пище (БАД). Разработка новых БАД продуктов с направленными функциональными свойствами, а также повышение эффективности действия существующих продуктов относится к одной из актуальных проблем современной фармакологии и пищевой биотехнологии.

Одним из направлений решения данной проблемы может быть применение в питании биологически активных природных комплексов.

Среди таких соединений можно назвать биологически активные белки молока, в частности лактоферрин, которые являются естественными факторами защиты живых организмов и обладают целым рядом уникальных свойств. Однако следует отметить, что технологические приемы, используемые при производстве молочных продуктов, приводят к инаktivации или значительному снижению исходного содержания биологически активных веществ в сырье. В этой связи рациональное использование сырьевых ресурсов, более глубокая и полная их переработка, а также поиск новых подходов сохранения биологически активных веществ в готовой продукции являются приоритетными направлениями в науке и технологии.

Для усиления функциональных свойств биологически активных белков молока сегодня традиционно их комплексируют с пробиотическими микроорганизмами, которые широко используются в технологии изготовления молочных продуктов. Известно, что пробиотические бактерии относят к функциональным компонентам. Это обусловлено тем, что пробиотические микроорганизмы являются естественными обитателями кишечника человека, которые способствуют нормализации микробиоты желудочно-кишечного тракта, а продукты их метаболизма участвуют в регулировании таких важнейших функций, как обмен веществ, укрепление иммунитета, снижение концентрации токсических веществ, улучшение общего самочувствия и др.

Среди разнообразных продуктов с Лф можно выделить даже разные формы, например:

- Желе. Компания HsinYaoBiotechnology Co.,Ltd желе с лактоферрином Lactoferrin Gold Whey Nutritional Jelly
- Таблетки. Про-Флора TM для иммунной поддержки формулу, содержат лактоферрин, который поддерживает здоровый статус микрофлоры кишечника и участвует в размножении полезных бактерий.

- Пастилки с лактоферрином. LactoSeven пробиотики (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*), инулин и лактоферрин.
- Капсулы. Компания Jilin Nanpeng Food Co. Ltd мягкие желатиновые капсулы с лактоферрином Yaco DHA Soft Capsule.
- Порошковая форма. WUXI LIBBY LOK TRADE CO, LTD пакетики с сыпучим лактоферрином Go и Young Young Health в порционных саше упакованы в банки.
- Жевательные таблетки колострума для детей (Kids Colostrum Chewable Tablet), которые содержат лактоферрин.
- ЛИФЕРОПОЛ (LIFEROL®) капсулированный БАД с лактоферрином и цинком.
- Форевер Иммубленд – содержит такие иммуномодулирующие компоненты формулы, как фруктоолигосахариды, лактоферрин, вместе с грибами маитаке и шиитаке в сочетании с витаминами С, D и цинком для дополнительной защиты.
- Гастропробиотик Flosin Tabs (Sintal Dietetics), содержащий бактериальные культуры и лактоферрин.
- Шарики с лактоферрином (пробиотический баланс + лактоферрин). Умный пробиотик™ (Enzymatic).
- Асекурин (Aflofarm Farmacja) это препарат, содержащий композицию трех компонентов: пробиотик, пребиотики, лактоферрин.
- Таблетки для рассасывания со вкусом йогурта, содержащие лактоферрин от компании DHS включает в свой состав бифидобактерии, гиалуроновую кислоту и олигосахариды.
- Биологическая добавка для детей – Ekolostrum® MUPI®:
- Биодобавка – Podpora imunity Premium Lactoferrin – Лф и витамин B6.

В России применение Лф в лечебной практике пока не получило широкого распространения, поскольку полученные результаты использования бЛф оказались весьма неоднозначными. По-видимому,

основная причина этого состоит в ксеногенности белка бЛф для человека. Очевидно, что реализация биологической активности бЛф, установленная *in vitro*, в организме человека, может существенно отличаться от эффекта чЛф, который при проявлении своих защитных функций вступает в кооперацию с другими бактерицидными белками человека. Кроме того, результаты использования бЛф, в значительной степени оказались зависимыми от технологии промышленного выделения этого белка из молока коров. Различные коммерческие образцы бЛф, имеют различную концентрацию активного белка и степень его очистки. При необходимости использования бЛф в российских педиатрических учреждениях, необходимо будет иметь отечественную технологию получения высококачественного бЛф, соответствующего требуемым стандартам. По этой причине в РФ, в детском питании, продукты с бЛф широкого распространения пока еще не получили.

В фокусе научных интересов отечественной школы ученых и клиницистов, занимающихся проблемой лактоферрина, традиционными были исследования чЛф, выделенного из женского молока, с возможностью его дальнейшего медицинского использования. Были получены положительные результаты в экспериментальных исследованиях на животных и в клинике [19]. Однако, промышленное производство пищевых продуктов и лекарственных средств на основе чЛф, выделенного из женского молока практически неосуществимо из-за невозможности его получения в таких масштабах. В связи с этим была поставлена задача по получению высокоактивного и биологически безопасного чЛф с использованием методов современной биотехнологии. Такой инновационный белок биоаналог лактоферрина человека получен и уже начато его опытное производство. В настоящее время на рынок выпущены два первых препарата на основе биоаналога лактоферрина человека: GoldoferrinC (БАД с лактоферрином и витамином С) и GoldoferrinSpray (гигиенический ополаскиватель для полости рта) [<https://goldoferrin.com/products/>].

ГЛАВА 2. ОБЪЕМ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая характеристика этапов исследования

Работа проводилась в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, на базе Перинатального центра Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Мытищинская городская клиническая больница» (главный врач – к.м.н. О.А. Мисюкевич) и в Научно-исследовательском институте педиатрии и охраны здоровья детей Научно-клинического центра №2 (руководитель – академик РАН Л.С. Намазова-Баранова) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского (ЦКБ РАН)» (директор – академик РАН К.В. Котенко).

Комплекс лабораторных исследований был проведен в лаборатории «Трансгенбанк» ФГБУН Института биологии гена Российской академии наук (заведующий – к.м.н. Гольдман И.Л.), лаборатории «ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского (ЦКБ РАН)» (заведующая – к.м.н. О.В. Дымова).

В соответствии с задачами диссертационной работы дизайн исследования включал четыре последовательных этапа:

I этап – определение содержания лактоферрина в материнском молоке и фекалиях новорожденных различного гестационного возраста в начале и конце неонатального периода;

II этап – оценка бифидогенного эффекта аналога человеческого лактоферрина в эксперименте *in vitro*;

III этап исследования – изучение формирования кишечной микробиоты у детей первых шести месяцев жизни с начальными проявлениями аллергии;

IV этап – исследование особенностей состава кишечной микробиоты у детей с аллергическими заболеваниями во втором полугодии жизни.

В работе представлены результаты клинического наблюдения за 107 детьми на протяжении первых 500 дней онтогенеза (270 дней внутриутробного и 230 дней постнатального онтогенеза). На первом этапе обследовано 57 новорожденных и их матери, на втором этапе выполнено исследование *in vitro*, на третьем этапе обследовано 50 детей с начальными проявлениями аллергии в среднем возрасте 2-3 месяца жизни, на четвертом этапе – в процессе проспективного динамического исследования обследовано 35 детей с аллергическими заболеваниями в возрасте 6-8 месяцев. Возрастной диапазон повторного обследования пациентов был связан с различиями во времени введения стартовых блюд прикорма в наблюдаемой когорте детей.

2.2 Методы клинико-лабораторного обследования пациентов

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при ФГБУЗ ЦКБ РАН (протокол № 148 от 15.12.2020 г.), все участники исследования подписывали информированное согласие. Были использованы современные методы обработки информации и статистического анализа.

Для выполнения поставленных задач были использованы методы: общепринятые клинические, иммунологические, микробиологические, статистические.

Клиническое обследование детей проводилось по общепринятому протоколу и включало тщательный сбор и анализ жалоб, анамнестических данных, включая наследственный анамнез, клинический осмотр и оценку неврологического статуса. При сборе анамнеза проводился анализ течения беременности у матерей и особенностей родов. В родильном зале оценивалось состояние новорожденного по шкале APGAR (на 1-ой и 5-ой минутах), для оценки соответствия морфофункциональной зрелости новорожденного сроку гестации применялась шкала Баллард (Таблица 2).

Таблица 2 – Оценка морфофункциональной зрелости новорожденного ребенка

Признак	Баллы						
	1	0	1	2	3	4	5
Кожа	липкая, рыхлая прозрачная	желатинозная, красная, прозрачная	гладкая, розовая, видимые вены	поверхностное шелушение видно немного вен	поверхностные трещины, редкие вены	пергаментооб- разная глубокие трещины, сосуды не видны	зрелая, толстая морщинистая , складчатая
Лануго	нет	редкое	обильное	необильное	мало, есть области без лануго	редкое, в основном, кожа без лануго	
Поверхность подошвы	длина стопы 40-50 мм: 1; <40мм: 2	>50 мм нет складок	нечёткие красные полосы	заметна только передняя поперечная борозда	борозды покрывают передние 2/3 стопы	борозды покрывают всю стопу	
Грудные железы	не определяются	едва определяются	сосок не выражен ареола плоская	ареола чётко очерчена, диаметр железы 12 мм	ареола возвышается, диаметр железы 34 мм	ареола полностью сформирована , диаметр железы 510 мм	

Глаз / ухо	веки сомкнуты неплотно: 1 плотно 2	глаза открываются, ушная раковина плоская, при сгибании остаётся не расправленной	часть ушной раковины загнута внутрь; ушная раковина мягкая, при сгибании расправляется медленно	вся верхняя часть ушной раковины загнута внутрь; ушная раковина мягкая, при сгибании легко расправляется	вся верхняя часть ушной раковины загнута внутрь; твёрдая, сразу же расправляется после сгибания	плотный хрящ; негибкая ушная раковина	
Гениталии (мальчики)	мошонка пустая, гладкая	мошонка пустая, незначительные складки	яички расположены над входом в мошонку, редкие складки	яички опускаются в мошонку (процесс не завершён), несколько складок	яички опущены в мошонку, складки хорошо выражены	яички свободно подвешены в мошонке, хорошо выражены, глубокие складки	
Гениталии (девочки)	выступающий клитор, плоские половые губы	выступающий клитор, полностью открытые небольшие малые половые губы	выступающий клитор, полностью открытые малые половые губы	одинаково выраженные большие и малые половые губы	большие половые губы частично закрывают малые	большие половые губы полностью закрывают малые половые губы и клитор	

Примечание: если один из критериев может оцениваться двумя показателями, то учитывается наибольший.

Всем наблюдаемым детям проводились рутинные лабораторные и инструментальные исследования: общие анализы крови и мочи, биохимический анализ крови, копрологический анализ, УЗИ внутренних органов и головного мозга в рамках динамических осмотров.

Определение концентрации лактоферрина в грудном молоке женщин и фекалиях младенцев проводилось в 57 диадах мать-дитя иммуноферментным методом с использованием коммерческого набора Hbt human Lactoferrin ELISA TEST KIT (HyCult Biotechnology, Нидерланды). В соответствии со стандартными процедурами забор образцов молозива и зрелого молока был проведен утром (7–9 часов). В целях единообразия для отбора образцов в родильном доме использовались электрические клинические молокоотсосы. Для анализа использовались смешанные образцы 1:1 (смесь переднего и заднего молока). Особенности питания матери не учитывались. Все образцы молозива и зрелого молока были взяты из излишков, полученных при сцеживании. Для индивидуального анализа требовались образцы по 0,5–2 мл. Образцы собирались в стерильные пробирки объемом 2 мл, охлажденными при температуре +4 ° С в специально выделенном холодильнике до транспортировки в лабораторию. Образцы были доставлены в специальном контейнере-холодильнике в лабораторию Института биологии гена не позднее 3-х часов после забора, таким образом, обеспечивалась стабильность образцов и рекомендуемая температура транспортировки. Все образцы молозива и зрелого молока хранились при одной и той же температуре (+4°C); образцы не были подвергнуты пастеризации. Образцы кала у каждого ребенка собирали в возрасте 48-72 часов после рождения (меконий) и в 1 месяц. Забор фекалий производился в стерильные флаконы емкостью 2 мл. Материал доставлялся в лабораторию не позднее 3 часов после забора образцов. Суть использованного для определения концентраций лактоферрина иммуноферментного метода состоит в классическом сэндвиче из специфических иммуноглобулинов, взаимодействующих с эпитопами лактоферрина и помеченных конъюгатами (по приложенной прописи из

набора). Расчет результатов проводили путем вычисления средних значений абсорбции (A450) для дублей каждого из стандартов, образцов и контролей. Строили калибровочную кривую с использованием метода аппроксимации. Полученные результаты оценивали в соответствии с референсными значениями.

Микробиологическое исследование фекалий на патогенную и условно-патогенную флору проводили классическим бактериологическим методом [16] у 50 детей.

Микробиологическое исследование позволило оценить состав микробиоценоза кишечника: содержание и соотношение комменсальных индигенных, условно-патогенных, патогенных микроорганизмов в фекалиях. К нормальной микрофлоре кишечника относятся: лактобактерии, бифидобактерии, энтерококки, типичные кишечные палочки, бактероиды (анаэробы). К условно-патогенным относят: стафилококки, клостридии (анаэробы), энтеробактерии, неферментирующие бактерии. Патогенные микроорганизмы: сальмонеллы, шигеллы, патогенные эшерихии. Дисбиоз кишечника – это нарушение состава и количественного соотношения бактериальных и грибковых микроорганизмов желудочно-кишечного тракта.

Забор фекалий (средняя порция кала после дефекации) производился в стерильные флаконы ёмкостью 10 мл в количестве ≥ 2 гр. Материал доставлялся в лабораторию не позднее 2 часов после дефекации. 1гр нативного кала гомогенизировали в 9 мл физиологического раствора для получения разведения материала 10^{-1} . Из данного разведения проводился высеив на среды для выделения бактерий, а также делались дополнительные десятикратные разведения материала в физрастворе до 10^{-11} . Из полученных разведений делали дозированные посеивы на питательные среды для культивирования различных групп микроорганизмов. Количественное содержание выделенных микроорганизмов выражали в КОЕ/г.

Дисбиоз кишечника определяли, при умеренном/значительном ($<10^7$ КОЕ/г) снижении количества бифидобактерий, лактобацилл, появлении

изменённых форм кишечной палочки, выявлении одного или нескольких представителей микроорганизмов в высоких титрах (до 10^7 - 10^8 КОЕ/г).

Состояние гуморального иммунитета оценивалось с помощью количественного иммуноферментного анализа иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG, IgE в сыворотке крови на автоматическом анализаторе StatFax2100, США. Материалом для иммунологического исследования была венозная кровь, взятая из локтевой вены. Пробирки с кровью транспортировали в лабораторию в специальных контейнерах для биоматериалов не позже 2-х часов с момента забора. Для количественной оценки антител использовали твердофазный иммуноферментный анализ ELISA. Исследование проводили в три этапа: на первом – сыворотку инкубировали с антигенами, фиксированными на твердом субстрате (полистероловая микропланшетка). На втором этапе – после связывания антигена исследуемой сыворотки с антителом на границе твердая фаза – жидкость, не связавшиеся антигены удаляли многократным промыванием лунок. На третьем этапе вносили меченную пероксидазой антисыворотку к антителам, связавшим антигены. Путем спектрофотометрии определяли количество фермента-маркера, связавшегося с антителом.

Для выявления принадлежности аллергического заболевания к атопическому у 50 детей первого года жизни была применена технология *ISAC ImmunoCAP*. Анализ проводился по приложенной прописи.

Концентрация аллерген-специфических *IgE* в сыворотке крови пациента оценивалась с помощью референсных значений (Таблица 3).

Количество проведенных исследований и методы обследования представлены в Таблице 4.

Таблица 3 – Оценка концентрации аллерген-специфических IgE в сыворотке крови пациента

Класс	Уровень sIgE	Концентрация sIgE, кUA/l	Степень выраженности аллергена
0	Отсутствует или обнаруживается с трудом	0,00-0,34	-
I	Низкий	0,35-0,69	+/-
II	Средний	0,7-3,49	+
III	Умеренно высокий	3,5-17,5	++
IV	Высокий	17,5-50	+++
V	Очень высокий	50-100	++++
VI	Предельно высокий	>100	+++++

Таблица 4 – Объем проведенных клинических исследований

Название исследования	Количество детей, n	Количество исследований, n
Клинический осмотр с оценкой анамнеза	107	214
Общий анализ крови	106	106
Общий анализ мочи	50	50
УЗИ органов брюшной полости	50	85
Биохимический анализ крови	50	85
Определение основных классов иммуноглобулинов	50	85

методом ИФА		
Определение профиля сенсibilизации методом ISAC ImmunoCAP	50	85
Бактериологическое исследование кала	50	85
Определение содержания лактоферрина в женском молоке методом ИФА	57	114
Определение содержания лактоферрина в фекалиях новорожденных методом ИФА	57	114

2.3 Методы исследования *in vitro*

Использован биотехнологический аналог лактоферрина человека (рчЛФ) (Институт биологии гена РАН, Россия).

В исследование были взяты *Bifidobacterium bifidum* (коллекционный номер штамма N 900791), *B. adolescentis* (номер депозита ЦМПМ N В-1987) и *B. longum* (номер депозита ЦМПМ N В-2000) (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов), *B. breve* (штамм №МСС1274), *B. infantis* (штамм №35624) (АО «Партнер», Россия).

Для определения стимулирующего эффекта рчЛф на различные виды бифидобактерий применяли скрининговый метод оценки, для чего использовали среду Блаурокка (применительно к МУК 4.2.999-00 «Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах») с добавлением различных концентраций рчЛф. Для определения титра КОЕ бифидобактерий исходные образцы лиофилизированных культур суспендировали в 100 мл фосфатного буферного раствора и далее титровали методом десятикратных разведений, перенося 1 мл полученного раствора в пробирку с 9 мл среды и далее таким образом до разведения 10^{-8} . В качестве учетных разведений использовали две последние пробирки, где наблюдался рост. Посевы в трех повторах инкубировали в течение 72 ч при температуре 37°C. При исследовании действия лактоферрина на бифидобактерии стерильный раствор белка добавляли в пробирки с остывшей до 37°C питательной средой.

Основываясь на том, что используемая нами среда Блаурокка не является дефицитной по железу и другим пищевым компонентам, которые могли бы повлиять на рост бифидобактерий в присутствии рчЛф, было проверено, имеет ли место разная аффинность связывания исследуемого белка со штаммами *B.bifidum* и *B.infantis*. Для этого был использован биотинилированный рчЛф, а в качестве контроля биотинилированный бычий сывороточный альбумин (bBSA). В реакции связывания использовали 1×10^7 КОЕ бифидобактерий и 1 мкг биотинилированного рчЛф или bBSA в качестве контроля. Компоненты предварительно растворяли в фосфатном буферном растворе с 0,05% твином 80 (PBS/твин 80), общий объем смеси составлял 2 мл. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, далее клеточную культуру отмывали, используя четырехкратную процедуру центрифугирования-ресуспендирования в PBS/твин 80, добавляли авидин, меченный пероксидазой хрена (Имтек, Россия), и инкубировали в течение 1 ч. Культуру бифидобактерий отмывали от несвязавшегося авидина, используя 4-кратную процедуру центрифугирования-ресуспендирования.

После отмывки осадок бифидобактерий ресуспендировали в фосфатном буферном растворе, добавляли 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (НИОПИК, Россия) и перекись водорода (Лаверна, Россия), измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм для определения активности пероксидазы. Для сравнения результатов экспериментов между двумя видами бифидобактерий значение средней оптической плотности, измеренное при инкубировании рчЛф и *B. bifidum*, принимали за 100%, остальные значения пересчитывали относительно данного значения. Эксперимент выполняли в трехкратной повторности (Таблица 5).

Исследование кинетики роста бифидобактерий в присутствии различных концентраций рчЛф проводилось по сравнению с контрольной средой, где этот белок отсутствовал. Культивирование бифидо- и лактобактерий в экспериментальном ферментере проводилось в соответствии с стандартными операционными процедурами экспериментальных культивирований. Контроль штаммов из рабочей коллекции лиофилизированных культур бифидобактерий проводили микроскопированием. Окрашивание фиксированных микропрепаратов проводили метиленовым голубым.

Таблица 5 – Объем проведенных исследований *in vitro*

Название исследования	Количество проб, n	Количество исследований, n
Микроскопирование роста пяти видов бифидобактерий в среде Блаурокка с различными концентрациями рекомбинантного человеческого лактоферрина	15	42
Исследование аффинности двух видов бифидобактерий с биотинилированными лактоферрином и	6	18

альбумином		
Определение кинетики роста двух видов бифидобактерий в среде с лактоферрином и контрольной среде	6	18

2.4. Статистические методы, использованные в работе

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием пакета компьютерных программ «STATISTICA 6.0», «Microsoft Excel 2.0», «IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY: IBM Corp.». При использовании параметрической статистики вычислялись средняя арифметическая величина, средняя арифметическая ошибка, среднее квадратичное отклонение. Для выборок, не подчиняющихся нормальному распределению, в качестве описательной статистики использовались медиана и квартили. Для определения взаимосвязей между средними показателями исследуемых групп использовались параметрический и непараметрический методы (t-критерии Стьюдента и Манна-Уитни, соответственно), для оценки различий дискретных переменных – метод χ^2 , критерий Пирсона, точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$. При анализе связи между признаками использован метод корреляции (r) Пирсона. Сила связи считалась слабой при $r = 0-0,299$, средней при $r = 0,3- 0,699$, сильной при $r = 0,7-1,0$.

ГЛАВА 3. ЛАКТОФЕРРИН КАК ИНДУКТОР ИНДИГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В СТРУКТУРЕ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ДОНОШЕННЫХ И НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

3.1 Первый этап исследования: содержание лактоферрина в материнском молоке и фекалиях младенцев различного гестационного возраста во взаимосвязи с формированием протективных систем у детей в раннем постнатальном онтогенезе

Формирование кишечной микробиоты ребенка первых месяцев жизни – это многоэтапный процесс, в ходе которого образуется специфическая микробная экосистема [183,144]. На становление микробиоты и её индивидуальных характеристик влияют многие факторы окружающей среды. В свою очередь, особенности стартовой бактериальной колонизации кишечника оказывают не только urgentное, но и отсроченное влияние на формирование пищеварительного, метаболического и иммунного гомеостаза ребенка, а также и на другие функции организма, в том числе поведенческие характеристики [102]. Таким образом, ранний период жизни является «окном возможностей» для программирования здоровья посредством модуляции микробиоты [152]. Однако, реализация этой многообещающей стратегии требует глубокого понимания механизмов, регулирующих становление кишечной микробиоты, в том числе роли характера вскармливания и значимости биологически активных компонентов питания [29].

«Золотым стандартом» вскармливания как здоровых, так и больных младенцев является молоко матери. Некоторые компоненты грудного молока способны модулировать развивающуюся микробиоту в желудочно-кишечном тракте младенца, включая сложные олигосахариды, иммуноглобулины (IgA), лактоферрин, лизоцим и цитокины [49,132,146].

Лактоферрин – это основной сывороточный белок, присутствующий в грудном молоке, особенно велико его содержание в молозиве. Сообщалось о

многих биологических функциях Лф, включая антимикробную активность, иммуностимулирующие и иммуномодулирующие эффекты [103]. Несколько исследований *in vitro* показали, что Лф человека способен стимулировать рост бифидобактерий [188,132,220], однако этот эффект проявляется по-разному: лактоферрин стимулировал рост трех штаммов бифидобактерий (*B. breve*, *B. infantis* и *B. bifidum*) и не влияет на рост *B. longum* [118].

Учитывая представленные аргументы, оценка уровня лактоферрина в материнском молоке и фекалиях у новорожденных младенцев является важной для обоснования методов направленной нутритивной поддержки формирования здоровой кишечной микробиоты.

Цель исследования на первом этапе состояла в изучении в диадах мать – дитя показателей лактоферрина в материнском молоке и фекалиях младенцев во взаимосвязи с особенностями становления кишечной микробиоты доношенных и недоношенных детей в раннем постнатальном онтогенезе.

Проведено продольное наблюдательное неинтервенционное исследование в 42 диадах мать-дитя после своевременных родов и 15 диадах мать-дитя - после преждевременных. Все дети родились от одноплодной беременности.

Все пациенты, включенные в исследование, родились, получали при необходимости лечение и наблюдались после выписки в перинатальном центре ГБУЗ МО Мытищинская городская клиническая больница. Все дети и их родители были этническими славянами.

Критерии включения пациентов в исследование: доношенные (гестационный возраст 37-41 неделя) и недоношенные (гестационный возраст 28-36 недель) дети, родившиеся от одноплодной беременности, получающие исключительное или преимущественное грудное вскармливание и их кормящие матери.

Критерии исключения: беременность двойней, тяжелые хронические заболевания во время беременности, гестационный диабет, новорожденные с тяжёлыми коморбидными заболеваниями (инфекции и поражение ЦНС),

пораками развития, генетическими заболеваниями, а также отказ родителей от продолжения исследования.

Собирали и анализировали образцы кала у каждого ребенка и образцы материнского молока. (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Дизайн первого этапа исследования

3.1.1. Общая характеристика исследуемых групп детей и матерей

Гестационный возраст и антропометрические показатели детей, включенных в исследование, представлены в Таблице 6. Между двумя группами пациентов наблюдалась достоверная разница большинства этих показателей.

Медико-социальные характеристики обследованных матерей отражают распределение факторов риска в популяциях женщин, родивших в срок и преждевременно (Таблица 7).

Таблица 6 – Гестационный возраст, пол и показатели физического развития детей исследуемых групп при рождении (Ме, 25-й - 75-й перцентиль)

Показатели	Группа 1 n = 42	Группа 2 n = 15
Гестационный возраст, нед	39,0* [38,0;40,0]	33,2 [29,0;35,0]
Мужской пол, n(%)	9 (42)	8 (53)
Масса тела при рождении, г	3500* [3290,0; 3800,0]	1900 [1200,0; 2500]
Длина тела при рождении, см	52,0* [51,0; 54,0]	41,0 [35,0;45,0]
Окружность головы при рождении, см	35,0* [34,5; 36,0]	30,0 [28,5; 32,0]

* - различия статистически значимы со 2-ой группой, $p < 0,05$

Таблица 7 – Медико-социальная характеристика матерей исследуемых групп.

Показатели	Группа 1 n = 42	Группа 2 n = 15
Возраст матери	29,0 [28 - 33]	37,0 [22 - 39]
Возраст матери более 35 лет, n(%)	5 (11) *	8 (53,3)
Беременность, n (%):		
1-я	15 (36)	5 (33)
2-я	12 (29)	6 (40)
>2	18 (43)	4 (27)
Паритет, n (%):		

1 роды	20 (48)*	8 (53)
2 роды	19 (45)*	5 (33)
>2	3 (7)*	2 (13)
Никотиновая зависимость, n (%)	11(24)*	6 (40)
Высшее образование, n (%)	30 (67)*	7 (47)
Низкий уровень дохода семьи, n (%)	5 (11)*	3 (20)

* - различия статистически значимы со 2-ой группой, $p < 0,05$

Соматический и акушерско-гинекологический анамнез матерей и их исследуемых детей, а также особенности течения беременности и родов представлены в Таблицах 8-13.

В Таблице 8 представлена характеристика состояния здоровья матерей исследуемых групп.

Таблица 8 – Характеристика соматических заболеваний матерей в исследуемых группах

Показатели	Группа 1 n = 42	Группа 2 n = 15
Аллергические заболевания, n (%)	6 (14)	5 (33)
Миопия, n (%)	3 (7)	1 (7)
Гипертоническая болезнь, n (%)	4 (9)	6 (40)
Заболевания ЖКТ (гастрит, гастродуоденит, дискинезия желчевыводящих путей), n (%)	5(12)	4 (27)
Заболевания мочевыделительной системы (цистит, пиелонефрит), n (%)	4(9)	4 (27)
Хронический гепатитС, n (%)	1 (2)	0 (0)
Хронический тонзиллит, n (%)	2 (5)	3 (20)

Как следует из представленных в Таблице 8 данных отягощенность соматического анамнеза у матерей 2 группы, родивших недоношенных детей, была выше матерей, родивших своевременно.

В Таблице 9 представлены данные акушерско-гинекологического анамнеза матерей детей 1 и 2 группы.

Таблица 9 – Характеристика акушерско-гинекологического анамнеза матерей

Показатели	Группа 1 n = 42	Группа 2 n = 15
Наличие гинекологической патологии		
Эрозия шейки матки, n (%)	5 (12)	2 (13)
Цервицит, n (%)	4 (9)	4 (27)
Кольпит, n (%)	4 (9)	5 (33)
Абсцесс бартолиновой железы, n (%)	2 (5)	0 (0)
Аднексит, n (%)	1 (2)	3 (20)
Миома матки, n (%)	0 (0)	2 (13)
Бесплодие, n (%)	1 (2)	2 (13)
Уреаплазмоз, n (%)	4 (9)	3 (20)
Отягощенный акушерский анамнез		
Внематочные беременности, n (%)	0 (0)	1 (7)
Медицинские аборты, n (%)	5 (12)	5 (33)
Самопроизвольный выкидыш, n (%)	7 (12)	3 (20)
Аntenатальная гибель плода в анамнезе, n (%)	1 (2)	1 (7)
Неразвивающиеся беременности, n (%)	3 (7)	1 (7)

Установлено, что у матерей, родивших недоношенных детей, значительно чаще отмечались прегравидарные воспалительные заболевания, а также предшествующие аборт и выкидыши.

В Таблице 10 представлена характеристика течения настоящей беременности и родов матерей обеих исследуемых групп.

Таблица 10 – Характеристика течения настоящей беременности и родов у матерей исследуемых групп

Показатели	Группа 1 n = 42	Группа 2 n = 15
Патологическое течение беременности, n (%)		
ОРВИ:		
1 триместр	3 (7)	3 (20)
2 триместр	4 (9)	5 (33)
Угроза прерывания (в 1-2 триместрах)	6 (14)	7 (47)
Угроза преждевременных родов (в 3-м триместре)	4 (9)	5 (33)
Пиелонефрит	2 (5)	3 (20)
Кольпит	4 (9)	5 (33)
Ранний гестоз	3 (7)	4 (27)
Поздний гестоз	12 (29)	5 (33)
Хроническая внутриутробная гипоксия плода	19 (45)	10 (67)
Фетоплацентарная недостаточность	4 (9)	4 (27)
Анемия	16 (29)	6 (40)
Частичная отслойка предлежащей плаценты	0 (0)	1 (7)
Способ родоразрешения, n (%)		

Самопроизвольные вагинальные, n (%)	22 (52)	7 (47)
Продолжительность родов, n (%):	19 (86)	4 (27)
Нормальная	3 (14)	3 (20)
Быстрые		
Экстренное кесарево сечение, n (%)	5 (12)	3 (20)
Плановое кесарево сечение, n (%)	15 (36)	5 (33)
Использование антенатальных стероидов, n (%)	1 (2)	8 (53)

Как видно из представленных в Таблице данных, течение беременности было отягощено у большинства матерей 2 группы. Однако, обращает внимание, что частота планового оперативного родоразрешения была сходной в обеих группах.

В Таблице 11 представлено состояние детей обеих групп при рождении.

Таблица 11 – Оценка состояния обследованных детей при рождении и в первые сутки жизни

Группы детей	Оценка по шкале APGAR(баллы)			
		1-3	4-6	7-8
Группа 1 n = 42	через 1'	0 (0)	1 (2)	41 (98)
	через 5'	0 (0)	0 (0)	42 (100)
Группа 2 n = 15	через 1'	1 (7)	10 (67)	4 (26)
	через 5'	0 (0)	8 (53)	7 (47)

Как представлено в Таблице 11, у детей родившихся преждевременно, отмечены более низкие показатели по шкале APGAR, что свидетельствует о большей частоте и выраженности интранатальной гипоксии у этих пациентов. В Таблице 12 представлены данные о течении периода ранней постнатальной адаптации в сравниваемых группах детей.

Таблица 12 – Характеристика течения периода ранней постнатальной адаптации

Показатели	Группа 1 n = 42	Группа 2 n = 15
Время первого прикладывания к груди:		
- в род. блоке (первые 20 мин)	20 (48)	0 (0)
- в первые 24 час жизни	22 (52)	2 (13)
Максимальная потеря массы тела (%)	6,5 [4 - 8]	4,5 [3 - 6]
Восстановление массы при рождении (дни)	8,7 [7 - 11]	9,1 [8 - 13]
Вскармливание через зонд, n(%)	1 (2)	9 (60)
Самостоятельное сосание, n (%)	41 (98)	6 (40)
Эпителизация пупочной ранки (дни)	7,5 [6 - 10]	9,2 [8 - 14]
Длительность желтухи (дни)	10,2 [8 - 12]	15,8 [12 - 21]
Длительность выхаживания в инкубаторе (дни)	0 (0)	14,3 [12 - 24]

Обращает внимание замедленное восстановление первоначальной потери массы тела и более длительное течение неонатальной желтухи у детей 2 группы.

В Таблице 13 представлена структура перинатальной патологии у пациентов исследуемых групп.

Таблица 13 – Структура перинатальной патологии у недоношенных пациентов исследуемых групп

Показатели	Группа 1 n = 42	Группа 2 n = 15
Синдром дыхательных расстройств	0 (0)	9 (60)
Церебральная депрессия	1 (2)	10 (67)
Конъюгационная желтуха	5 (12)	14 (93)
Анемия	1 (2)	3 (20)
Малые аномалии развития сердца	5 (12)	4 (27)
Пиелюэктазия	1 (2)	1 (7)
Гемангиомы	4 (9)	2 (13)
Маловесный к сроку гестации	1 (2)	4 (27)
Выписан из родильного дома;		
На 2 сутки жизни	5 (12)	
На 3	27 (64)	
На 4	6 (14)	
На 6	2 (5)	
Переведен на второго этапа выхаживания	0 (0)	15 (100)

Как видно из таблицы 13, у недоношенных детей отмечалась характерная для этой популяции перинатальная патология (синдром

дыхательных расстройств, церебральная депрессия), поэтому все недоношенные пациенты нуждались в переводе на второй этап выхаживания.

Все дети находились в родильном доме или в стационаре второго этапа совместно с матерями и получали лечение согласно тяжести и характера имеющейся патологии. Матери недоношенных детей были особенно заинтересованы в сохранении и продолжении грудного вскармливания, поэтому даже при минимальном энтеральном (трофическом) питании ребенок получал грудное молоко через назогастральный зонд или соску.

У половины доношенных (по клиническим показаниям) и у всех недоношенных новорожденных оценивали показатели общего (клинического) анализа крови в первые 72 часа жизни.

3.1.2. Показатели содержания лактоферрина в молозиве и зрелом материнском молоке

Концентрации Лф в молозиве женщин, родивших недоношенных и доношенных детей, существенно не различались (Рисунок 2 и 3).

Уровень лактоферрина в материнском молоке к концу первого месяца лактации снизился как у родивших в срок, так и преждевременно родивших женщин. Так, средние концентрации лактоферрина в молозиве женщин первой группы составили $7,06 \pm 5,2$ мг/мл, в то время как в зрелом молоке $2,17 \pm 1,9$ мг/мл; соответствующие показатели у преждевременно родивших женщин – $7,6 \pm 3,6$ мг/мл и $2,09 \pm 1,01$ мг/мл (Рисунок 4). Достоверно значимое снижение концентрации Лф в конце первого месяца лактации установлено у матерей, родивших доношенных детей ($p = 0,05$); в группе матерей недоношенных пациентов этой закономерности выявлено не было.

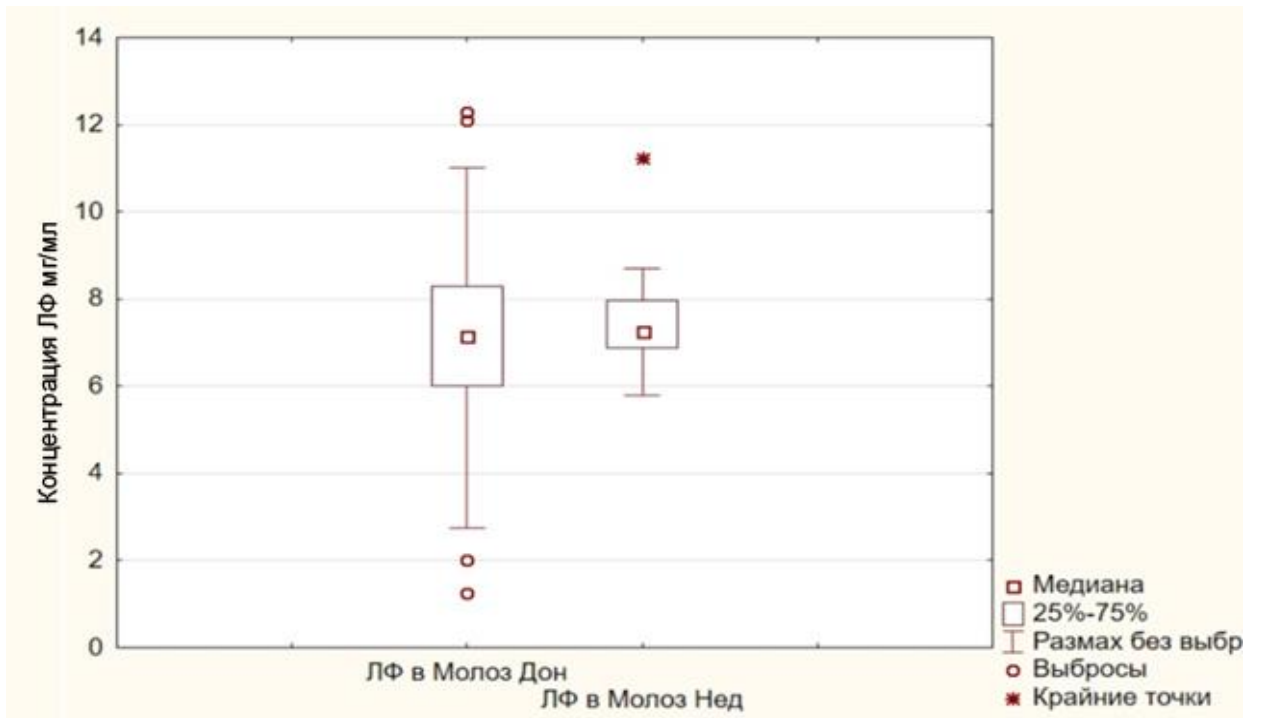


Рисунок 2 – Концентрации лактоферрина в молозиве женщин после срочных и преждевременных родов.

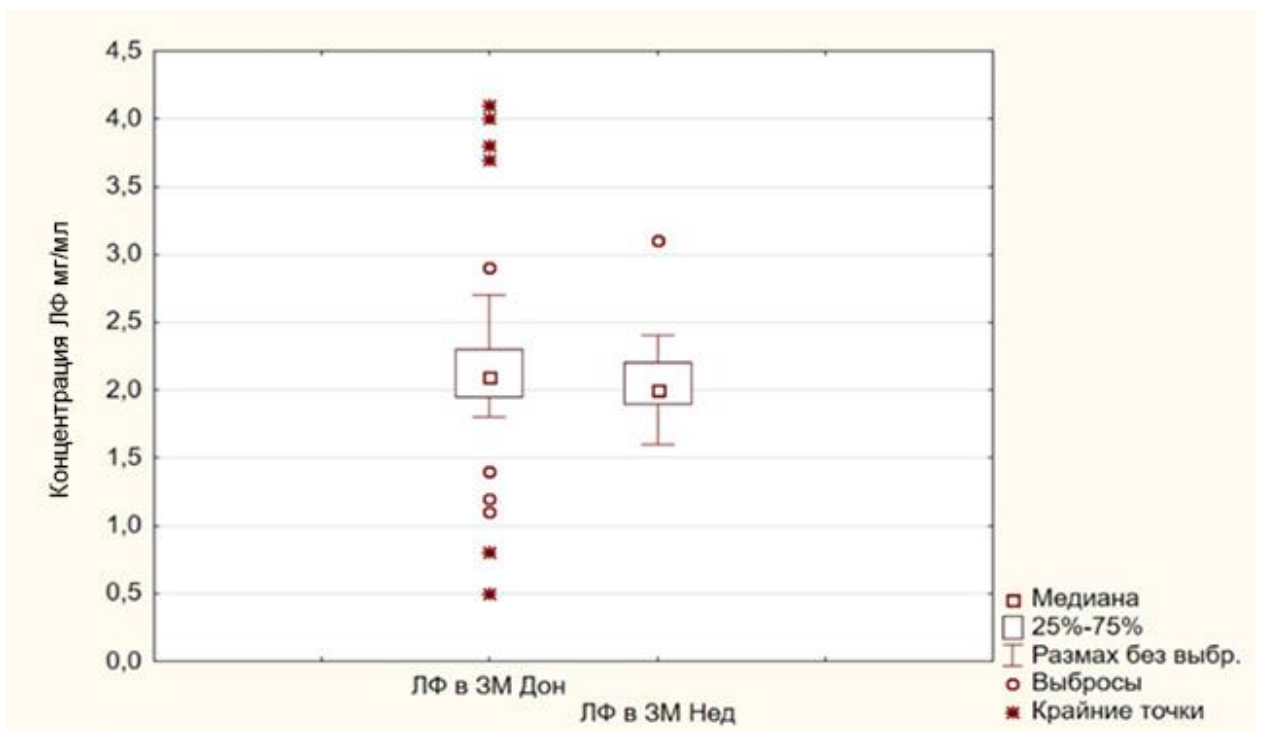


Рисунок 3 – Концентрации лактоферрина в зрелом молоке женщин после срочных и преждевременных родов.

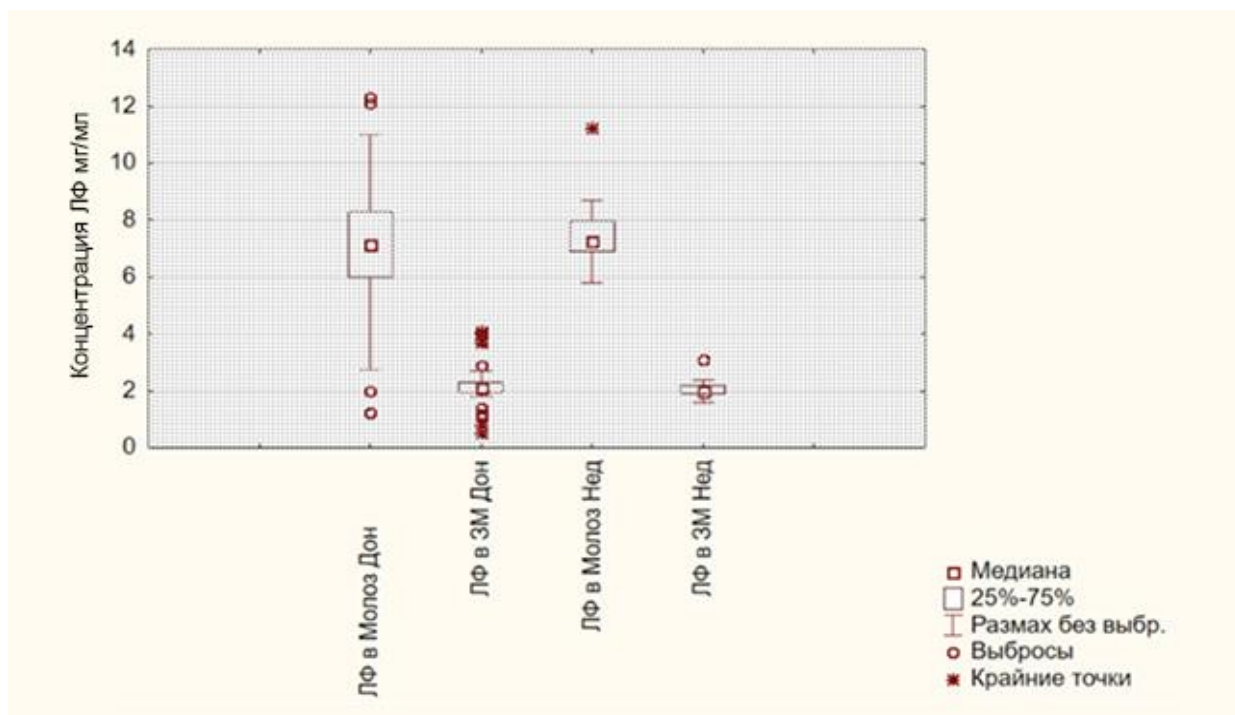


Рисунок 4 – Концентрации лактоферрина в молозиве и зрелом молоке женщин после срочных и преждевременных родов.

Линейная положительная корреляция между уровнями лактоферрина в молозиве и зрелом молоке была установлена только у женщин, родивших в срок ($R = 0,79$, $p = 0,008$) (Рисунок 5). У женщин, родивших преждевременно, такая корреляция не обнаружена, что вероятно, связано со значительно более отягощённым течением беременности у этих женщин, а также в связи с тем, что исследование молозива и зрелого молока у них проведено в различные сроки после последней менструации.

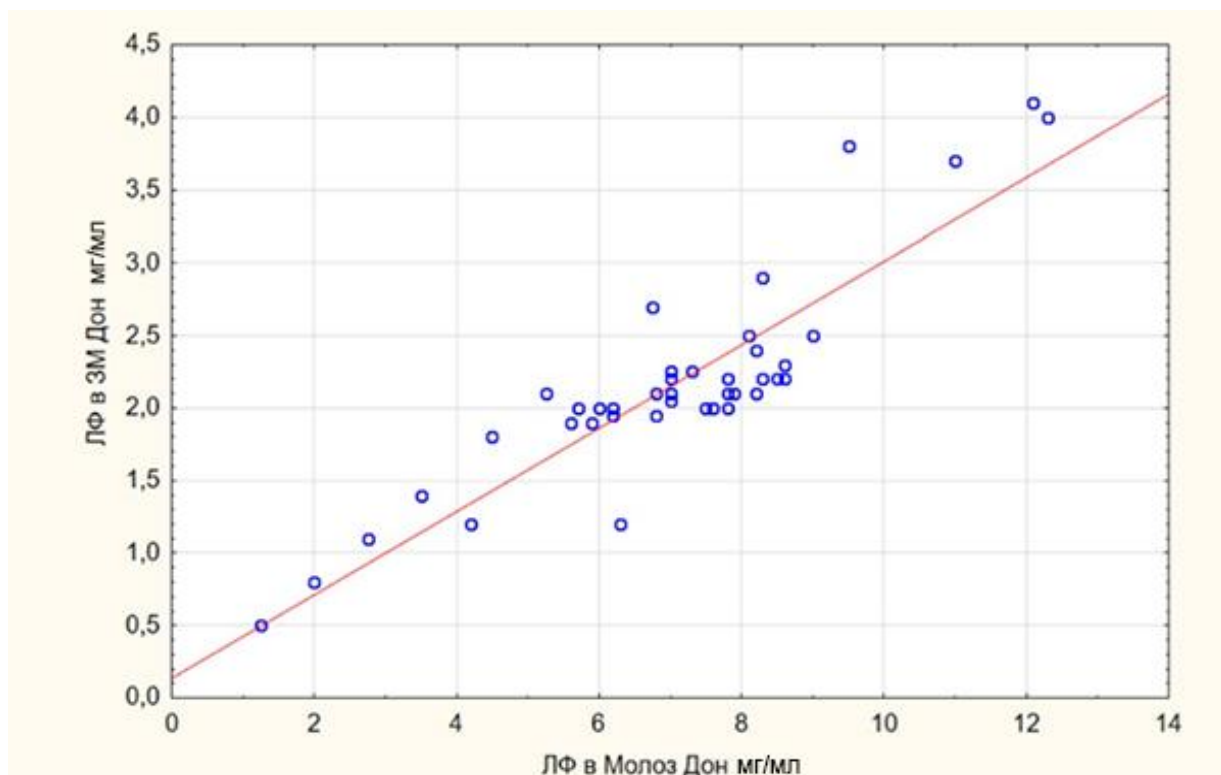


Рисунок 5 – Линейная положительная корреляция между концентрацией Лф в молозиве и зрелом молоке женщин после срочных родов ($R = 0,79$, $p = 0,008$)

3.1.3. Показатели содержания лактоферрина в фекалиях у доношенных и недоношенных новорожденных в раннем постнатальном онтогенезе

Концентрация Лф в фекалиях младенцев была высокой как у доношенных, так и у недоношенных детей. Однако, у недоношенных пациентов наблюдались более высокие концентрации Лф в меконии ($1848,5 \pm 1406,5$ мкг/мл) (Рисунок 6) и в фекалиях в 1 месяц после рождения ($5257,9 \pm 1798,6$ мкг/мл) (Рисунок 7) по сравнению с доношенными детьми, при этом уровень Лф в меконии у недоношенных новорожденных не имел статистически значимой корреляции с гестационным возрастом или причиной преждевременных родов.

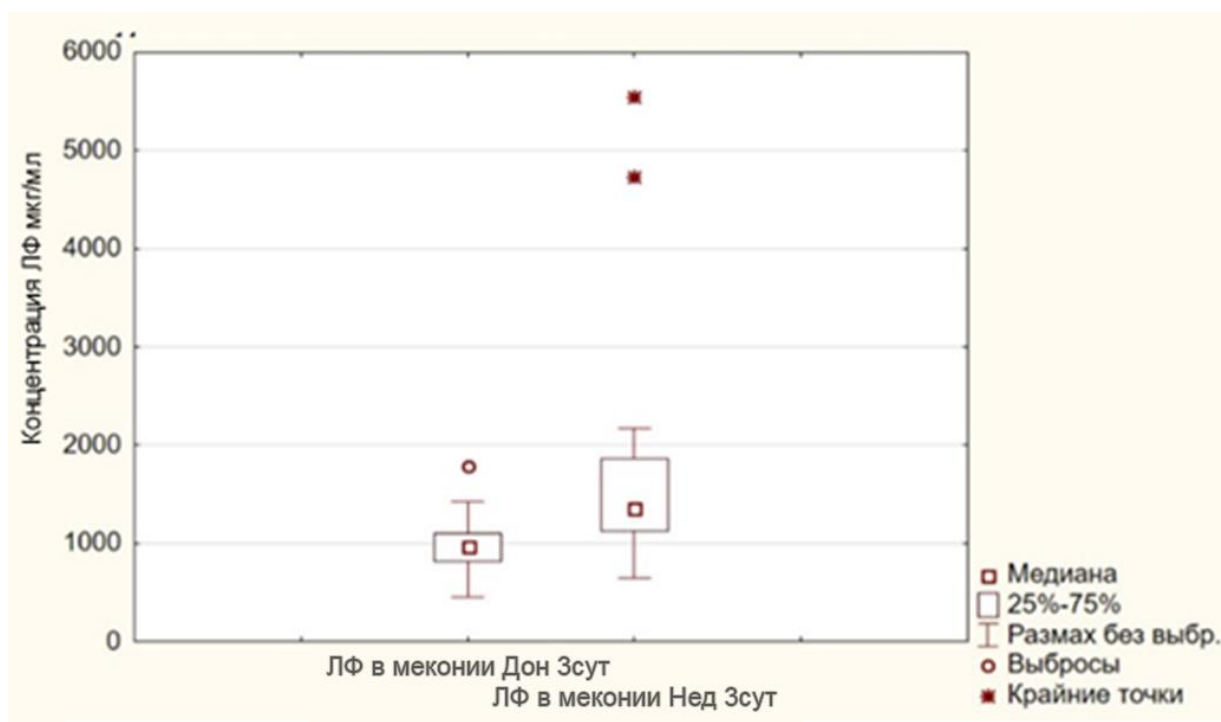


Рисунок 6 – Концентрация лактоферрина в меконии у доношенных и недоношенных детей.

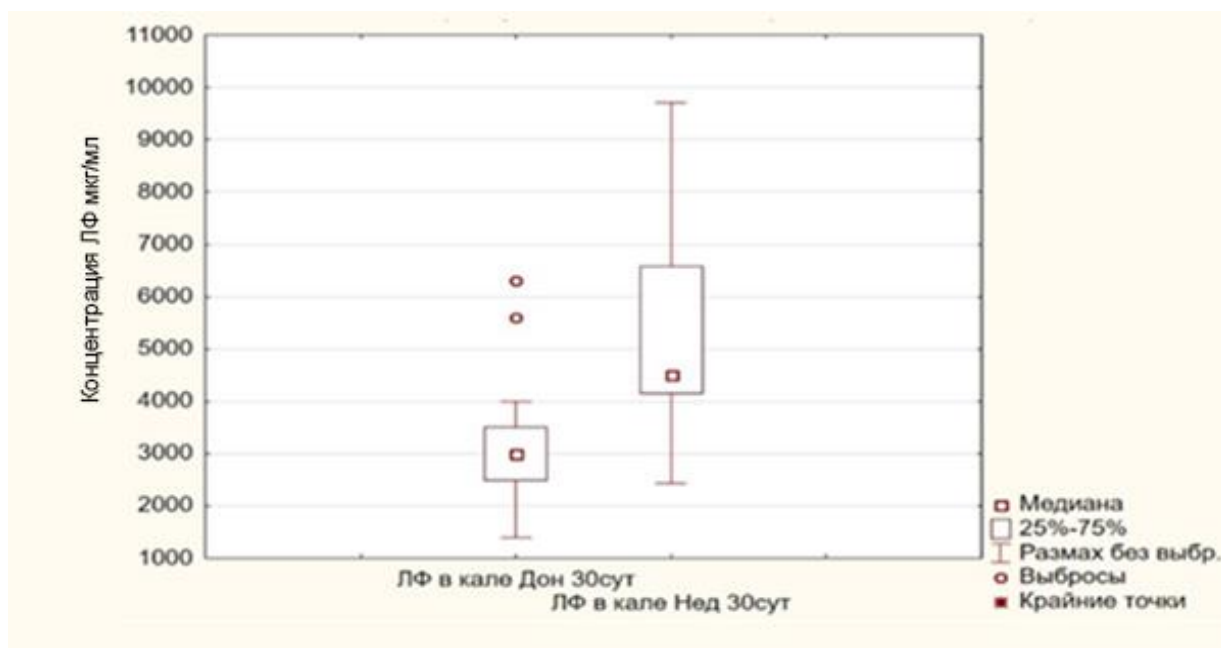


Рисунок 7 – Концентрация фекального лактоферрина в 1 месяц у доношенных и недоношенных детей.

Уровень фекального Лф у новорожденных повышался с рождения до 1-месячного возраста (Рисунок 8). Средние концентрации Лф были

значительно выше ($p = 0,001$) у доношенных детей в возрасте 1 месяца ($3040,9 \pm 886,2$ мкг/мл) по сравнению с 3-х-дневным возрастом ($977,7 \pm 262,3$ мкг/мл). Подобная динамика отмечена у недоношенных детей ($5257,9 \pm 1798,6$ мкг/мл в 1 месяц против $1848,5 \pm 1406,5$ мкг/мл в 3 дня).

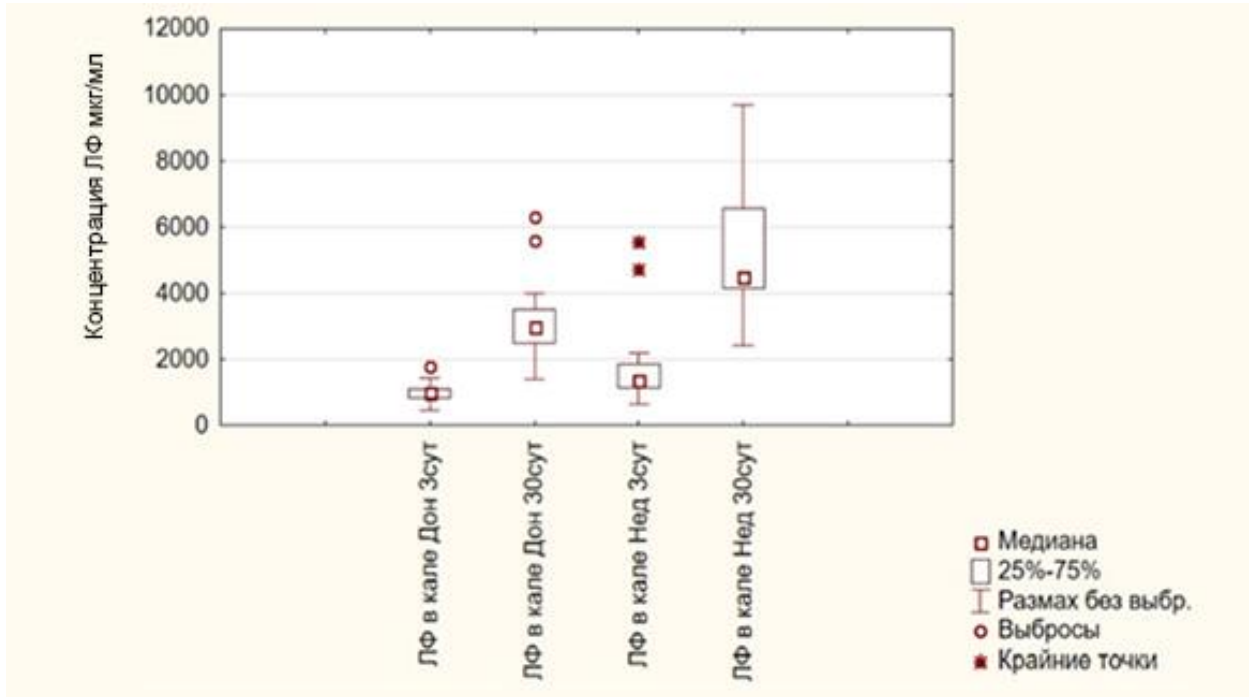


Рисунок 8 – Концентрация лактоферрина в фекалиях у доношенных и недоношенных детей на первом месяце жизни.

Важно отметить, что нарастание уровня Лф в фекалиях у детей (доношенных и недоношенных) на первом месяце жизни было противоположно динамике изменения содержания лактоферрина в грудном молоке их матерей на первом месяце лактации. В то же время, количество Лф в фекалиях у доношенных детей в 1 месяц было достоверно связано с концентрацией Лф в зрелом молоке матери ($R = 0,44$, $p = 0,030$, Рисунок 9).

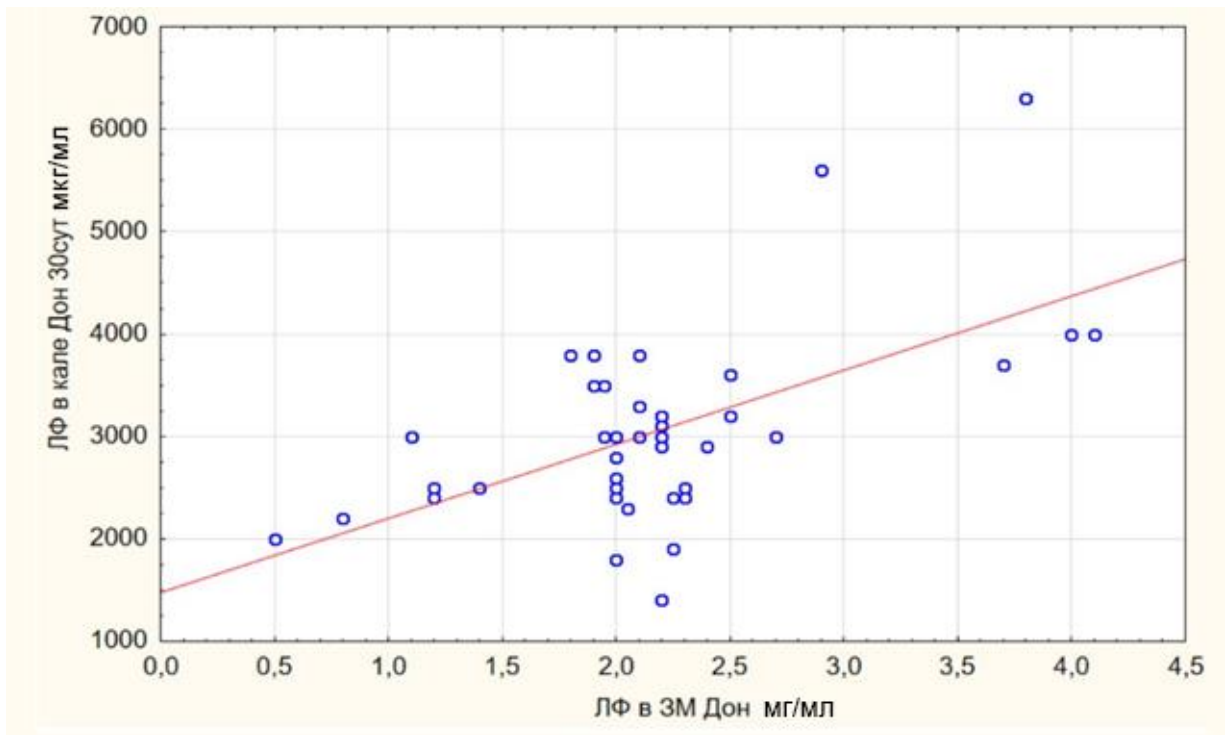


Рисунок 9 – Линейная положительная корреляция между фекальным Лф у доношенных детей в возрасте 1 месяца и концентрацией Лф в зрелом молоке их матерей ($R = 0,44$, $p = 0,030$)

3.1.4. Корреляция уровней лактоферрина в биологических субстратах и содержание индигенных микроорганизмов в составе кишечной микробиоты доношенных и недоношенных детей

Исследовано содержание в фекальной микробиоте наблюдаемых детей уровней индигенных микроорганизмов (на примере *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp).

Результаты исследования показали, что количество лактобацилл и бифидобактерий в фекалиях у доношенных и недоношенных с рождения до достижения первого месяца жизни существенно увеличилось (Рисунок 10).

Уровни бифидобактерий в фекалиях при рождении и в возрасте 1 месяца доношенных новорожденных (в среднем $3,9 \pm 2,5 \times 10^7$ и $7,8 \pm 1,7 \times 10^8$ КОЕ/г соответственно) значимо не отличались по сравнению с соответствующими данными недоношенных новорожденных (в среднем $4,1 \pm 1,5 \times 10^6$ и $6,2 \pm 2,2 \times 10^7$ КОЕ/г соответственно).

В то же время количество лактобацилл в фекалиях у недоношенных детей в возрасте одного месяца (в среднем $2,8 \pm 2,9 \times 10^5$ КОЕ/г) было значительно ниже по сравнению со значениями у доношенных детей (в среднем $5,2 \pm 2,4 \times 10^6$ КОЕ/г) ($p = 0,041$).

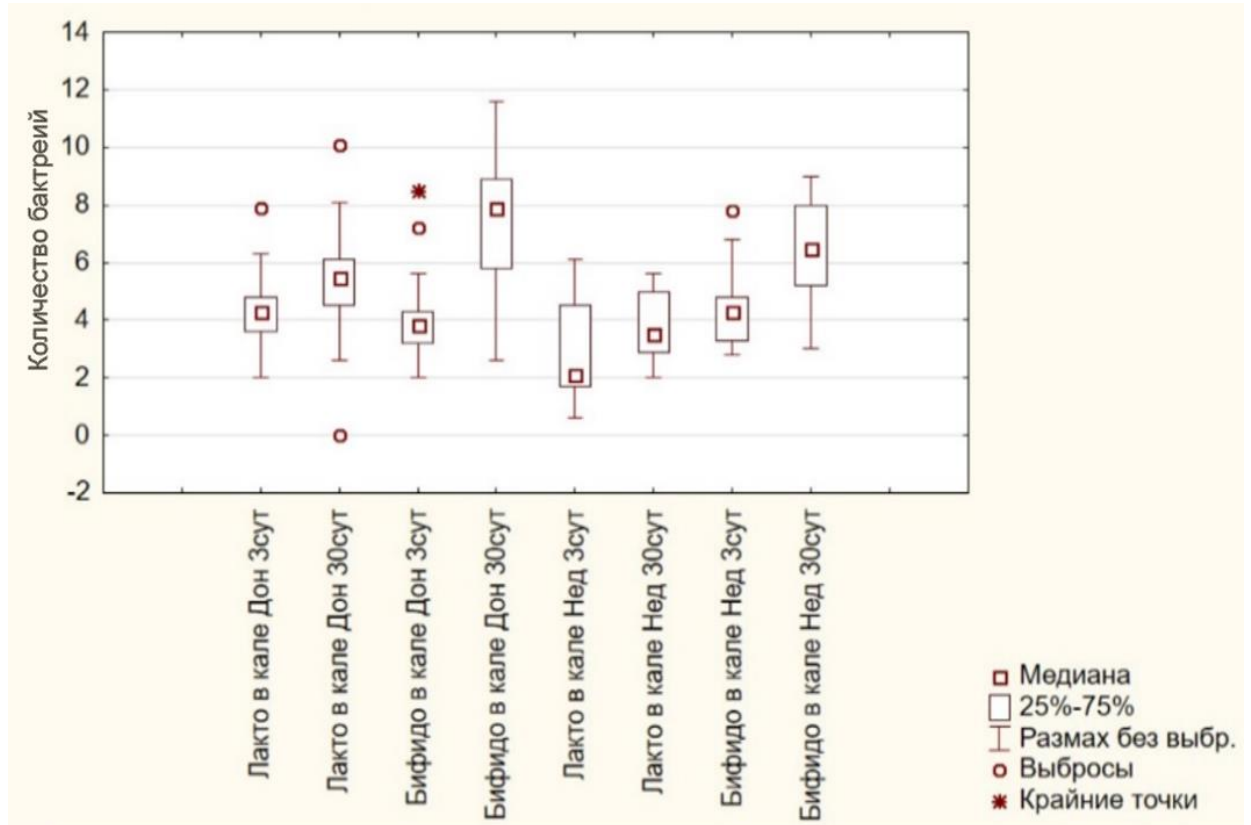


Рисунок 10 – Концентрация лактобактерий и бифидобактерий в кале у доношенных и недоношенных детей.

Выявлены положительные корреляции уровней лактобацилл и бифидобактерий в кале с концентрацией фекального Лф на 3-е сутки жизни у недоношенных детей ($R = 0,62$, $p = 0,02$ и $R = 0,68$, $p = 0,015$ соответственно) (Рисунок 11 и 12).

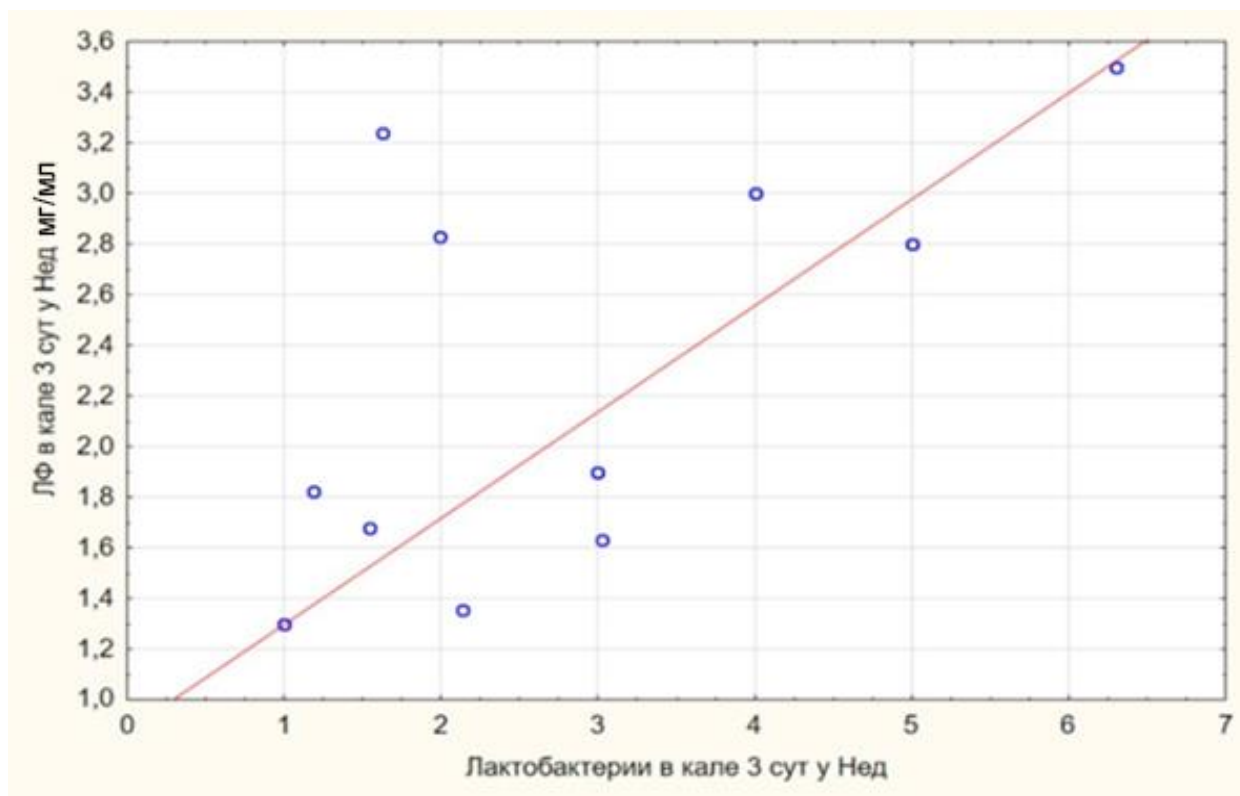


Рисунок 11 – Линейная положительная корреляция между концентрацией фекального лактоферрина и уровнем лактобацилл в меконии при рождении у недоношенных детей.

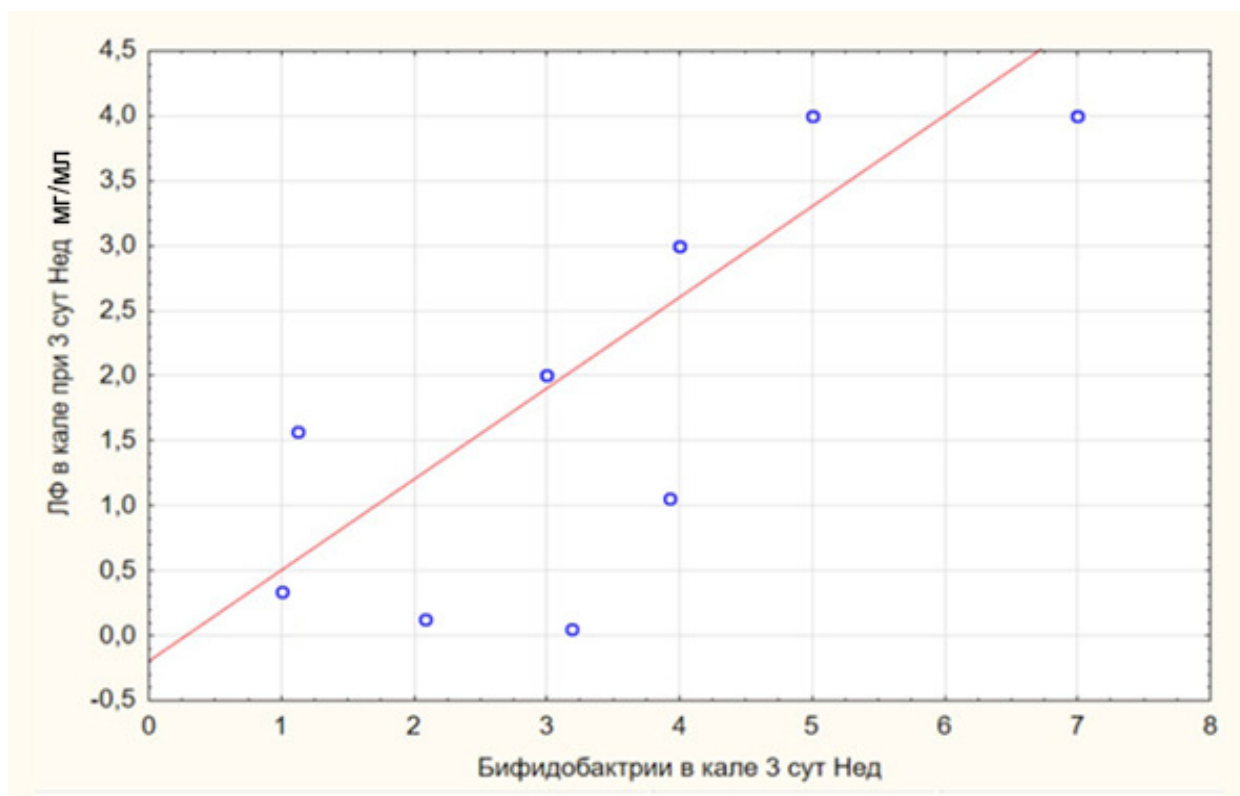


Рисунок 12 – Линейная положительная корреляция между концентрацией фекального лактоферрина и уровнем бифидобактерий в кале при рождении у недоношенных детей.

Обнаружена линейная положительная корреляция между уровнями лактобацилл и бифидобактерий в фекалиях недоношенных детей на 3-е сутки жизни ($R = 0,78$, $p = 0,03$) (Рисунок 13).

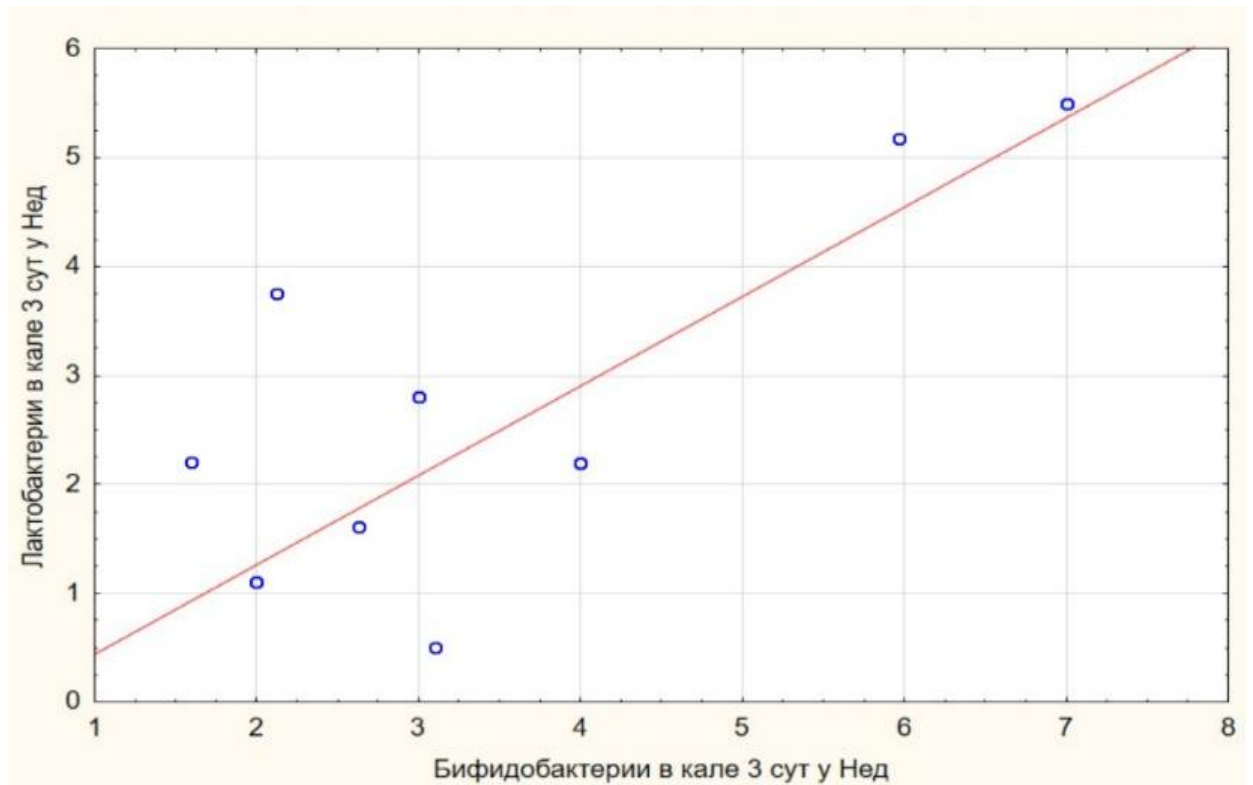


Рисунок 13 – Линейная положительная корреляция между уровнями лактобацилл и бифидобактерий в фекалиях недоношенных детей на 3-е сутки жизни.

3.1.5 Корреляционные взаимосвязи уровней фекального лактоферрина с количеством лейкоцитов и моноцитов в периферической крови в раннем периоде постнатальной адаптации

У 21 (50%) доношенного ребенка по клиническим показаниям (преимущественно отягощенный анамнез матери) на 2-3 сутки жизни был выполнен общий анализ крови. У всех детей эти показатели соответствовали

возрастным нормативам, что подтверждает физиологическое течение адаптационного периода (Таблица 14).

Таблица 14 – Показатели периферической крови у доношенных новорожденных в возрасте 3 суток жизни

Показатели	Количественная оценка, n = 21
Эритроциты, $10^{12}/л$	5,7 [5,5 - 5,93]
Гемоглобин, г/л	200,5 [198,0 - 204,0]
Средний объем эритроцита (MCV), фл	101,0 [99,0 - 102,5]
Лейкоциты, $10^9/л$	13,6 [12,0 – 18,85]
Гранулоциты, $10^9/л$	10,3 [8,15 - 13,15]
Моноциты, $10^9/л$	2,2 [1,7 - 3,1]
Лимфоциты, $10^9/л$	4,4 [3,95 - 4,95]
Тромбоциты, $10^9/л$	257 [157,5 – 270,5]

Нами обнаружены корреляционные взаимосвязи уровней фекального лактоферрина с количеством лейкоцитов и моноцитов в периферической крови (Рисунок 14).

Как установлено в последние годы, многие клетки имеют рецепторы к лактоферрину; вероятно в отношении этих клеток Лф обладает мягким модулирующим действием, что способствует профилактике перинатальных инфекций.

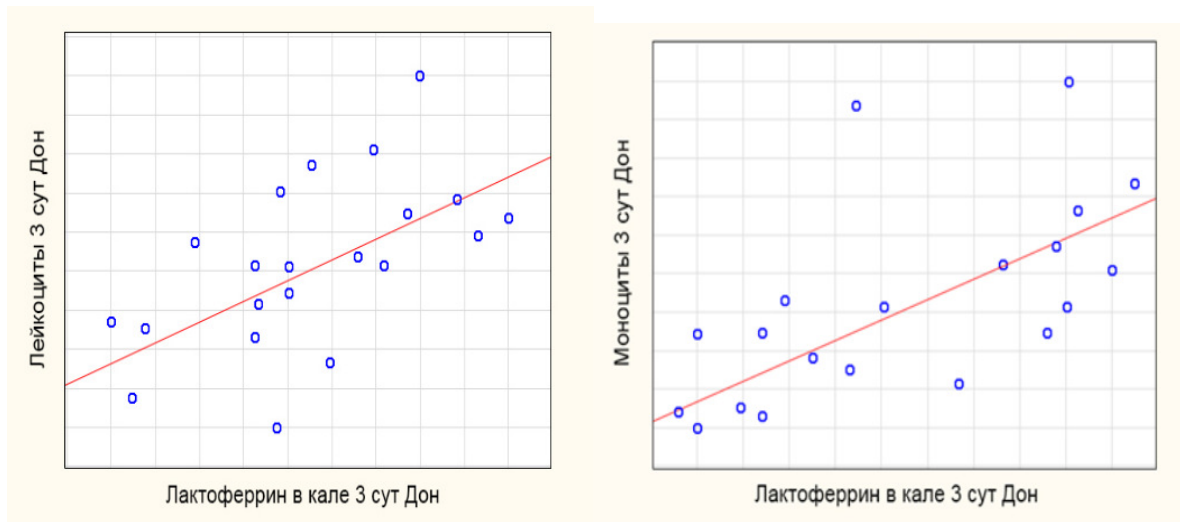


Рисунок 14 - Линейная положительная корреляция между количеством лейкоцитов и моноцитов в периферической крови и уровнем лактоферрина в меконии.

Таким образом, по результатам выполнения 1-го этапа работы можно сделать следующее заключение: в динамике лактации концентрация лактоферрина в грудном молоке женщин – как родивших в срок, так и преждевременно – снижалась, что отражает общие физиологические этапы секреции биологически активных веществ в грудное молоко. В то же время у женщин, родивших в срок, уровень лактоферрина к концу первого месяца лактации еще сохраняет достоверную связь со стартовым уровнем, что обеспечивает защиту ребенка в наиболее уязвимый период постнатальной адаптации. Отсутствие подобной корреляции у женщин, родивших преждевременно, может быть объяснено значительным разнообразием факторов становления лактации, в том числе разными сроками родов и особенностями течения беременности, влияющими на состав биологически активных субстратов грудного молока. В то же время уровень лактоферрина в фекалиях младенцев, как рожденных в срок, так и преждевременно, в течение первого месяца жизни возрастал с одной стороны в связи с тем, что объемы получаемого детьми молока прогрессивно увеличиваются – и у доношенных, и, особенно, у недоношенных детей. С другой стороны, более высокий выброс лактоферрина у недоношенных детей может быть объяснен

их физиологической незрелостью (в том числе незрелостью ферментных систем, участвующих в переваривании белков), а также особенностями их кишечной микробиоты (относительная «бедность» в отношении микроорганизмов, использующих лактоферрин в своем жизненном цикле). Уровни бифидо – и лактобактерий в микробиоте доношенных и недоношенных младенцев к концу первого месяца жизни увеличивались, при этом уровни бифидобактерий в обеих группах были сходными, а уровни лактобацилл у недоношенных были снижены. Нами были выявлены положительные корреляции уровней лактобацилл и бифидобактерий в кале с концентрацией лактоферрина в меконии у недоношенных детей. Таким образом, именно у недоношенных детей в периоде ранней постнатальной адаптации от уровня лактоферрина в некоторой степени зависят стартовые особенности формирования микробиоты, однако к концу первого месяца жизни у детей, родившихся преждевременно, такая зависимость не обнаружена. Взаимосвязи содержания лактоферрина в фекалиях с показателями периферической крови, вероятно, отражают его роль в профилактике перинатальных инфекций, которая требует дальнейшего изучения. Обнаруженные нами взаимосвязи свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения роли лактоферрина в формировании кишечной микробиоты и иммунной системы организма.

3.2 Второй этап исследования: оценка бифидогенного эффекта аналога человеческого лактоферрина в эксперименте *in vitro*

Целью настоящего исследования явилось изучение бифидогенных свойств биотехнологического аналога лактоферрина человека.

Инкубирование колоний бифидобактерий в присутствии лактоферрина показало, что различные виды бифидобактерий по-разному реагируют на присутствие рчЛф в среде (Рисунок 15). Так, для *B. longum* присутствие рчЛф в среде оказывало дозозависимое ингибирующее действие; определяемый титр для *B. breve* и *B. adolescentis* не зависел от присутствия

рчЛф (см. Рисунок 15). Вместе с тем особенно интересными оказались результаты, полученные с бифидобактериями *B. bifidum* и *B. infantis*. Титр, определяемый для данных видов бактерий, достоверно различался в зависимости от концентрации рчЛф в среде (Рисунок 15).

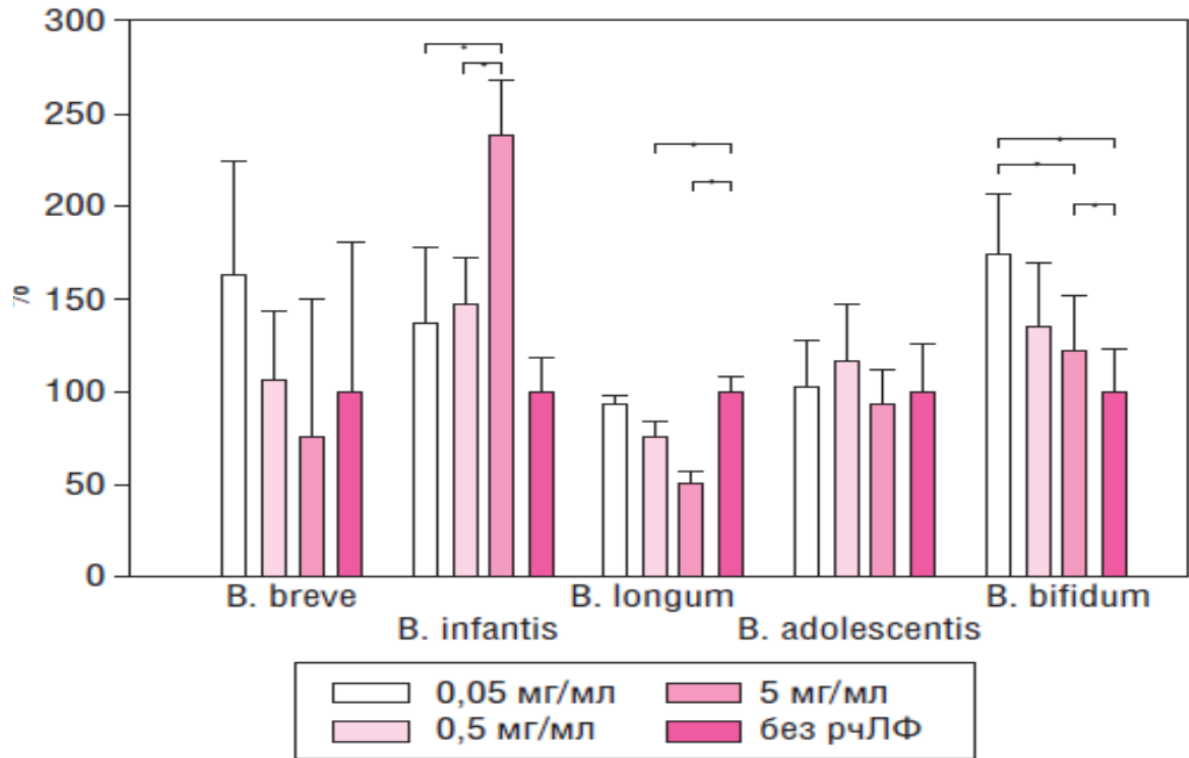


Рисунок 15 – Влияние различных концентраций рчЛф (0,05–5 мг/мл) на рост бифидобактерий.

Для *B. infantis* титр КОЕ увеличивался значимо при концентрации 5 мг/мл рчЛф в среде. В случае *B. bifidum* определяемая зависимость имела обратный характер, и с увеличением концентрации рчЛф титр КОЕ падал, тогда как малые концентрации рчЛф в среде демонстрировали выраженную стимулирующую активность. При изучении аффинности обнаружено, что связывание биотинилированного рчЛф с клетками *B. bifidum* во много раз превышает связывание с *B. infantis*, тогда как связывание с биотинилированным бычьим сывороточным альбумином (bBSA), использованным в качестве контроля, не отличалось между двумя видами бифидобактерий (Рисунок 16).

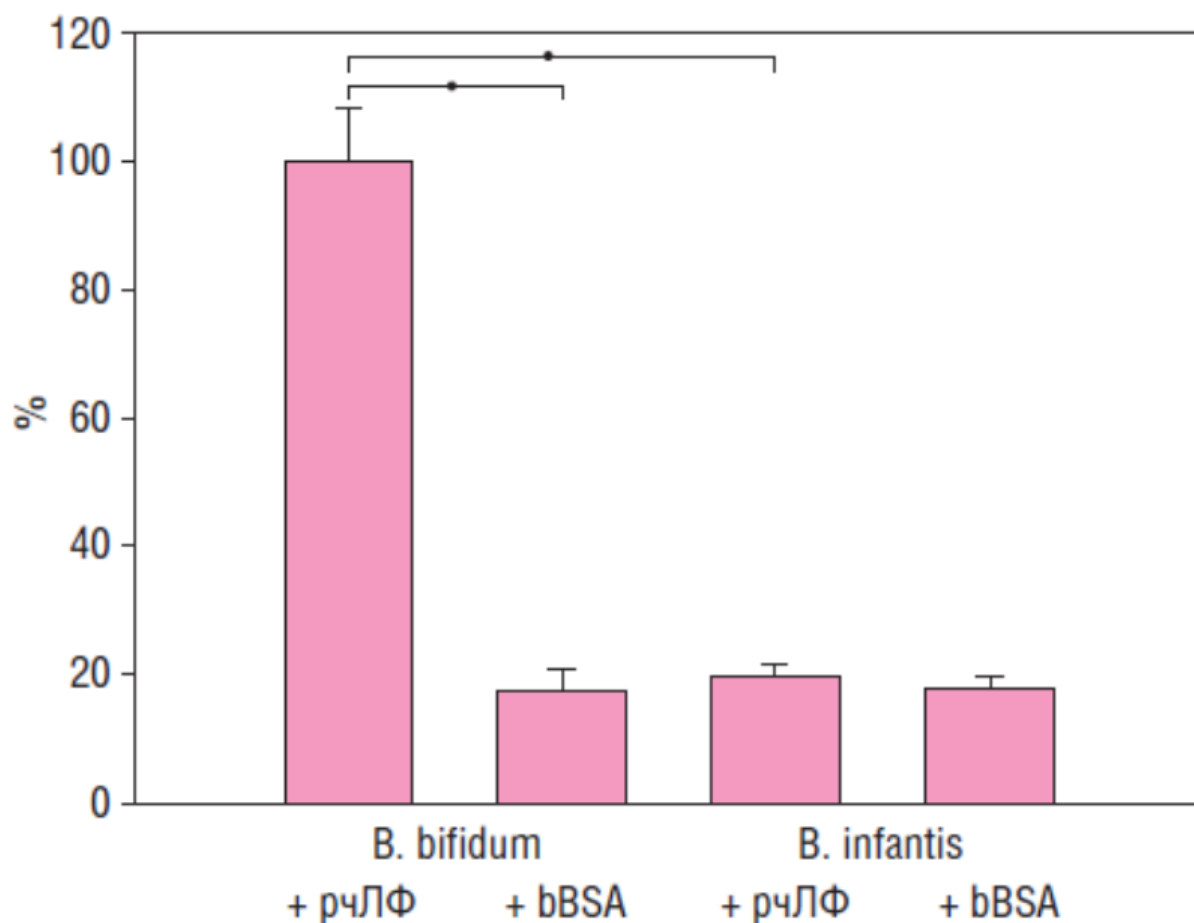


Рисунок 16 – Связывание рчЛф с клетками бифидобактерий *B. bifidum* и *B. infantis*.

Для проверки предположения о влиянии связывания рчЛф на рост бифидобактерий исследована кинетика роста *B. bifidum* и *B. infantis* в среде с рчЛф по сравнению с контрольной средой, где этот белок отсутствовал (Рисунок 17).

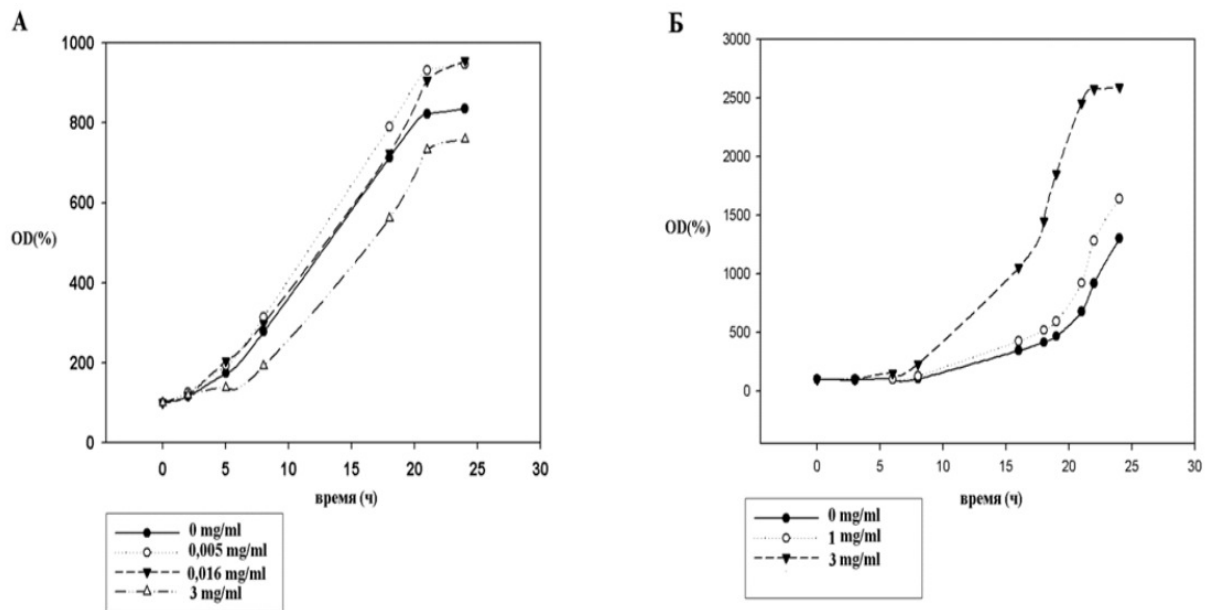


Рисунок 17 – Кинетика роста *V. bifidum* (А) и *V. infantis* (Б) в присутствии различных концентраций рчЛф.

Как показано на Рисунке 17 при изучении роста бактерии *V. infantis* лишь большие концентрации белка (3 мг/мл) позволяли добиться увеличения скорости роста. Для *V. bifidum* была характерна совершенно иная динамика: большие концентрации биотехнологического рчЛф не оказывали стимулирующего эффекта (см. Рисунок 16), тогда как при малых концентрациях оптическая плотность культуры превышала контрольное значение, достигая максимального показателя при концентрации биотехнологического рчЛф 0,016 мг/мл.

Таким образом, на втором этапе работы нами было показано, что различные концентрации (0,005– 5 мг/мл) биотехнологического аналога лактоферрина человека могут оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее действие в отношении роста бифидобактерий, что обусловлено аффинностью связывания с ними лактоферрина. Особенно чувствительными к концентрации лактоферрина в среде оказались *V. longum*, *V. infantis* и *V. bifidum*, для двух последних определили оптимальную концентрацию лактоферрина, а штаммы *V. adolescentis* и *V. breve* оказались малочувствительными к исследуемым концентрациям лактоферрина. Это

подтверждает данные о разнонаправленных пребиотических свойствах лактоферрина.

Биотехнологический аналог лактоферрина человека эффективно связывается с клеточной стенкой бифидобактерий *B. bifidum*, тогда как связывание с клетками *B. infantis* быстро достигает своего насыщения, что показывает видоспецифическое действие данного белка. Большая аффинность связывания рчЛф с клетками *B. bifidum*, вероятно, объясняет тот факт, что лишь малые концентрации рчЛф оказывают стимулирующее действие, тогда как избыток белка может не оказывать стимулирующего эффекта на рост данного штамма бактерии. Падение концентрации лактоферрина наблюдалось при определении методом иммуноферментного анализа в присутствии бифидобактерий вида *B. breve*, где она снизилась примерно наполовину.

Представленное исследование *in vitro* показало, что биотехнологический аналог лактоферрина человека обладает прямым пребиотическим действием, которое, возможно, в дальнейшем будет использовано у детей с нарушениями формирования микробиоты.

Одним из контингентов младенцев, у которых с нарушением микробиоты связаны хронические расстройства здоровья, являются дети с пищевой аллергией, в связи с чем, на III и IV этапах исследования были изучены особенности становления микробиоты у этих пациентов.

ГЛАВА 4. ФОРМИРОВАНИЕ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ВО ВЗАИМОСВЯЗИ С ОСОБЕННОСТЯМИ ВСКАРМЛИВАНИЯ У ДЕТЕЙ С НАЧАЛЬНЫМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ АЛЛЕРГИИ

4.1 Третий этап исследования: особенности формирования кишечной микробиоты у детей 2-3 месяцев жизни с начальными проявлениями аллергии

В главе 3 проведен анализ взаимосвязей уровней содержания лактоферрина в грудном молоке на разных стадиях лактации и выделения этого субстрата с фекалиями младенца, а также изучили корреляции между обеспеченностью ребенка лактоферрином и содержанием индигенных бактерий в формирующейся кишечной микробиоте. Как следует из наших данных и сведений литературы, лактоферрин грудного молока может быть одним из значимых компонентов, обеспечивающих индукцию индигенных микробов, что особенно важно для детей раннего возраста с дисбиотическими нарушениями, ассоциированными с аллергическими заболеваниями.

В связи с этим особую актуальность приобретает изучение особенностей кишечной микробиоты у детей с ранними проявлениями аллергии и поиски принципиально новых подходов к профилактике атопических заболеваний, в том числе с использованием естественных протективных свойств лактоферрина, что послужило основанием для выполнения следующего этапа исследования.

Цель третьего этапа исследования – изучить особенности кишечной микробиоты у детей 2-3 месяцев жизни с начальными проявлениями аллергии в зависимости от характера вскармливания и профиля сенсibilизации.

Проведено проспективное когортное исследование 50 детей в возрасте 2-3-х месяцев с начальными проявлениями аллергии с изучением у них состава кишечной микробиоты и определением профиля сенсibilизации; 35 детей из этих пациентов наблюдались и повторно обследовались в возрасте 6-8 месяцев (окончание онтогенетического этапа первых 500 дней). Возрастной диапазон повторного обследования пациентов был связан с различиями во времени введения стартовых блюд прикорма в наблюдаемой когорте детей (Рисунок 18).

Обследование было осуществлено в Консультативно–диагностическом центре для детей НИИ педиатрии и охраны здоровья детей ЦКБ РАН (главный врач – к.м.н. Е.В. Кайтукова).

Критериями включения в исследование являлись:

- Младенцы первых трех месяцев жизни, родившиеся доношенными и имеющие отягощенный аллергологический анамнез и /или кожные и кожно-гастроинтестинальные симптомы аллергии;
- Наличие информированного согласия родителей на включение в исследование.

Критерии исключения из исследования:

- Рождение от многоплодной беременности
- Наличие у ребенка тяжелой коморбидной патологии (врожденные пороки развития, наследственные обменные нарушения, органическое поражение ЦНС);
- Дети, старше трех месяцев жизни на момент включения в группу исследования;
- Отсутствие информированного согласия родителей.

У всех детей проводилась оценка анамнестических факторов риска формирования аллергии, включая наследственную отягощенность, пищевые предпочтения матерей и характер вскармливания ребенка. Для полного сбора анамнестических данных была проведена выкопировка данных из медицинской документации (карта беременной и родильницы, история

родов, история развития новорожденного, амбулаторная карта ребенка, история болезни ребенка). Был составлен индивидуальный план ведения, по показаниям – проведены консультации узких специалистов.

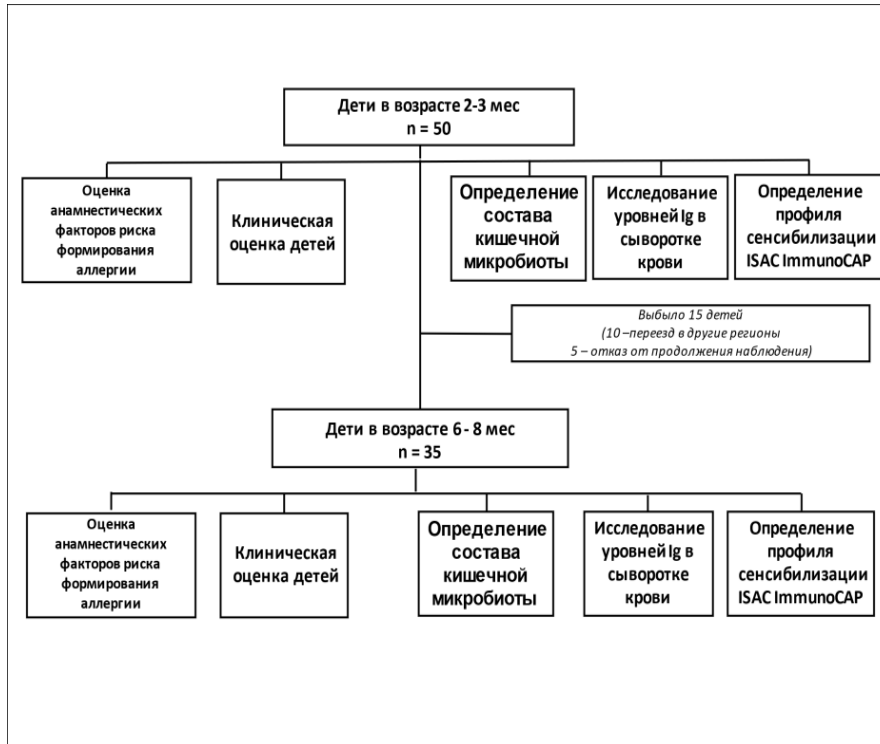


Рисунок 18 – Дизайн III и IV этапов исследования

Клиническая оценка детей включала данные физикального осмотра, лабораторных и инструментальных исследований. Всем детям было выполнено исследование кишечной микробиоты бактериологическим методом; проведено исследование иммуноглобулинов сыворотки и профиля сенсibilизации методом ISAC ImmunoCAP.

После выявления факторов сенсibilизации у детей первых трех месяцев жизни, матерям были даны рекомендации по соблюдению элиминационной диеты, проведена коррекция диеты у пациентов, получающим смешанное или искусственное вскармливание, при необходимости назначена симптоматическая терапия.

В ходе дальнейшего наблюдения 15 пациентов выбыли из исследования по объективным причинам: 10 детей в связи с переездом в другие регионы,

родители 5 детей отказались от дальнейшего наблюдения по семейным обстоятельствам.

35 пациентов продолжили наблюдение и были обследованы в возрасте 6-8 месяцев с применением вышеперечисленных методов.

Средний постнатальный возраст детей на момент включения в исследование составил 2,0 [1,0–3,0] месяца, средний постконцептуальный возраст – 48 [42-52] недель.

Гестационный возраст детей составил 39,5 [38,0 – 40,0] недели, масса тела при рождении 3515,1 [3100,0 – 3750,0] г, длина тела 52,0 [50,0 – 53,0] см.

Все дети родились в удовлетворительном состоянии с оценкой по шкале APGAR на 1 мин 8,0 [7,0 – 8,0] баллов, на 5 мин 9,0 [8,0 – 9,0] баллов и большинство – 29 (58%) были приложены к груди матери в родильном зале. Однако у 12 (24%) детей состояние после рождения ухудшилось, что потребовало проведения интенсивной терапии в родильном зале и дальнейшего перевода детей в ОРИТН, где 9 (18%) пациентам были назначены антибактериальные препараты. Эти дети были приложены к груди матери или получили сцеженное материнское молоко только по окончании 1-х или 2-х суток жизни (Таблица 15), что снижало их стартовую обеспеченность протективными субстанциями грудного молока, в том числе лактоферрином.

Таблица 15 – Особенности раннего неонатального периода пациентов, включенных в исследование

Показатели	Количество детей (n)	Количество детей (%)
Лечение в ОРИТН	12	24
Антибактериальная терапия после рождения	9	18
Приложены к груди в родильном зале	29	58
Приложены к груди в 24 - 48 час	12	24

Приложены к груди > 48 час	8	16
Не приложен к груди	1	2

Возраст матерей, родивших детей, включенных в исследование, составил 30,1 [28,0 – 34,0] лет. Роды через естественные пути (*per vias naturales*) произошли только у половины женщин. Обращает внимание частое применение оперативного родоразрешения в исследуемой когорте; кесарево сечение проведено 23 (46%) женщинам, из них 7 (14%) – по экстренным показаниям.

Лихорадка у женщины перед родами / в родах, длительный безводный промежуток стали основанием для назначения антибактериальной терапии 5 (10%) матерям (Таблица 16).

Таблица 16 – Особенности течения родов у женщин, включенных в исследование

Показатели	Количество матерей (n)	Количество матерей (%)
Естественные роды	27	54
Антибактериальная терапия в пред -/ родовом периоде	5	10
Кесарево сечение	23	46
Экстренное кесарево сечение	7	14

Оценка семейного аллергологического анамнеза проводилась среди родственников первой линии родства: матери, отца, сибсов.

В Таблице 17 представлены выявленные пищевые, растительные и животные антигенные триггеры, являющиеся причиной аллергических заболеваний у родственников обследуемых пациентов. К аллергическим болезням были отнесены: атопический дерматит, аллергический ринит, аллергический конъюнктивит, бронхиальная астма.

Таблица 17 – Семейный аллергологический анамнез в исследуемой группе пациентов

№ п/порядку	Родственники 1 линии родства	Аллергическое заболевание	Причинно-значимые аллергены
1	Мать	Аллергический ринит	Шерсть кошки
2	Брат	Гастроинтестинальная аллергия	Глютен
3	Мать	Аллергический ринит в детстве	Не известно
4	Мать	Поллиноз, крапивница, Лекарственная аллергия Анафилаксия	Семейство сложноцветные- ромашка, подсолнечник; тимофеевка, ежа, полынь, райграсс, костер, пух, перо, домашняя пыль. Мочегонные препараты Креветки
	Отец	Бронхиальная астма	Травы
5	Мать	Пищевая аллергия	Не известно
	Отец	Пищевая аллергия в детстве	Цитрусовые
6	Мать	Поллиноз	Не известно
	Отец	Аллергический ринит	Не известно
7	Мать	Пищевая аллергия	Не известно
	Отец	Поллиноз	Не известно
	Сестра	Пищевая аллергия	Не известно
8	Мать	Пищевая аллергия	Не известно

	Отец	Поллиноз	Не известно
	Сестра	Пищевая аллергия	Не известно
9	мать	Поллиноз Пищевая аллергия в детстве	БКМ
10	Сестра	Атопический дерматит	Не известно
11	Мать	Поллиноз Пищевая аллергия	Не известно
	Отец	Поллиноз Атопический дерматит	Не известно
	Сестра	Атопический дерматит Пищевая, холодовая аллергия	Не известно
12	Мать	Поллиноз Аллергический ринит	Мимоза Домашняя пыль
	Отец	Поллиноз	ольха
	Сибс	Аллергический ринит	Домашняя пыль
13	Мать	Атопический дерматит	Не известно
	Отец	Поллиноз	Не известно
14	Мать	Инсектная аллергия	Не известно
	Отец	Поллиноз	Травы, домашняя пыль, БКМ
15	Отец	Аллергический ринит	Домашняя пыль
16	Сестра	Бронхиальная астма	Шерсть кошки Домашняя пыль

17	Сестра	Пищевая гастроинтестинальная аллергия	БКМ говядина
18	Мать	Пищевая аллергия	БКМ
	Отец	Аллергический ринит	Домашняя пыль
19	Отец	Пищевая аллергия	Не известно
20	Мать	Атопический дерматит Пищевая аллергия. Поллиноз	Не известно
	Сестра	Пищевая аллергия	Не известно
21	Мать	Пищевая аллергия Атопический дерматит Поллиноз	Белки яйца Полынь, береза, ольха, книжная пыль
22	Мать	Лекарственная аллергия	Не известно
	Отец	Поллиноз	Не известно
23	Отец	Отек Квинке. Пищевая аллергия	Не известно
24	Отец	Поллиноз. Отек Квинке	Не известно
25	Отец	Отек Квинке	Не известно
26	Отец	Поллиноз	Шерсть кошек
27	Отец	Пищевая аллергия	БКМ
28	Мать	Поллиноз	Домашняя пыль, животные
29	Мать	Отек Квинке	Не известно

30	Отец	Пищевая аллергия	БКМ
	Мать	Поллиноз	Тополиный пух
31	Мать	Пищевая аллергия в детстве	Не известно
32	Мать	Атопический дерматит в детстве	Не известно
33	мать	Поллиноз	Пыльца березы, тополь, шерсть кошки
	Сибс	Поллиноз	Пыльца березы, тополь, шерсть кошки
34	Мать	БА	Не известно
	Отец	БА	Не известно
	Сибс	Поллиноз	Не известно
35	Мать	Пищевая аллергия	Цитрусовые
	Сестра	Атопический дерматит	Не известно
36	Мать	Пищевая аллергия	Не известно
	Сибс	Пищевая аллергия Атопический дерматит БА	Не известно
37	Мать	Лекарственная аллергия	Пенициллин
	Отец	Крапивница	Не известно

Таким образом, аллергологический анамнез был отягощен у 37 (74%) детей: чаще всего аллергические заболевания выявлялись у матерей – 26 (70,3%), по сравнению с отцами – 21 (56,8%); у 5 (13,5%) младенцев

аллергическими болезнями страдали все родственники первой линии родства (Таблица 18).

Поскольку сенсibilизация детей в антенатальном периоде и в периоде грудного вскармливания может осуществляться от матерей, были изучены пищевые предпочтения беременных и кормящих матерей наблюдаемых пациентов.

Таблица 18 – Частота наследственной отягощенности по аллергическим заболеваниям в исследуемой группе пациентов

Генеалогический аллергический анамнез	Пациенты (n = 37)	
	Абс.число (n)	%
Аллергические заболевания у матери	26	70,3
Аллергические заболевания у отца	21	56,8
Аллергия у обоих родителей	13	35,1
Аллергия у сибсов	13	35,1
Аллергия у трех членов первой линии родства	5	13,5

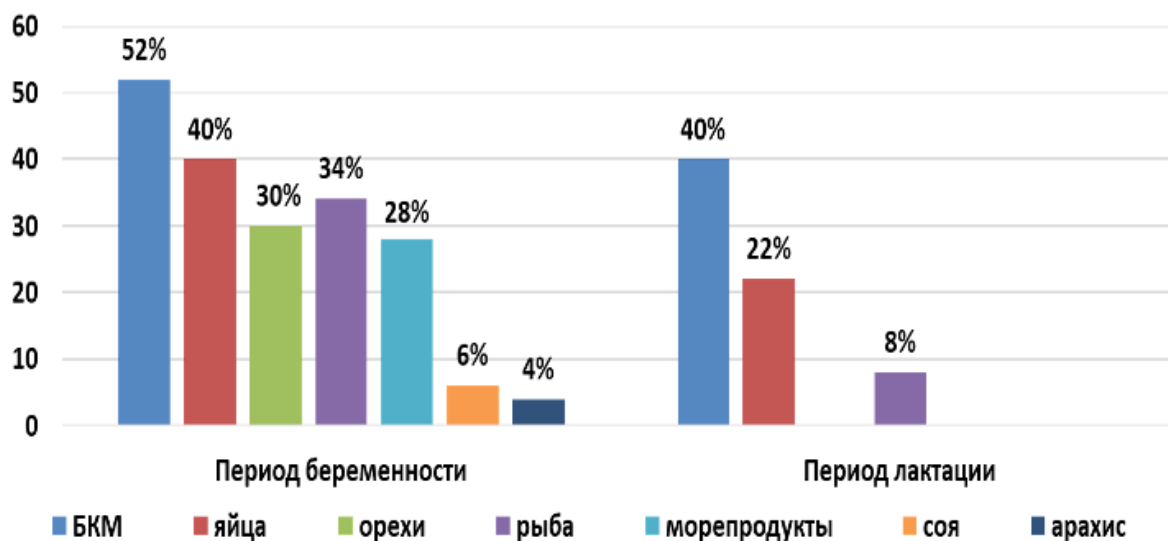


Рисунок 19 – Пищевые предпочтения матерей (%) в период беременности и лактации

Как представлено на Рисунок 19, в периоде беременности у матерей детей, реализовавших аллергические реакции, выявлено избыточное употребление молочных продуктов ($n=26$, 52%), яиц ($n=20$, 40%); отмечено излишне частое употребление рыбы ($n=17$, 34%), орехов ($n=15$, 30%) и морепродуктов ($n=14$, 28%). После рождения ребенка многие матери сохраняли в своем рационе значительное количество молока ($n=20$, 40%) и яиц ($n=11$, 22%).

На момент вступления в исследование лишь 19 (38%) детей находились на исключительно грудном вскармливании, в то время как 18 (36%) детей получали искусственное вскармливание адаптированными молочными смесями, а 13 (26%) детей – смешанное вскармливание. В группе риска раннего прекращения грудного вскармливания находились дети, родившиеся в тяжелом состоянии с низкой оценкой по шкале APGAR на 1 и 5 мин ($R = -0,464$, $R = -0,448$, соответственно), а также переведенные в ОРИТН и/или в отделение патологии новорожденных, поскольку эти дети отсрочено прикладывались к груди ($R = 0,625$; $R = 0,518$, соответственно). Таким

образом, более трети наших пациентов были полностью лишены грудного молока (не получали его протективных компонентов, в том числе лактоферрина).

Ранний отказ от грудного вскармливания являлся причиной раннего стартового применения родителями молочных смесей на основе БКМ – у 17 (34%) детей; 5 (10%) детей по выбору родителей получали смесь на основе белка козьего молока, 3 (6%) ребенка по рекомендациям педиатра получали смеси на основе частичного гидролиза белка (ГА), 5 (10%) детей – высокогидролизные смеси, аминокислотную смесь – 1 (2%) ребенок.

Установлено, что при искусственном вскармливании дети группы риска по развитию аллергии преимущественно получают смеси на основе БКМ ($R=0,443$).

Кожные и/или гастроинтестинальные симптомы аллергии манифестировали у 36 (72%) детей уже на 1-м месяце жизни, у 14 (28%) детей – на 2-м месяце. К кожным симптомам аллергии относили гиперемию, сухость кожи, аллергическую папулезную сыпь, явления экссудации и мацерации. Гастроинтестинальные проявления аллергии характеризовались коликами, срыгиваниями, запорами, разжиженным стулом.

Сухость кожи различной степени выраженности зарегистрирована у 28 (56%) пациентов: локализованная у 20 (40%) пациентов, у 8 (16%) пациентов – распространенная. Установлена положительная связь между рождением путем кесарева сечения и появлением сухости кожи в первые 3 месяца жизни ($R = 0,285$).

Гиперемия кожи зарегистрирована у 21 (42 %) пациента: локализованная (преимущественно на коже лица) у 13 (26%), распространенная – у 8 (16%).

Папулезная сыпь зарегистрирована у 42 (84%) пациентов: локализованная (преимущественно на коже лица) у 29 (58%) пациентов, у 13 (26%) пациентов – распространенная. Наиболее часто папулезная сыпь регистрировалась у детей, получающих искусственное вскармливание ($R = 0,445$).

Кожные симптомы могли сочетаться. Симптомы экссудации зарегистрированы у 10 (20%) детей, локализованная форма – у 8 (16%), распространенная – у 2 (4%). Отягощенный семейный аллергологический анамнез (наличие родственников с аллергией) был положительно связан с симптомами распространенной экссудации кожи ($R = 0,281$).

Гастроинтестинальные симптомы аллергии зарегистрированы: колики у 27 (54%), запоры у 11 (22%), срыгивания у 21 (42%), разжиженный стул у 26 (52%) детей. Дети, получавшие смесь на основе БКМ, чаще страдали коликами ($R = 0,311$).

Всем детям было проведено ультразвуковое исследование органов брюшной полости. Небольшое увеличение размеров печени, поджелудочной железы и селезенки обнаруживалось нечасто – у 4 (8%), 4 (8%) и 3 (6%) пациентов, соответственно. Чаще выявлялся метеоризм – у 27 (54%) детей, преимущественно меньшего возраста ($R = - 0,305$), из них выраженный – у 8 (16%), наряду со снижением эвакуаторной функции желудка – у 2 (4%) детей. Таким образом, преобладали ультразвуковые признаки, характерные для функциональных расстройств пищеварительного тракта. Установлена связь между поздним прикладыванием ребенка к груди (сутки жизни), ранним отказом от грудного вскармливания и изменениями при УЗИ органов брюшной полости – у таких детей чаще регистрировалось увеличение поджелудочной железы ($R = 0,527$) и задержка эвакуации содержимого из желудка ($R = 0,366$).

Другую группу риска составили дети, получавшие антибиотики после рождения. Этот фактор коррелировал с увеличением размеров селезенки и поджелудочной железы ($R=0,364$, $R=0,305$, соответственно). Следует отметить, что у детей, имеющих отягощенный семейный аллергологический анамнез, также часто регистрировалось увеличение печени при УЗИ органов брюшной полости ($R = 0,415$).

Средние значения показателей гемограммы пациентов представлены в Таблице 19. Среди изученных гематологических показателей (по данным

общего анализа крови) обращают внимание признаки ранней анемии: количество эритроцитов $< 3,8 \times 10^{12}/л$ было зарегистрировано у 27 (54%) детей, уровень гемоглобина < 115 г/л был у 31 (62%) детей. При этом низкие уровни гемоглобина и эритроцитов чаще определялись у пациентов на искусственном вскармливании, получающих смеси на основе белка коровьего (R = - 0,344; R = - 0,311, соответственно) и козьего молока (R = - 0,381; R = - 0,291, соответственно). Обнаружена положительная корреляция между относительным уровнем эозинофилов и изменениями со стороны кожных покровов (сухость кожи, распространенность сухости, экссудация, распространенность экссудации: R = 0,342, R = 0,468, R = 0,354, R = 0,318, соответственно), а также гастроинтестинальных расстройств – наличием жидкого стула (R = 0,279).

Таблица 19 – Гематологические показатели пациентов с начальными проявлениями аллергии

Показатели	Пациенты	Референсные значения
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	3,7 [3,3 – 4,1]	3,5 – 5,1 $\times 10^{12}/л$
Гемоглобин, г/л	113 [105 – 119]	124 – 166 г/л
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	9,05 [7,6 – 10,6]	6,6 - 11,6 $\times 10^9/л$
Нейтрофилы, %	16,65 [12,9 – 22,0]	21 – 39%
Лимфоциты, %	70,0 [63 – 74,0]	37,0 – 60,0%
Эозинофилы, %	6,0 [4 – 7,4]	2 – 6%
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	474,0 [351 – 545,00]	203 – 377 $\times 10^9/л$

В Таблице 20 представлены показатели иммунограммы пациентов из группы высокого риска развития аллергических заболеваний. Выявлены низкие показатели антител классов IgG и IgA, уровни которых прямо коррелировали между собой (R = 0,284). Отмечены высокие значения IgE, при этом уровень IgE был связан с возрастом ребенка и нарастал с его

увеличением ($R = 0,333$). Высокий уровень IgE чаще наблюдался у детей с гастроинтестинальными проявлениями аллергии, у которых было выявлено увеличение печени по данным УЗИ ($R = 0,419$).

Таблица 20 – Показатели иммунограммы у детей с начальными проявлениями аллергии

Показатели	Уровень содержания в сыворотке крови	
	Пациенты, $M \pm m$	Референсные значения, (кЕд/л)
IgA	$0,1394 \pm 0,0279$	0,00 – 0,30
IgM	$1,0544 \pm 0,6727$	0,10 – 0,70
IgG	$4,3122 \pm 0,2702$	2,05 – 9,48
IgE	$8,5424 \pm 3,125$	0 - 2

Всем детям был проведен иммунологический анализ «Аллергочип» с помощью технологии ISAC ImmunoCAP. Было изучено наличие специфических антител класса IgE(sIgE) к 112 аллергенам из 51 источника. Титры sIgE обнаружены у 5 (10%) детей. При анализе анамнестических данных оказалось, что матери этих детей получали антибиотики до и/или во время родов.

В Таблице 21 и на Рисунке 19 представлен спектр выявленных аллергенов и концентрации специфических IgE антител к ним: у 5 пациентов были выявлены причинно-значимые аллергены, наиболее часто это белок коровьего молока и яичный белок. Отмечена также сенсibilизация к соевым бобам, клещам домашней пыли, креветкам и тараканам.

Нами установлена положительная корреляция отягощенного семейного аллергологического анамнеза (количество родственников с аллергией) и наличия sIgE к различным аллергенам ($R = 0,288$); чаще всего выявлялась сенсibilизация (титр sIgE) к белкам коровьего молока, куриного яйца и клещам домашней пыли (для данных аллергенов корреляция с отягощенной наследственностью: $R = 0,295$; $R=0,311$ и $R=0,286$, соответственно).

Общий IgE достоверно коррелировал с титрами sIgE к белкам куриного яйца, клещам домашней пыли, креветке, анизакидам, таракану ($R = 0,888; 0,934; 0,930; 0,903, 0,903$ соответственно). Кроме того, выявление sIgE к БКМ, белкам куриного яйца, клещам домашней пыли, креветке, таракану коррелировало с распространенной гиперемией ($R = 0,296; 0,304; 0,292; 0,284, 0,280$, соответственно).

Таблица 21 – Результаты иммунологического обследования пациентов с помощью технологии ISAC ImmunoCAP

Код пациента	Общий IgE, кЕд/л	Аллерген	Антиген	Антиген	Уровень (ISU-E)	
10. К.	50	Коровье Молоко/мясо	Bos d 6	Сывороточный альбумин	0,4	
12. К.	11,7	Коровье молоко	Bos d 8	Казеин	2,0	
14. Л.	21	Яичный белок	Gal d 2	Овальбумин	0,3	
45.И.	19,8	Яичный белок	Gal d 2	Овальбумин	1,2	
		Соевые бобы	Gly m 6	Белок хранения, глицинин	0,4	
		Клещ <i>V.tropicalis</i> (клещ домашней пыли)	Blo t 5	Группа клещей 5	0,3	
48. З.	151,0	Яичный белок	Gal d 1	Овомукоид	0,6	
			Gal d 2	Овальбумин	0,8	
			Gal d 3	Кональбумин/овотрансферрин	1,2	
		Креветка	Pen m 4	Саркоплазматический кальций-связывающий белок	0,4	
		Перекрестно-реактивные компоненты: тропомиозин				
		Анизакиды	Ani s 3	тропомиозин	3,0	
		Таракан	Bla g 7	тропомиозин	2,6	
		<i>D. pteronyssinus</i> (клещ домашней пыли)	Der h 10	тропомиозин	2,6	
		Креветка	Pen m 1	тропомиозин	8,4	

*Стандартизованные единицы ISAC (ISU-E): $< 0,3$ - не определяется; $0,3 - 0,9$ - низкий; $1 - 14,9$ - умеренный/высокий; ≥ 15 очень высокий.

Профили молекулярной сенсibilизации представлены на Рисунке 20.

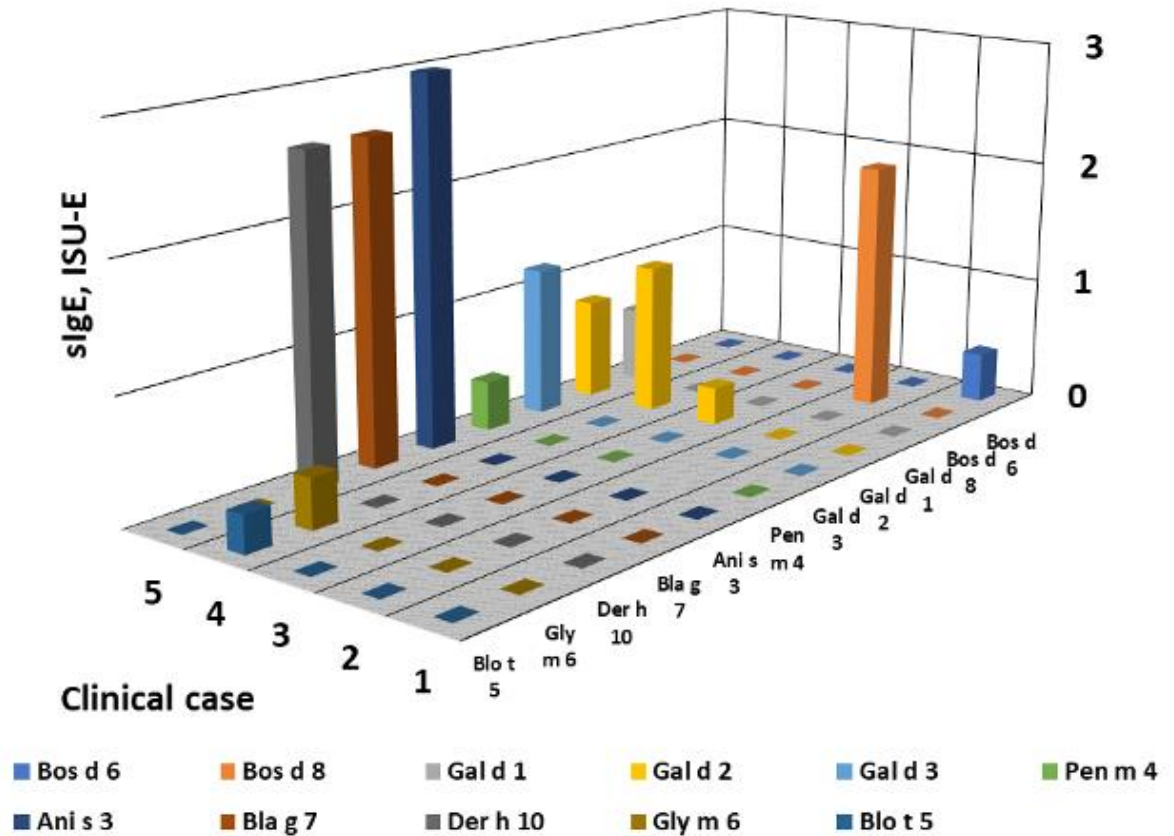


Рисунок 20 – Профили молекулярной сенсibilизации у детей.

Примечание: *Bos d 6*, сывороточный альбумин; *Bos d 8*, казеин; *Gal d 1*, овомукоид; *Gal d 2*, овальбумин; *Gal d 3*, Кональбумин/овотрансферрин; *Pen m 4*, саркоплазматический кальций-связывающий белок, *Ani s 3*, тропомиозин; *Bla g 7*, тропомиозин; *Der h 10*, тропомиозин; *Pen m 1*, тропомиозин.

У всех пациентов был исследован состав кишечной микробиоты (Таблица 22).

Таблица 22 – Особенности состава кишечной микробиоты у детей первых 3-х месяцев с начальными проявлениями аллергии

Виды бактерий	Количественная характеристика дисбиотических нарушений	Количество пациентов с дисбиотическими нарушениями N (%)	Референсные значения
Бифидобактерии	$> 10^{10}$	4 (8)	10^{10} - 10^{11}
Лактобациллы	$< 10^7$ [10^6 – 10^7]	42 (84)	10^7 - 10^8
Clostridium spp.	10^5 [10^5 – 10^6]	20 (40)	$< 10^3$
Proteus spp.	10^8 [$10^{7,5}$ – 10^8]	4 (8)	Отсутствует
Staphylococcus aureus	10^5 [10^4 – 10^5]	24 (48)	Отсутствует
Klebsiella spp.	10^7 [$10^{6,5}$ – 10^8]	24 (48)	$\leq 10^4$
Pseudomonas spp.	10^3 [10^3 – 10^3]	50 (100)	Отсутствует
Enterococcus	$<10^6$ [10^5 – 10^7]	0(0)	10^5 - 10^7
E. coli Lac (+)	10^5 [10^2 – 10^5]	16 (32)	10^7 – 10^8
E. coli Lac (-)	10^5 [10^5 – 10^7]	39 (78)	$< 10^5$
E. coli Гем (+)	10^8 [10^8 – 10^8]	12 (24)	Отсутствует
Citrobacter spp.	10^5	1 (2)	$\leq 10^4$
Raoultella spp.	10^6	1 (2)	$\leq 10^4$

Анализ полученных нами данных выявил качественные и количественные изменения в составе кишечной микробиоты у пациентов с начальными проявлениями аллергии: снижение уровня индигенных бактерий, прежде всего лактобактерий, относящихся к инициальной группе

микроорганизмов, колонизирующей желудочно-кишечный тракт, что обеспечивает необходимую среду для роста анаэробов. Неблагоприятное состояние кишечного гомеостаза предрасполагало к качественному и количественному росту энтеробактерий (Enterobacteriaceae), таких как *Klebsiella* spp., лактозонегативные *E. coli* и гемолизирующие *E. coli*, *Proteus* spp., а также *Pseudomonas* spp., обнаруженных в повышенном количестве у значительного числа пациентов (Таблица 22). Обращает внимание снижение в составе кишечной микробиоты лактобактерий, при преобладающем росте *Staphylococcus aureus* и *Clostridium* spp.

Нами установлена положительная корреляция между рождением путем кесарева сечения и содержанием энтерококков в кале ($R = 0,280$), а также прямая связь отягощенного аллергологического анамнеза (количество родственников, страдающих аллергическими заболеваниями) и содержания лактозонегативной *E. coli* в стартовой кишечной микробиоте младенцев ($R = 0,306$). Выявлена достоверная прямая связь раннего искусственного вскармливания смесями на основе белков коровьего и козьего молока с дизонтогенезом кишечной микробиоты (повышенный уровень энтерококков, *E. coli*: $R=0,280$, $R=0,340$, соответственно), возможно, это частично обусловлено отсутствием микробиото-протективного влияния субстанций грудного молока, в том числе лактоферрина.

Интересен факт количественного увеличения лактозонегативной *E. coli* в составе кишечной микробиоты у детей, рожденных матерями старше 35 лет. Установлена отрицательная корреляция между массой ребенка при рождении и содержанием гемолизирующей *E. coli* в кишечной микробиоте. Таким образом, не только способ родоразрешения, но также возраст матери и масса ребенка при рождении являлись факторами, определяющими иммунный фенотип ребенка.

Полученные нами на третьем этапе работы данные продемонстрировали, что количественное преобладание в кишечной микробиоте условно-патогенных микроорганизмов тесно связано с аллергической

сенсibilизацией. Так, при повышенном содержании *Pseudomonas aeruginosa* чаще регистрировались положительные результаты иммунологического тестирования с использованием алергочипа и наличием sIgE к БКМ ($R = 0,873$). При высоком содержании лактозонегативной *E. coli* чаще регистрировались sIgE к белкам куриного яйца, клещам домашней пыли, креветке, анизакидам, таракану ($R = 0,286; 0,327; 0,332; 0,331, 0,3317$, соответственно). Обращает внимание количественная диссоциация содержания грамположительных бактерий в кишечной микробиоте у детей группы риска развития атопии: резко сниженное содержание лактобактерий при повышенном количестве клостридий и золотистого стафилококка.

4.2. Четвертый этап исследования: особенности состава кишечной микробиоты у детей с аллергией во втором полугодии жизни

35 детей из 50 включенных в исследование в возрасте 3-х месяцев, были повторно обследованы в возрасте 6-8 мес. Клинические и параклинические исследования выполнялись с учетом индивидуальных показаний и ранее проведенного обследования. У всех пациентов повторно произведен забор биологического материала: кровь из вены на иммунологический анализ «Аллергочип» с помощью технологии ISAC ImmunoCAP (определение основных классов иммуноглобулинов и специфических IgE антител к молекулам аллергенов – 112 компонентов из 51 источника); кал на исследование микрорейзажа количественным методом с определением основных семейств условно-патогенных микроорганизмов, а также микробов-симбионтов.

В нашем исследовании 21 (60%) детей до 6 мес и далее получали смешанное вскармливание (предпочтительно грудное молоко с докормом адаптированными молочными смесями). На исключительно грудном вскармливании к возрасту 6 мес не находился ни один ребенок. Перевод на искусственное вскармливание осуществлялся в различные периоды младенчества в связи с гипогалактией/агалактией у матери, появлением

симптомов пищевой аллергии у детей первого года жизни. Искусственное вскармливание получали 14 (40%) детей – адаптированные молочные смеси, в том числе профилактические и лечебные. Продукты прикорма были введены 16 (45,7%) детям в 4-6 месяцев жизни, остальным – 19 (54,3%) детям – после 6 месяцев жизни.

Дети на смешанном и искусственном вскармливании к моменту осмотра в возрасте 6 – 8 месяцев получали питание с учетом коррекции его в 3 месяца. Смеси на основе БКМ не использовались, смеси на основе частичного гидролиза белка – получали 28 (80%) детей, 7 (20%) – получали высокогидролизные смеси. Каждый ребенок одновременно или последовательно получал две или более смесей.

Введение продуктов прикорма в период от 4 до 6 месяцев жизни («окно толерантности») зарегистрировано у 17 (48,6%) пациентов. В этот период детям были введены следующие виды прикорма: овощное пюре, каши безмолочные. Вид первого вводимого прикорма зависел от состояния здоровья ребенка (наличие запоров, избыточной/недостаточной массы тела). Ранее 4 месяцев жизни продукты прикорма детям не вводились. Детям 6-8 месяцев жизни были введены следующие виды продуктов прикорма: овощное пюре, каши безмолочные, мясное пюре (кролик, индейка), растительное масло, фруктовое пюре (зеленое яблоко, груша).

У части детей за период, прошедший после первого осмотра, на фоне коррекции рациона матерей и / или замены смеси, получаемой ребенком, была отмечена положительная динамика клинических проявлений аллергии – уменьшение интенсивности гиперемии и сухости кожи у 7 (20%), уменьшение распространенности сыпи – у 10 (28,5%); уменьшение частоты и длительности колик у 12 (34,2%), урежение эпизодов диареи – у 8 (22,8%). Частота запоров и эпизодов срыгиваний в динамике наблюдения незначительно уменьшилось у всех пациентов. В целом значительная положительная динамика, в том числе по оценке родителей имела место у 6 (17,1%) детей, умеренно выраженная у 9 (25,7%). У 20 (57,1%) детей при

удовлетворительном общем состоянии и возрастных показателях физического и психомоторного развития существенной динамики клинической картины аллергии отмечено не было, что объясняется относительно коротким периодом наблюдения (3 – 6 месяцев); в то же время ни в одном случае не отмечено нарастания тяжести аллергии.

Незначительно выраженные изменения картины УЗИ брюшной полости (небольшое увеличение размеров печени, поджелудочной железы, селезенки; метеоризм) сохранялись лишь у 4 детей; у 1 ребенка был впервые выявлен гастроэзофагальный рефлюкс.

Проведен анализ повторных результатов клинического анализа крови в возрасте 6 – 8 месяцев (таблица 23).

Таблица 23 – Гематологические показатели пациентов в исследовании

Показатели	Пациенты, n = 35	Референсные значения
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	4,1 [3,8-4,8]	3,5 – 5,1 $\times 10^{12}/\text{л}$
Гемоглобин, г/л	115 [109-124]	115 – 126 г/л
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	8,9 [7,6-10,8]	6,6 - 11,6 $\times 10^9/\text{л}$
Нейтрофилы, %	17 [13-22]	21 – 39%
Лимфоциты, %	70[63-74]	37,0 – 60,0%
Эозинофилы, %	5[3-6]	2 – 6%
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	413 [333-518]	203 – 377 $\times 10^9/\text{л}$

Среди изученных гематологических показателей (по данным общего анализа крови) обращают внимание признаки анемии легкой степени: уровень гемоглобина < 115 г/л был отмечен у 7 (20%) детей. Обнаружена положительная корреляция между относительным уровнем эозинофилов и изменениями со стороны кожных покровов: распространенная сухость и мокнутие кожи (при расчётах использовались ранги: показатель «сухость кожи» / «мокнутие кожи»: отсутствует — 0, локализованная — 1, распространенная — 2): $R = 0,342$, $R = 0,318$, соответственно).

С помощью технологий ИФА и *ImmunoCAP ISAC* исследованы показатели иммунологического статуса пациентов.

В Таблице 24 представлены результаты исследования гуморального иммунитета пациентов в возрасте 6-8 месяцев.

Таблица 24 – Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови детей в 6-8 месяцев

Показатели	Уровень содержания в сыворотке крови (кЕд/л)	
	Пациенты 6-8 мес жизни, n=35 M±σ	Референсные значения
<i>IgA</i>	0,249 ± 0,245	0,00 – 0,30
<i>IgM</i>	0,472 ± 0,164	0,10 – 0,70
<i>IgG</i>	4,3518 ± 1,75	2,05 – 9,48
<i>IgE</i>	37,14 ± 57,15	8 – 20

При сравнении с аналогичными данными детей в возрасте 3 месяцев можно отметить нарастание частоты выявления у детей повышенного уровня общего *IgE* (с 14% до 42%, $p = 0,0079$) при отсутствии существенной динамики других показателей.

Иммунологический анализ «Аллергочип» с помощью технологии *ISAC ImmunoCAP* был проведен всем наблюдавшимся детям (n=35). Повышенные титры *sIgE* обнаружены у 13 (37%) детей. Из 5 детей с выявленным в 3 месяца повышением титра специфических *IgE* (Таблица 25), повторное обследование было проведено у всех детей; из остальных 30 повторно обследованных пациентов специфические *IgE* впервые обнаружены у 8 детей. В Таблице 25 представлен спектр *sIgE* к молекулам аллергенов, в Таблице 26 – уровни сенсибилизации к указанным аллергенам.

Таблица 25 – Молекулярные профили сенсibilизации у пациентов 6-8 месяцев жизни

№ п/п	Общий IgE, кЕд/л	Аллерген	Антиген	Антиген	Уровень (ISU-E)*
1.	20	Кошка	<i>Feld 1</i>	Утероглобин	0,37
2.	20	Пшеница	<i>Tria 19</i>	Омега-5-Gliadin	0,49
3.	101	Коровье молоко/мясо	<i>Bos d 6</i>	Сывороточный альбумин	0,4
4.	76	Коровье молоко/мясо	<i>Bos d 6</i>	Сывороточный альбумин	0,6
5.	85,2	Яичный белок	<i>Gal d 1</i>	Овомукоид	3,8
6.	38,5	Яичный белок	<i>Gal d 1</i>	Овомукоид	0,4
7.	93,7	Яичный белок	<i>Gal d 1</i>	Овомукоид	1,0
8.	27,8	Яичный белок	<i>Gal d 2</i>	Овальбумин	1,0
9.	239	Арахис	<i>Ara h1</i>	Глобулин 7S	0,7
			<i>Ara h2</i>	Альбумин 2S	1,7
			<i>Ara h6</i>	Альбумин 2S	1,6
		Соя	<i>Gly m 6</i>	Белок хранения, глицинин	0,6
		Киви	<i>Act d 1</i>	Цистеиновая протеаза	4,0
		Кошка	<i>Fel d 1</i>	Утероглобин	2,2
			<i>Fel d 4</i>	Липокалин	0,9
		Яичный белок	<i>Gal d 1</i>	Овомукоид	6,2
<i>Gal d 2</i>	Овальбумин		0,6		
10.	7,6	Пыльца березы	<i>Bet v 1</i>	Протеин PR-10	6,0
11.	219	Коровье молоко/мясо	<i>Bos d 6</i>	Сывороточный альбумин	0,5
12.	124	Яичный белок	<i>Gal d 1</i>	Овомукоид	0,8
			<i>Gal d 2</i>	Овальбумин	1,2
13.	35	Яичный белок	<i>Gal d 1</i>	Овомукоид	0,48
		Кунжут	<i>Ses I 1</i>	2Сальбумин	1,2

*Стандартизованные единицы ISAC (ISU-E): <0,3 – не определяется; 0,3-0,9 – низкий; 1-14,9 – умеренный/высокий; ≥ 15 очень высокий.

В группе детей 6- 8 месяцев жизни сенсibilизация была выявлена у 13 (37,1%) детей. Наиболее высокая частота сенсibilизации отмечалась к белкам яйца у 7 (20%) детей (к овомукоиду, овальбумину), коровьего молока – у 3 (9%) детей (к сывороточному альбумину), кошке – у 2 (6%) детей (к утероглобину, липокалину). К данным аллергенам преобладал умеренный уровень сенсibilизации. У одного ребенка выявлена моносенсibilизация к пшенице (низкий уровень), к пыльце березы (умеренный). У двух детей выявлена поливалентная сенсibilизация: у одного ребенка – к белкам яйца, кунжуту; у второго – к арахису, сое, киви, кошке, яичному белку (низкий, умеренно/высокий уровень сенсibilизации).

Таблица 26 – Частота и уровень сенсibilизации к пищевым и респираторным аллергенам у детей в возрасте 6-8 месяцев

Аллерген: Антиген	Количество детей с выявленным уровнем сенсibilизации	
	Низкий уровень	Умеренный / высокий уровень
Белок яйца: Овомукоид	3	2
Белок яйца: Овальбумин	1	2
Коровье молоко/мясо: Сывороточный альбумин	3	-
Кошка: Утероглобин	1	1
Кошка: Липокалин	1	-
Пшеница: Omega-5- Gliadin	1	-
Арахис: Глобулин 7S	1	-
Арахис: Альбумин 2S	-	1
Арахис: Альбумин 3S	-	1
Соя: Белок хранения, глицинин	-	1

Киви: Цистеиновая протеаза	1	-
Пыльца березы: Протеин PR-10	-	1
Кунжут: 2S альбумин	-	1

У подавляющего большинства детей (10 из 13) причинно-значимый аллерген имел пищевое происхождение, у 3 детей отмечена сенсibilизация к респираторным и эпидермальным аллергенам (береза, кошка). Таким образом, сенсibilизация к эпидермальным и респираторным аллергенам может сформироваться уже на первом году жизни.

Как представлено в Таблице 25 у 8 из 13 детей с выявленной впервые в возрасте 6-9 месяцев сенсibilизацией в 3-х месячном возрасте специфические IgE не определялись. Этот факт может быть объяснен расширением контактов ребенка с причинно-значимыми пищевыми и бытовыми аллергенами после 3-х месяцев; в том числе, у детей, частично вскармливаемых грудным молоком. У этих пациентов пищевая сенсibilизация могла реализоваться через возможные нарушения в диете кормящей матери (белок яйца, кунжут, пшеница). Трое детей с выявленной сенсibilизацией к белку коровьего молока (БКМ) получали в качестве прикорма (по выбору родителей) мясное пюре из телятины; смеси на основе БКМ ни один ребенок не получал. У одного пациента (№9) после проведенной в 3 месяца коррекции образа жизни и диеты кормящей матери, профиль сенсibilизации существенно изменился, но сохранялась поливалентная сенсibilизация на умеренном уровне. У пациента (№8) уровень сенсibilизации к овальбумину куриного яйца несколько увеличился (кормящая мать не смогла полностью исключить этот продукт из своего питания).

Мы провели повторное исследование кишечной микробиоты у пациентов 6-8 месяцев (Таблица 27). При сравнении этих данных с

результатами, полученными у пациентов в 3 месяца можно отметить более частое обнаружение дефицита бифидобактерий ($p=0,0536$), при достоверном уменьшении частоты выявления сниженного уровня лактобацилл ($p<0,001$). В то же время участилось выделение клостридий ($p=0,0015$), протей ($p<0,001$), лактозонегативной кишечной палочки ($p=0,0869$) и цитробактера ($p <0,001$). Снизилась частота обнаружения таких микроорганизмов как золотистый стафилококк ($p=0,1266$), гемолизирующая кишечная палочка ($p=0,0579$) и синегнойная палочка ($p <0,001$).

Таблица 27 – Особенности состава кишечной микробиоты у детей 6-8 месяцев

Виды бактерий	Количественная характеристика дисбиотических нарушений	Дети 6-8 мес с дисбиотическими нарушениями, n (%)	Референсные значения
<i>Bifidobacterium</i> spp.	10^9 [10^8 – 10^9]	8 (23)	10^{10} – 10^{11}
<i>Lactobacillus</i> spp.	10^6 [10^4 – 10^6]	3(9)	10^7 – 10^9
<i>Clostridium</i> spp.	10^4 [10^3 – 10^5]	27(77)	$<10^3$
<i>Proteus</i> spp.	10^5 [10^4 – 10^7]	17 (49)	Отсутствует
<i>Staphylococcus aureus</i>	10^5 [10^4 – 10^5]	11 (31)	Отсутствует
<i>Klebsiella</i> spp.	10^7 [10^4 – 10^8]	16 (46)	$\leq 10^4$
<i>Enterococcus</i> spp.	10^7 [10^7 – 10^8]	5 (14)	10^5 – 10^7
<i>Pseudomonas</i> spp.	10^3 [10^3 – 10^4]	4 (11)	Отсутствует

<i>E. coli</i> Lac (+)	10 ⁴ [10 ² – 10 ⁶]	8 (23)	10 ⁷ – 10 ⁸
<i>E. coli</i> Lac (-)	10 ⁶ [10 ⁵ – 10 ⁶]	32(91)	<10 ⁵
<i>E. coli</i> Гем (+)	10 ⁸ [10 ⁸ – 10 ⁹]	3 (9)	Отсутствует
<i>Citrobacter</i> spp.	10 ⁸ [10 ⁸ – 10 ⁸]	20(57)	<=10 ⁴
<i>Raoultella</i> spp.	10 ⁴ [10 ⁴ – 10 ⁴]	1(3)	<= 10 ⁴

Практически на прежнем уровне сохранилась частота выделения клебсиеллы и раоултеллы (таблица 28).

Таблица 28 – Динамика дисбиотических нарушений у детей с аллергией

Виды бактерий	Дети 2-3 мес с дисбиотическими нарушениями, n (%)	Дети 6-8 мес с дисбиотическими нарушениями, n (%)	p
<i>Bifidobacterium</i> spp.	4 (8)	8 (23)	0,0536
<i>Lactobacillus</i> spp.	42 (84)	3(9)	< 0,001
<i>Clostridium</i> spp.	20 (40)	27(77)	0,0015
<i>Proteus</i> spp.	4 (8)	17 (49)	<0,001
<i>Staphylococcus aureus</i>	24 (48)	11 (31)	0,1266
<i>Klebsiella</i> spp.	24 (48)	16 (46)	0,8354
<i>Enterococcus</i>	0 (0)	5 (14)	<0,001
<i>Pseudomonas</i> spp.	50 (100)	4 (11)	<0,001
<i>E. coli</i> Lac (+)	16 (32)	8 (23)	0,4985
<i>E. coli</i> Lac (-)	39 (78)	32(91)	0,0869

<i>E. coli</i> Гем (+)	12 (24)	3 (9)	0,0579
<i>Citrobacter spp.</i>	1 (2)	20(57)	<0,001
<i>Raoultella spp.</i>	1 (2)	1(3)	0,6569

Выявлены положительные ассоциации:

- Повышенное содержание клостридий положительно коррелировало с содержанием общего *IgE* ($R=0,3080$).
- Повышенное содержание *Citrobacter spp.* положительно связано с *IgE Gal d2* (овальбумин) ($R=0,3414$).
- Повышенное содержание *Proteus spp.* положительно коррелировало с *IgE Gald2* (овальбумин) ($R=0,4931$).
- Повышенное содержание *Proteus spp.* положительно связано с *IgE Gal d1* (овомукоид) ($R=0,4931$).
- Содержание *Raolutella spp.* положительно коррелировало с *IgE Gal d2* (овальбумин) ($R=0.5242$).

Таким образом, нарушения кишечной микробиоты оказались тесно связанными с пищевой сенсibilизацией.

Мы оценили связь выявления сенсibilизации, с одной стороны, и дисбиоза – с другой, с фактом искусственного вскармливания ребенка в возрасте 6 – 8 месяцев. С этой целью проведено определение ассоциаций для пациентов, получающих в этом возрасте смешанное вскармливание ($n = 21$) или искусственное вскармливание ($n = 14$) с характеристиками профиля и уровней сенсibilизации. Достоверных корреляций между характером вскармливания и фактом выявления специфических *IgE* не получено, что, возможно, связано с небольшим объемом выборки и значительными различиями в объемах получаемого в этом возрасте грудного молока. В то же время, при оценке взаимосвязей изменений микробиоты с характером вскармливания удалось выявить достоверные ассоциации. С искусственным вскармливанием связан дефицит бифидобактерий (ОШ=1,375,

ДИ=0,9768;1,9356, $p=0,042$) и дефицит энтерококков (ОШ=6,8, ДИ = 0,557;82,999, $p = 0,1$), избыток клостридий (ОШ=1,5385, ДИ=1,1255;2,1029, $p=0,01$), т.е. микроорганизмов, ассоциированных с персистенцией процесса сенсбилизации.

Таким образом, на протяжении непродолжительного периода наблюдения (3-6 месяцев), после коррекции питания у детей с ранними проявлениями аллергии отмечается тенденция к стиханию клинических симптомов аллергии; однако эта положительная динамика сочетается с некоторым увеличением уровня пищевой и бытовой сенсбилизации по данным иммунологического исследования. Помимо этого, у пациентов сохраняются разнонаправленные дисбиотические нарушения, что может быть связано с отсутствием в их питании протективных факторов грудного молока, в первую очередь лактоферрина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Медико-биологическая и медико-социальная значимость обеспечения грудного вскармливания младенцев, как одного из решающих факторов их полноценного развития, в последние десятилетия подтверждается многочисленными исследованиями протективных субстанций грудного молока [273,14,57]. Грудное молоко представляет собой сложную пищевую матрицу, содержащую многочисленные компоненты, которые потенциально влияют на состав микробиоты младенцев, усиливая рост определенных бактерий, или ограничивая рост других [259]. Грудное вскармливание считается «вторым этапом иммунологического созревания», поскольку грудное молоко содержит множество биологически активных соединений, влияющих на рост, модуляцию и созревание иммунной системы, защиту от патогенов и токсинов [50,57]. Расшифрованы механизмы иммуномодулирующего и противoinфекционного эффектов таких субстратов, как олигосахариды грудного молока, нуклеотиды, разнообразные протеины, жировые глобулы [223,57]. Одним из биологически активных белков грудного молока является лактоферрин – железосвязывающий гликопротеин, обладающий как бактериостатическим, так и бактерицидным действием за счет связывания ионов железа [154]. Помимо этого, лактоферрин в форме гололактоферрина препятствует образованию бактериальных пленок [245], снижает выброс провоспалительных цитокинов, усиливает адаптивные иммунные реакции, модулирует формирование микробиоты кишечника и обладает нейропротективным эффектом [254,256]. Лактоферрин в высоких концентрациях обладает способностью стимулировать рост и дифференцировку незрелой кишки путем усиления пролиферации энтероцитов и закрытия межклеточных пространств, в то время как при более низких концентрациях он стимулирует дифференцировку энтероцитов и экспрессию кишечных пищеварительных

ферментов [166]. Поскольку в 60-е гг XX века удалось выделить лактоферрин как из женского молока, так и из молока животных, а также из других биологических жидкостей, проводились исследования, имевшие целью определить возможности применения этого субстрата с профилактической и лечебной целью при различных патологических состояниях [265,202,151]. Для оценки эффекторных механизмов воздействия лактоферрина *in vitro* и *in vivo* прежде всего необходимо было определить его концентрацию в молоке в зависимости от различных факторов, а также взаимосвязи уровня лактоферрина с протективным континуумом макроорганизма, прежде всего с кишечной микробиотой [254,256].

Было проведено многоцентровое исследование со стандартизированным дизайном, объединившие данные публикаций из различных регионов с 1976 по 2015 гг. [268]. Анализировались связи концентрации лактоферрина в молоке не только со стадиями лактации, но и с такими материнскими факторами, как раса, регион проживания, паритет; а также с младенческими факторами – гестационным возрастом и наличием инфекций. Была подтверждена зависимость уровня лактоферрина от стадии лактации (наиболее высокий уровень в молозиве), но ни один другой из анализируемых факторов не был достоверно связан с концентрацией лактоферрина. Отдельные исследования отмечали различия в составе грудного молока в зависимости от этнической принадлежности матери, но не в отношении лактоферрина [227]. Данные о связях социального положения матери с уровнем лактоферрина в молоке противоречивы.

Публикации, посвященные корреляциям уровней индигенной микробиоты с обеспеченностью младенца лактоферрином, также носят противоречивый характер. Так, данные некоторых исследований подтверждают стимулирующую роль лактоферрина в отношении отдельных штаммов лакто- и бифидобактерий в сочетании с бактерицидной активностью против условно-патогенных микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью [256,208]. Другие публикации не

подтверждают этот эффект и/или напротив, сообщают об ингибирующем влиянии лактоферрина (как правило, это лактоферрин коровьего молока) на пробиотические микроорганизмы [155].

В нашем исследовании при определении концентрации Лф в молозиве и зрелом грудном молоке был подтвержден факт уменьшения содержания лактоферрина в динамике лактации: от наибольшей концентрации его в молозиве до уменьшенной почти в 3 раза в зрелом грудном молоке, что совпадает с результатами других исследователей [168,198,71] и отражает, вероятно, общие эволюционные закономерности секреции протективных факторов в биологические субстраты [59]. Достоверных различий в содержании и динамике уровней лактоферрина в грудном молоке матерей, родивших в срок и преждевременно, нами не установлено, что также отмечают многие исследователи [71,268]. Интересно, что в нашем исследовании достоверная корреляция содержания Лф в молозиве и в зрелом молоке была установлена только в отношении женщин, родивших в срок. Это может быть объяснено, с одной стороны, небольшим объемом группы преждевременно родивших женщин (15 матерей), с другой – значительно более отягощенным течением беременности у них и проведением обследования в различные сроки после последней менструации.

При исследовании фекального Лф в возрасте новорожденных пациентов 3 дня и 1 месяц и у доношенных, и у недоношенных была отмечена динамика, обратная описанной выше динамике концентрации Лф в грудном молоке: то есть уровень фекального Лф, исходно высокий, еще более повышался к достижению детьми возраста 1 месяц, причем у недоношенных и исходный, и последующий уровни Лф были более высокими, чем у доношенных.

Статистически достоверных связей уровня фекального Лф у недоношенных с гестационным возрастом нами не установлено. Вероятно, повышение содержания фекального Лф на протяжении первого месяца грудного вскармливания связано с значительным увеличением в динамике

получаемых ребенком объемов грудного молока, что особенно показательно у недоношенных младенцев. Высокий «выброс» фекального лактоферрина у недоношенных может быть также связан с функциональной незрелостью этих пациентов, в то числе незрелостью пищеварительных ферментных систем, а также с возможными особенностями состава их кишечной микробиоты – как известно, количественное содержание и разнообразие микроорганизмов в кишечнике у недоношенных снижено [74,143,141].

Нами изучались корреляции содержания индигенных микроорганизмов (*Bifidobacteria* spp. и *Lactobacillus* spp.) в микробиоте у наших пациентов с показателями уровней Лф в получаемом детьми грудном молоке и его уровнем в фекалиях. На формирование сложного микробного сообщества влияют многочисленные факторы, прежде всего особенности вскармливания [183,144].

Было высказано предположение о бифидогенном эффекте Лф *in vivo*, но результаты опубликованных работ противоречивы. Так, в исследовании на мышах, колонизированных кишечной микробиотой новорожденных младенцев, коровье молоко, обогащенное Лф, увеличивало количество кишечных бифидобактерий [140]; но в другом исследовании микробиота младенцев, которые получали смесь с добавлением Лф [44], не была изменена по сравнению с младенцами, которые вскармливались смесью без этой добавки. Напротив, Roberts АК. и соавт. описали микробиоту с преобладанием бифидобактерий у половины младенцев после 3 месяцев вскармливания смесью, обогащенной Лф [250]. В экспериментальной работе было показано, что трансгенное коровье молоко, содержащее рекомбинантный человеческий Лф, модулирует кишечную микробиоту у новорожденных поросят [263].

Результаты нашего исследования показали, что уровни содержания как бифидобактерий, так и лактобацилл в кишечной микробиоте доношенных и недоношенных младенцев, получавших материнское молоко, в динамике наблюдения существенно увеличились. При этом содержание

бифидобактерий в микробиоте детей, родившихся в срок и недоношенных достоверно не различалось, тогда как уровень содержания лактобацилл у недоношенных в возрасте 1-го месяца был значительно снижен в сравнении с доношенными. Тем не менее, только в отношении недоношенных детей нами были выявлены достоверные прямые корреляции между концентрацией фекального лактоферрина и содержанием представителей обоих изученных нами родов индигенных микробов (*Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.*). У доношенных младенцев с аналогичной динамикой состава микробиоты, особенно наглядно проявившейся в увеличении уровня бифидобактерий, корреляции не достигали порога достоверности, что частично может быть объяснено вероятными различиями видового состава рода *Bifidobacterium* у детей этой подгруппы.

Несколько исследований *in vitro* показали, что Лф человека способен стимулировать рост бифидобактерий [188,132,220], однако этот эффект по-разному проявляется в отношении разных видов и штаммов бифидобактерий [118].

При динамической оценке связей между уровнями лактобацилл и бифидобактерий в микробиоте была установлена достоверная положительная корреляция у недоношенных детей в возрасте 3-х дней (в период максимальной обеспеченности лактоферрином и другими протективными факторами молозива); в конце 1-го месяца жизни таковой связи не выявлено. Можно предположить, что выявленные у недоношенных детей взаимосвязи стартового этапа формирования кишечной микробиоты с обеспеченностью протективными субстратами (в т.ч. лактоферрином) имеют глубокий биологический смысл и отражают особо важную роль грудного вскармливания именно у недоношенных детей.

В нашем исследовании выявлена положительная корреляция между количеством лейкоцитов и моноцитов в периферической крови у доношенных новорожденных и уровнем фекального лактоферрина в возрасте 3-х суток (период ранней постнатальной адаптации). Возможно, такой

системный эффект лактоферрина связан с мягким модулирующим действием на гемопоэтические популяции, имеющие соответствующие рецепторы и высокую чувствительность этих рецепторов на этапе постнатальной гормонально-метаболической перестройки. В доступной нам литературе мы не встретили описания аналогичных эффектов, важных с позиции противоинфекционной защиты. Необходимо дальнейшее изучение возможных системных клеточных эффектов лактоферрина и других биологически активных субстанций грудного молока.

Нами было выполнено пилотное исследование активности биотехнологического (генетически модифицированного) аналога лактоферрина в отношении индигенных микроорганизмов в эксперименте *in vitro*.

В последние годы лактоферрин, выделенный из коровьего молока, в ряде стран стали использовать в составе детского питания [236]. Однако, этот белок по некоторым параметрам отличается от природного лактоферрина грудного молока [177], что ограничивает его широкое использование. В Институте биологии гена РАН в рамках реализации программ Союзного государства (Россия-Белоруссия) из молока генно-инженерных коз был получен препарат лактоферрин, который по физико-химическим параметрам и биологической активности оказался сходным с лактоферрином грудного молока [230]. Было установлено, что биотехнологический аналог лактоферрина женского молока обладает выраженным бактерицидным действием, в том числе и в отношении антибиотико-устойчивой микробиоты [113]. При использовании сочетания лактоферринов женского молока (90%) и козы (10%), присутствующих в молоке генноинженерных коз, установлена стимуляция врожденного и адаптивного иммунитета за счет активации иммунокомпетентных клеток в клеточных культурах [13]. Поскольку в будущем предполагается широкое использование биотехнологического аналога лактоферрина человека как компонента заменителей грудного молока для вскармливания детей грудного возраста, возникла необходимость

исследования действия этого белка на бифидобактерии, присутствующие в нормально функционирующем желудочно-кишечном тракте детей первого года жизни [7]. Ранее проведенными исследованиями было показано, что бифидобактерии могут быть устойчивы к антибактериальному действию лактоферрина; более того, данный белок может стимулировать их рост [208]. Между тем результаты этих исследований часто были противоречивы в эффекте влияния, так как различные виды бифидобактерий могут по-разному (одни ускоряют свой рост, другие замедляют) реагировать на присутствие лактоферрина в среде культивирования. По-видимому, определяющим фактором при этом является происхождение лактоферрина [2]. Кроме того, известно, что гидролизаты разных лактоферринов имеют отличия от нативного белка [155]. При этом степень насыщенности лактоферрина железом не играет существенной роли в отношении роста бифидобактерий [30]. Следует отметить, что большинство выполненных к настоящему времени исследований были проведены с использованием коровьего (ксеногенного) варианта белка лактоферрина [208]. Между тем хорошо известно, что по набору аминокислот лактоферрины крупного рогатого скота и человека совпадают лишь на 67% [36]. Различия в первичной структуре этих белков обуславливают формирование у них разной вторичной и третичной структуры, что может определять их функциональные особенности [107]. Образующиеся при расщеплении лактоферринов крупного рогатого скота и человека лактоферрицины различны как по аминокислотному составу, так и по биологической активности [160]. Различия между лактоферринами имеются и в видовых особенностях гликозилирования [150], которое, как известно, существенно влияет на активность белка. Учитывая присутствие в кишечнике человека специфических к лактоферрину рецепторов [36], следует ожидать, что использование биотехнологического аналога лактоферрина человека в педиатрической практике может оказаться более выраженным в отношении проявления его биологической активности и эффективности связывания со

специфическими рецепторами, в том числе и в составе комплексных пробиотических препаратов.

В нашем исследовании было установлено, что на различные виды бифидобактерий лактоферрин оказывает неодинаковое влияние в зависимости от концентрации этого субстрата в клеточной культуре; это влияние может быть и ингибирующим, и мягко стимулирующим, и нейтральным. Так, в отношении *B. infantis* отмечен дозозависимый стимулирующий эффект Лф, в отношении *B. bifidum* – ингибирующий эффект больших концентраций и стимулирующий – малых. Выявленные различия связаны с разной аффинностью аналога человеческого лактоферрина для конкретных штаммов микроорганизмов, причем у других белков (в частности, альбумина коровьего молока) таких различий нет.

Особенно высоко чувствительны к концентрации лактоферрина виды *B. longum*, *B. infantis* и *B. bifidum*, тогда как *B. adolescentis* и *B. breve* такой способностью не обладают, что позволяет сделать заключение об избирательном пребиотическом действии исследуемого препарата лактоферрина.

В опытах с глубинным культивированием и методом предельных разведений в среде с добавлением данного белка конечный титр живых микроорганизмов оказался существенно выше при культивировании таких видов бифидобактерий, как *B. infantis*, *B. breve*, *B. bifidum* и *B. longum*. Эти виды микроорганизмов характерны для детей, находящихся на грудном вскармливании.

Возможность использования лактоферрина, обладающего бифидогенными и выраженными бактерицидными свойствами, для профилактики и лечения заболеваний у детей нуждается в дополнительном изучении, особенно в отношении механизма избирательного действия лактоферрина на различные микроорганизмы. Наше исследование во многом согласуется с исследованием, выполненным *in vitro* [88], которое показало избирательное действие анализируемых концентраций лактоферрина

различного происхождения (выделенного из коровьего и из женского молока) на конкретные виды и штаммы микроорганизмов, широко применяемых в педиатрической практике для профилактики дисбиотических нарушений.

Так, было установлено, что непастеризованное женское молоко содержало значительно более высокие уровни лактоферрина и приводило к лучшему ингибированию роста патогенных бактерий по сравнению со смесью и пастеризованным женским молоком. Лактоферрин человека оказался значительно более эффективным в подавлении роста бактерий по сравнению с лактоферрином крупного рогатого скота. Добавление человеческого лактоферрина в любом количестве или высокой дозы коровьего лактоферрина ингибировало рост пробиотического штамма *V. breve* M-16V в пастеризованном женском молоке.

Таким образом, можно сделать заключение о необходимости таргетного использования добавок биологически активных веществ и дальнейшего изучения препарата лактоферрина с целью определения персонифицированных показаний к его применению у детей с нарушениями начальных этапов формирования микробиоты.

В качестве популяции пациентов, потенциально нуждающихся в поиске новых пребиотических субстратов, корректирующих нарушения микробиоты, нами были обследованы дети первых восьми месяцев жизни (500 дней онтогенеза, начиная с внутриутробного периода) с начальными проявлениями аллергических заболеваний.

Данные публикаций об участии лактоферрина в ингибировании или, напротив, индукции аллергических реакций противоречивы. Так, сообщается о значительно более высокой концентрации лактоферрина в грудном молоке матерей (на 5-й день после родов), дети которых впоследствии имели проявления атопии; причем в двухлетнем возрасте аллергические реакции выявлялись только у тех детей, матери которых имели очень высокий уровень лактоферрина (306 мкг/мл) или сочетание повышенной

концентрации лактоферрина и интерлейкина-17 [22]. Некоторые исследователи признают лактоферрин коровьего молока одним из основных этиологических факторов развития аллергии к белкам коровьего молока [148]. В экспериментальном исследовании установлено, что лактоферрин человека (коммерческая добавка) может вызвать поражение дыхательных путей у мышей по типу бронхиальной астмы [195].

В то же время, многие исследования, напротив, свидетельствуют о профилактической и лечебной роли лактоферрина в отношении развития аллергических реакций. Так, было установлено, что пищевая добавка из коровьего молока, содержащая лактоферрин и иммуноглобулин, улучшает состояние кожи, оцениваемое по шкалам SCORAD и DLQI [211]. Выполнены работы, демонстрирующие, что лактоферрин ингибирует вызванное аллергенами воспаление кожи, как в эксперименте, так и в клинике, что объясняется способностью лактоферрина снижать продукцию фактора некроза опухоли альфа [271]. Другим возможным патогенетическим механизмом антиаллергенного действия лактоферрина является его способность к индукции фагоцитарной активности, в частности при аллергии к токсинам *Staphylococcus aureus* [178]. Потенциальное антиаллергическое влияние рекомбинантного человеческого лактоферрина пока изучалось только в эксперименте. Так, установлено, что интраназальное введение этого препарата облегчало течение аллергического ринита у мышей, что авторы связывают со стимуляцией экспрессии эндогенного лактоферрина и изменением фенотипа Т-клеток [159].

Таким образом, возможные профилактические эффекты человеческого лактоферрина в отношении аллергии через индукцию индигенной микробиоты остаются недостаточно изученными, поэтому было необходимо оценить количественные и качественные изменения микробиоты у детей изучаемой популяции во взаимосвязи с характеристиками пищевой сенсibilизации.

При исследовании микробиоты у детей первых трех месяцев жизни у всех пациентов были выявлены разнонаправленные дисбиотические нарушения: снижение уровня бифидо- и в особенности лактобактерий, повышенное содержание условно-патогенных микробов (клебсиелла, протей, псевдомонады, лакто-негативная и гемолизующая кишечная палочка и золотистый стафилококк). Выявлены корреляции выраженности дисбиоза с отягощенностью аллергического анамнеза, оперативным родоразрешением, ранним искусственным вскармливанием с использованием смесей на основе коровьего и козьего молока. Таким образом, наши данные подтверждают оценку роли указанных факторов в современных публикациях [8,214,120]. Нами продемонстрирована значимая роль бактерий типа *Bacillota* в формировании пищевой толерантности – определено диссоциативное количественное и качественное содержание *Bacillota* в кишечной микробиоте пациентов – уменьшение обилия лактобактерий с количественным преобладанием клостридий. Результаты нашей работы показали, что состав микробиоты кишечника младенца является особенно уязвимым, при этом дизонтогении микробиоты могут способствовать развитию аллергии.

Таким образом, у всех детей с начальными проявлениями аллергии был выявлен дисбаланс в составе кишечной микробиоты: увеличение содержания условно-патогенных микроорганизмов – *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*, лакто-негативных и гемодизирующих *E. coli*, а также *Staphylococcus aureus* и *Clostridium spp.*; при снижении уровня индигенных бактерий (бифидо- и лактобактерий). Факторами, достоверно связанными с особенностями количественного и качественного состава микробиоты, оказались: отягощенность аллергического анамнеза, рождение путем кесарева сечения, раннее введение в питание ребенка смеси, содержащей БКМ, возраст матери старше 35 лет и масса тела ребенка при рождении.

Факторами, способствующими реализации аллергической предрасположенности у наших пациентов, явились особенности диеты беременных и кормящих матерей (наличие в ней высокоаллергенных

продуктов) и антибиотикотерапия, получаемая матерью до и после родов. Нами выявлено значимое повышение общего уровня IgE у детей с ранними проявлениями аллергии, а также установлены наиболее частые причинно-значимые аллергены по уровням специфических IgE – это белок коровьего молока и белок яйца, что сочетается с уменьшением уровней лактобацилл в составе кишечной микробиоты, нарастанием содержания в ней золотистого стафилококка и клостридий. Таким образом, дизонтогении кишечной микробиоты оказываются взаимосвязанными с характеристиками сенсibilизации детей при начальных проявлениях аллергии.

При повторном исследовании пациентов (после проведенной коррекции рационов питания) в возрасте 6-9 месяцев была отмечена диссоциация клинических и лабораторных данных: так, на фоне стихания клинических проявлений аллергии у части пациентов или отсутствия клинической динамики у других детей, отмечено нарастание частоты как выявления повышенного уровня общего IgE (42% в 6-9 мес против 14% в 3 месяца), так и частоты выявления детей со специфической сенсibilизацией (37% против 10%, соответственно). Наиболее часто выявлялась сенсibilизация к белкам яйца и коровьего молока; однако, в отличие от детей 3-х-месячного возраста, обнаружена также сенсibilизация к эпидермальным и респираторным аллергенам (кошка, береза) и к некоторым пищевым аллергенам, которые в питание детей не вводились (арахис, соя, киви, кунжут, пшеница). При этом, у детей с впервые выявленной в 6-9 месяцев аллергией в 3 месяца данные иммунологического исследования были отрицательными. Таким образом, расширение контактов младенцев с факторами окружающей среды, в том числе у детей, вскармливаемых грудью через особенности питания кормящей матери, способствует нарастанию частоты формирования сенсibilизации. Уровень сенсibilизации к большинству аллергенов у наших пациентов к 6-9 месяцам оценивался как низкий; умеренный и высокий уровень сенсibilизации установлены для белков яйца, арахиса, сои, кунжута; из непищевых аллергенов – для кошачьего утероглобина и пыльцы березы.

При повторном исследовании состава кишечной микробиоты у пациентов 6-9 месячного возраста более часто обнаруживался дефицит бифидобактерий, но реже выявлялся сниженный уровень лактобацилл. Отмечено более частое выделение клостридий, протей, лактозонегативной кишечной палочки и цитробактера при снижении обсемененности детей золотистым стафилококком, псевдомонадами и гемолизирующей кишечной палочкой. Сравнение наших данных со сведениями, представленными в литературе позволяет отметить различия в описании количественного и качественного состава микробиоты. Так, наши данные не подтверждают сведений о низком разнообразии микробиоты у детей с аллергией на БКМ [84,176]. Нами обнаружен повышенный уровень микроорганизмов рода клостридиум и у детей 3-х, и у детей 6-9 месяцев. Сведения о содержания этих микроорганизмов в микробиоте и их роли в развитии аллергии противоречивы: так, указывается на снижение их уровня из-за антагонизма с выделяемыми при аллергии бактериоидами и клебсиеллами [25,64,81]. С другой стороны, напротив, некоторые публикации связывают колонизацию клостридиями более высоким риском манифестации атопического дерматита и пищевой аллергии. Наши данные совпадают с представленными в зарубежных публикациях [98,34].

Снижение уровня индигенных микроорганизмов в микробиоте детей с аллергией описывается в публикациях, посвященных обоснованию применения пробиотических штаммов у этих пациентов [17,14,100]; таким образом наши данные подтверждают указанные характеристики микробиоты.

Отмеченная динамика изменения состава микробиоты у детей с аллергией в целом может быть охарактеризована как сохранение выраженности дисбиотических нарушений. При этом сохраняется дисгармоничность индигенной микробиоты на фоне еще не купированного аллергического процесса. Тем не менее важно снижение уровня контаминации такими условно-патогенными микроорганизмами как золотистый стафилококк и псевдомонады.

Мы не обнаружили в медицинской литературе сведений о корреляциях качественных характеристик сенсibilизации и дисбиотических нарушений микробиоты.

Специалистами иммунологами широко обсуждаются возможные механизмы участия отдельных представителей микробиоты в обеспечении толерантности к пищевым антигенам [85, 123, 185]. Поэтому связи изменений состава кишечной микробиоты с формированием пищевой сенсibilизации нуждаются в дальнейшем изучении.

Поскольку для оптимизации биоценоза организма ребенка, страдающего аллергией, важны естественные факторы индукции индигенных микроорганизмов (в том числе лактоферрин грудного молока), мы оценили возможный вклад грудного молока, получаемого ребенком во втором полугодии первого года жизни, в формирование состава микробиоты и обеспечение пищевой толерантности. У младенцев, находящихся на полном искусственном вскармливании, выявлен достоверный дефицит бифидобактерий и избыток клостридий в микробиоте, что подтверждает сохраняющуюся на данном этапе онтогенеза значимость протективных факторов грудного молока, в том числе лактоферрина.

Исследования отечественных и зарубежных специалистов свидетельствуют о перспективности использования препаратов лактоферрина не только для обогащения питания, предназначенного для здоровых детей [269,69,208], но и для диетотерапии пациентов с различными заболеваниями, в том числе аллергическими [6,22]. В указанных публикациях речь идет о генетически модифицированном лактоферрине, созданном на основе белка козьего молока и приближенным по своим свойствам к лактоферрину женского молока. Предполагается, что этот субстрат не будет обладать характерными для лактоферрина коровьего молока свойствами ксенобиотика и, следовательно, его можно будет апробировать для коррекции нарушений микробиоты у детей с аллергией.

ВЫВОДЫ

1. Концентрации лактоферрина в молозиве и зрелом грудном молоке женщин, родивших в срок и преждевременно, одинаково высоки. Уровни секреции лактоферрина в молоко у всех матерей снижаются в динамике лактации. У женщин, родивших в срок, в отличие от родивших преждевременно, это снижение статистически достоверно.

2. Установлена высокая концентрация лактоферрина в меконии доношенных и недоношенных младенцев, которая увеличивается в динамике неонатального периода. Нарастание уровня лактоферрина в фекалиях детей при снижении его концентрации в грудном молоке носит индивидуальный характер и связано как с увеличением возрастного объема получаемого ребенком грудного молока, так и с различной степенью нарушений кишечной микробиоты. Более высокие уровни фекального лактоферрина определены у детей, родившихся преждевременно. Концентрация лактоферрина в фекалиях доношенных детей, достигших возраста 1 месяца, достоверно связана с уровнем лактоферрина в зрелом молоке их матерей.

3. Содержание бифидо- и лактобактерий в фекалиях доношенных и недоношенных детей, находившихся на грудном вскармливании, к концу периода новорожденности достоверно увеличивается. У недоношенных детей в возрасте 3-х суток установлены достоверные корреляции между содержанием фекального лактоферрина, с одной стороны, и уровнями присутствия индигенных микроорганизмов в микробиоте, с другой, что свидетельствует о важной роли лактоферрина в формировании стартовой микробиоты у незрелых младенцев. У доношенных новорожденных имела место аналогичная тенденция зависимости уровня бифидо- и лактобактерий от содержания фекального лактоферрина.

4. В эксперименте *in vitro* обнаружено дивергентное воздействие аналога человеческого лактоферрина на различные виды микробов рода

бифидобактерий – в отношении *B.infantis* отмечен дозозависимый стимулирующий эффект, в отношении *B.bifidum* – ингибирующий эффект больших концентраций и стимулирующий – малых; что позволяет сделать вывод об избирательном пребиотическом эффекте аналога человеческого лактоферрина.

5. У детей с начальными проявлениями кожных и гастроинтестинальных аллергических реакций в возрасте 2-3 месяца выявлены дисбиотические нарушения: увеличение содержания условно-патогенных микроорганизмов семейства Enterobactriaceae, а также *S. aureus*, *Clostridium spp.* и *Pseudomonas spp.* при снижении уровня индигенных бактерий. Предикторами реализации пищевой сенсибилизации и клинических симптомов аллергической патологии, а также нарушений в составе микробиоты, являются факторы перинатального анамнеза (рождение путем кесаревого сечения, низкая масса тела при рождении, возраст матери старше 35 лет), раннее искусственное вскармливание, наличие высокоаллергенных продуктов в диете кормящих матерей. Дизонтогении кишечной микробиоты взаимосвязаны с профилями сенсибилизации младенцев.

6. При повторном обследовании детей с начальными проявлениями аллергии в возрасте 6-8 месяцев отмечено нарастание уровня сенсибилизации, расширение спектра выявленных аллергенов и увеличение частоты выявления специфических аллергенов, что связано с расширением контактов пациентов с окружающей средой, а также с особенностями их вскармливания и диетой кормящих матерей. При исследовании микробиоты на этом этапе выявлен более выраженный дефицит бифидобактерий, чем в возрасте детей 2-3 месяца. Обнаружено более частое выделение клостридий, протей, лактозонегативной кишечной палочки, энтерококков при снижении выделения псевдомонад и гемолизирующей кишечной палочки.

7. У младенцев в возрасте 6-8 месяцев, находящихся на полном искусственном вскармливании, выявлен достоверный дефицит бифидобактерий и избыток клостридий в кишечной микробиоте по

сравнению с детьми, получавшими в этом возрасте, наряду с молочными смесями и прикормом, грудное молоко. Это подтверждает сохраняющуюся сапогенетическую значимость протективных факторов грудного молока, в том числе лактоферрина.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется всемерная поддержка грудного вскармливания доношенных и недоношенных младенцев с первых часов жизни для обеспечения детей микробиото-протективными субстратами женского молока, прежде всего лактоферрином.
2. Контингентом новорожденных, наиболее нуждающимся в дотации лактоферрина, являются недоношенные дети, поскольку бифидогенные свойства лактоферрина способствуют оптимальному становлению микробиоты у них и снижению рисков нарушений постнатальной адаптации.
3. Определенные в ходе настоящего исследования уровни фекального лактоферрина у доношенных и недоношенных новорожденных, находящихся на грудном вскармливании, могут быть рекомендованы в качестве условных нормативов при оценке обеспеченности лактоферрином пациентов неонатальных стационаров.
4. У детей с наследственной предрасположенностью к аллергии рекомендована поддержка грудного вскармливания с первых часов жизни при соблюдении элиминационной диеты кормящими матерями. При появлении начальных признаков аллергического заболевания показано пролонгированное грудное вскармливание, продолжающееся после введения прикорма с целью обеспечения пациентов естественными протективными микробиота-модулирующими субстратами грудного молока.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

holoLf – гололактоферрин

apoLf – аполактоферрин

ЦНС – центральная нервная система

рчЛФ – рекомбинантный лактоферрин человека

Лф – лактоферрин

бЛф – лактоферрин из коровьего молока

ГВ – грудное вскармливание

bBSA – биотинилированный бычий сывороточный альбумин

КОЕ – колониеобразующая единица

БКМ – белки коровьего молока

IgE – иммуноглобулины E

IgA – иммуноглобулины A

ОШ – отношение шансов

ДИ – доверительный интервал

ААП – Американская Академия Педиатрии

Tregs – Регуляторные Т-клетки

КЦЖК – короткоцепочечные жирные кислоты

IL-10 – Интерлейкин 10

LRP – липопротеид низкой плотности

ASGPR – асиалогликопротеиновый рецептор

БАД – биологически активная добавка

EFSA – Европейское ведомство по безопасности пищевых продуктов

РФ – Российская Федерация

УЗИ – ультразвуковое исследование

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аллергология и иммунология. Практические рекомендации для педиатров / А.А. Алексеева, П.С. Аримова, Н.Г. Астафьева [и др.] // Практические рекомендации для педиатров Москва, – 2020.
2. Антимикробные, иммуномодулирующие и пребиотические свойства лактоферрина / И.Б. Бродский, В. М. Бондаренко, Н. Н. Томашевская [и др.] // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. — 2013. — Т.4 — С. 3 – 5.
3. Атопический дерматит. / А.А. Кубанов, Л.С. Намазова-Баранова, Р.М. Хаитов [и др.] // Российский аллергологический журнал. – 2021. – Т.18(3). – С. 44 – 92.
4. Беляева И.А. Моделирование протективных факторов грудного молока: нутритивное программирование здоровья ребенка. / И.А. Беляева, Е.П. Бомбардинова, Т.В. Турти, Е.А. Приходько // Вопросы современной педиатрии. – 2021. – Т.20(6). – С.492–498
5. Беляева, И.А. Введение прикорма как мера профилактики избыточного веса и ожирения у детей с позиций концепции "первых 1000 дней" / И.А. Беляева, Л.С. Намазова-Баранова, Т.В. Турти // Вопросы современной педиатрии. – 2020. – Т.19(3). – С. 220 – 227.
6. Бифидогенные свойства биотехнологического аналога лактоферрина человека. / И.Б. Бродский, А.В. Васильев, А.В. Копыченкова [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2017. – Т.14(3). – С.173 – 178.
7. Возможности использования лактоферрина человека в педиатрической практике / Т.Э. Боровик, Г.В. Яцык, Л.С. Намазова-Баранова [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2014; – Т1.3(4). – С.12–19.
8. Дизонтогении микробиоты кишечника у детей первых месяцев жизни как фактор формирования атопии. / И.А. Беляева, Е.П. Бомбардинова, Л.С.

Намазова-Баранова [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2019. – Т. 16(2) – С. 91 – 96.

9. Европейский стратегический форум по аллергическим болезням: определение приоритетов научных проблем и финансирования в отношении аллергии и бронхиальной астмы и необходимость трансляционных исследований / И. Агаче, И. Аннеси-Маэсано, А. Бонертц [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2019. – Т.16 (5). – С. 281 – 295.

10. Козарезова, А.М. Роль лактоферрина в оценке патологических состояний недоношенных новорожденных. / А.М. Козарезова, Н.Н. Климкович // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. – 2019; – Т9(6). – С.738 – 746.

11. Коррекция дисбиоза кожи как неотъемлемая составная часть патогенетической терапии атопического дерматита. / Ю.Г. Левина, А.А. Алексеева, К.Е. Эфендиева [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2019. – Т.16(2). – С. 97 – 100.

12. Место современных продуктов прикорма в критическом периоде формирования здоровья ребенка. / Т.В. Турти, И.А. Беляева, М.А. Сновская [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2018. – Т. 15(3). – С. 270 – 276.

13. Неолактоферрин как стимулятор врожденного и адаптивного иммунитета / А.Д. Черноусов, М.Ф. Никонова, Н.И. Шарова [и др.] // Acta Naturae. – 2013; – Т.5(4). – С. 78–84.

14. Онтогенез и дизонтогенез микробиоты кишечника у детей раннего возраста: триггерный механизм нарушений детского здоровья. / И.А. Беляева, Е.П. Бомбардинова, М.Д. Митиш [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2017. – Т. 16. (1) – С. 29 – 38.

15. Программа оптимизации вскармливания детей первого года жизни в Российской Федерации / А.А. Баранов, В.А. Тутельян, О.В. Чумакова [и др.] // – 2019.

16. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника: ОСТ 91500.11.0004 – 2003. Приказ Минздрава России № 231 от 09.06.03. – (Отраслевой стандарт)
17. Современные принципы ведения детей с пищевой аллергией. / А.А. Баранов, Л.С.Намазова-Баранова, Р.М.Хайтов [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2021 – Т.18(3) – С.245 – 263.
18. Турти, Т.В. Функциональные свойства современных продуктов прикорма. / Т.В. Турти, Л.С. Намазова-Баранова, И.А. Беляева, Е.А. Бакович // Педиатрическая фармакология. – 2020. – Т. 17. (2). – С. 129 – 136.
19. Якубовская, Р. И. Препарат лапрот в терапии гнойно – воспалительных послеоперационных осложнений: медицинская технология // Федеральное гос. учреждение "Московский науч. – исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена Федерального агентства по высокотехнологичной мед. помощи". – Москва: ФГОУ "МНИОИ им. П. А. Герцена Росмедтехнологий", – 2008. – 14 с.; 21 см.
20. A compromised developmental trajectory of the infant gut microbiome and metabolome in atopic eczema. / L.D.H. Ta, J.C.Y. Chan, G.C. Yap [и др.] // Gut Microbes. – 2020. – V.12. – P.1801964.
21. A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis. / M. Noval Rivas, OT Burton, P Wise [и др.] // J Allergy Clin Immunol. – 2013. – V.131(1). – P.201 – 12.
22. A possible role of elevated breast milk lactoferrin and the cytokine IL – 17 levels in predicting early allergy in infants: A pilot study. / E. Polonkai, E. Gyimesi, I. Kovács [и др.] // Acta Aliment. – 2015. – V.45(2). – P.157–162.
23. A randomised phase IIb trial to assess the efficacy of ReCharge ice cream in preventing chemotherapy – induced diarrhoea. // Support Care Cancer. – 2015
24. A synbiotic – containing amino – acid – based formula improves gut microbiota in non – IgE – mediated allergic infants. / D.C.A. Candy, M.T.J. Van Ampting, M.M. Oude Nijhuis [и др.] // Pediatr. Res. – 2017. – V.83. – P.677–686.

25. Aberrant structures of fecal bacterial community in allergic infants profiled by 16S rRNA gene pyrosequencing. / J. Nakayama, T. Kobayashi, S. Tanaka [и др.] // FEMS Immunol Med Microbiol. – 2011. – V.63(3). – P.397 – 406.
26. Abril, A.G. Gut Microbiome Proteomics in Food Allergies. / A.G. Abril, M. Carrera, Á. Sánchez – Pérez, TG. Villa. // Int J Mol Sci. – 2023. – V.24(3). – P.2234.
27. Activation of intestinal mucosal immunity in tumor – bearing mice by lactoferrin / W.P. Wang, M. Iigo, J. Sato [и др.] // Jpn J Cancer Res. – 2000. – V.91(10). –P.1022–1027.
28. Actor, J.K. Lactoferrin as a natural immune modulator / J.K. Actor, S.A. Hwang, M.L. Kruzel // Curr Pharm Des. – 2009. – V.15 (17). – P. 1956 – 1973.
29. Adak, A. An insight into gut microbiota and its functionalities. / A. Adak, MR. Khan // Cell Mol Life Sci. – 2019. – V.76(3). – P.473 – 493.
30. Administration of oral and vaginal prebiotic lactoferrin for a woman with a refractory vaginitis recurring preterm delivery: appearance of lactobacillus in vaginal flora followed by term delivery. / K. Otsuki, M. Tokunaka, T. Oba [и др.] // J Obstet Gynaecol Res. – 2014. – V.40(2). – P.583–585.
31. Agosti, M. Nutritional and metabolic programming during the first thousand days of life. / M. Agosti, F. Tandoi, L. Morlacchi, A. Bossi // Pediatr Med Chir. – 2017. – V.39(2). – P.157.
32. Albuhaire, S. Biologics and Novel Therapies for Food Allergy. / S. Albuhaire, R. Rachid // Immunol. Allergy Clin. N. Am. – 2021. – V.41. – P.271–283.
33. Alteration of the N – glycome of bovine milk glycoproteins during early lactation. / S. Takimori, H. Shimaoka, J. Furukawa [и др.] // FEBS J. – 2011. – V.278. – P.3769–3781.
34. Alterations in the gut microbiotas of children with food sensitization in early life. / C.C. Chen, KJ Chen, MS Kong [и др.] // Pediatr Allergy Immunol. – 2016. – V.27(3). – P.254 – 262.

35. Aly, E. Structure and Functions of Lactoferrin as Ingredient in Infant Formulas. / E. Aly, G. Ros, C. Frontela // *J Food Res* – 2013. – V.2(4). – P.25.
36. Analysis of human and bovine milk lactoferrins by Rotofor and chromatofocusing. / K. Shimazaki, A. Kawaguchi, T. Sato [и др.] // *Int J Biochem.* – 1993. – V.25(11). – P.1653–1658.
37. Analysis of the infant gut microbiome reveals metabolic functional roles associated with healthy infants and infants with atopic dermatitis using metaproteomics. / A. Kingkaw, M. Nakphaichit, N. Suratannon [и др.] // *PeerJ.* – 2020. – V.8. – E.9988.
38. Arnold, R.R. A bactericidal effect for human lactoferrin. / R.R. Arnold, M.F. Cole, J.R. McGhee // *Science.* – 1977. – V.197. – P.263–265.
39. Arnold, R.R. Bactericidal activity of human lactoferrin: Influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism. / R.R. Arnold, J.E. Russell, W.J. Champion, J.J. Gauthier // *Infect. Immun.* – 1981. – V.32. – P.655–660.
40. Arpaia, N. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T cell generation. / N. Arpaia, C. Campbell // *Nature* – 2013. – V.504. – P.451–455.
41. Association between breast feeding and asthma in 6 year old children: findings of a prospective birth cohort study. / W. H. Oddy, P. G. Holt, P. D. Sly [и др.] // *BMJ* – 1999. – V.319(7213). – P.815–819.
42. Bactericidal activity of human lactoferrin: Differentiation from the stasis of iron deprivation. / R.R. Arnold, J.E. Russell, W.J. Champion [и др.] // *Infect. Immun.* – 1982. – V.35. – P.792–799.
43. Baker, H.M. A structural perspective on lactoferrin function. / H.M. Baker, E.N. Baker // *Biochem. Cell Biol.* – 2012. – V.90. – P.320–328.
44. Balmer, S.E. Diet and faecal flora in the newborn: lactoferrin. / S.E. Balmer, PH Scott, BA Wharton // *Arch Dis Child* – 1989. – V.64. – P.1685–1690
45. Berni Canani, R. Extensively hydrolyzed casein formula containing *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces the occurrence of other allergic

manifestations in children with cow's milk allergy: 3 – year randomized controlled trial. / R. Berni Canani, M. Di Costanzo // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2017. – V.139. – P.1906–1913.

46. Berni Canani, R. The role of the commensal microbiota in the regulation of tolerance to dietary antigens. / R. Berni Canani, Gilbert, J.A. // *Curr.Opin.AllergyClin. Immunol.* – 2015. – V.15. – P.243–249.

47. Berthon, B.S. Effect of Lactoferrin Supplementation on Inflammation, Immune Function, and Prevention of Respiratory Tract Infections in Humans: A Systematic Review and Meta – analysis. / B.S. Berthon, LM Williams, EJ Williams, LG. Wood // *Adv Nutr.* – 2022. – V.13(5). – P.1799 – 1819.

48. Biophysical characterization of lipopolysaccharide and lipid A inactivation by lactoferrin. / K. Brandenburg, G. Jürgens, M. Müller [и др.] // *Biol. Chem.* – 2001. – V.382. – P.1215–1225.

49. Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. / L. Bode // *Glycobiology.* – 2012. – V.22. – P.1147–62.

50. Bollard, O. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. / O. Bollard, AL Marrow // *Pediatr Clin North Am* – 2013. – V. 60. – P.49–74;

51. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. / M. Tomita, H. Wakabayashi, K. Yamauchi [и др.] // *Biochem Cell Biol.* – 2002. – V.80(1). – P.109 – 12.

52. Bovine lactoferrin enhances the efficacy of levofloxacin – based triple therapy as first – line treatment of *Helicobacter pylori* infection: An in vitro and in vivo study / A.F. Ciccaglione, M. Di Giulio, S. Di Lodovico [и др.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2019. – V.74(4). – P.1069–1077.

53. Breast feeding and lower respiratory tract illness in the first year of life. / A. L. Wright, C.J. Holberg, F.D. Martinez [и др.] // *Group Health Medical Associates. BMJ (Clinical Research Ed.)*, – 1989. – V.299(6705). – P.946–949.

54. Burden and socioeconomics of asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis and food allergy. / B.J.H. Dierick, T. van der Molen, BMJ Flokstra – de Blok [и др.] // *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* – 2020. – V.20(5). – P.437 – 453.

55. Butyrate as a bioactive human milk protective component against food allergy. / L. Paparo, R. Nocerino, E Ciaglia [и др.] // *Allergy*. – 2021. – V.76. – P.1398–415.
56. Cacho, N.T. Innate immunity and breast milk. / N.T.Cacho, RM. Lawrence // *Front Immunol*. – 2017. – V.8. – P.584.
57. Carr L.E. Role of Human Milk Bioactives on Infants'; Gut and Immune Health. / Virmani MD, Rosa F [и др.] // *Front Immunol*. – 2021. – V.12. – E.604080.
58. Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation. / P. Montagne, ML Cuillière, C Molé [и др.] // *Adv Exp Med Biol*. – 2001. – V.501. – P.241 – 7.
59. Changes in Lactoferrin Concentrations in Human Milk: A Global Systematic Review. / D. Rai, AS. Adelman, W. Zhuang [и др.] // *Crit Rev Food Sci Nutr*. – 2014. – V.54. – P.1539–1547.
60. Characterization of goat milk lactoferrin N – glycans and comparison with the N – glycomes of human and bovine milk. / A. Le Parc, DC. Dallas, S. Duaut [и др.] // *Electrophoresis*. – 2014. – V.35(11). – P.1560 – 70.
61. Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. / K. M. Hunt, J. A. Foster, L. J. Forney [и др.] // *PLOS ONE* – 2011. – V.6(6). – E.21313.
62. Chen, P.W. Antimicrobial potential for the combination of bovine lactoferrin or its hydrolysate with lactoferrin – resistant probiotics against foodborne pathogens. / P.W. Chen, T.T. Jheng, C.L. Shyu, F.C. Mao // *J. Dairy Sci*. – 2013. – V.96. – P.1438–1446.
63. Chen, P.W. Synergistic antibacterial efficacies of the combination of bovine lactoferrin or its hydrolysate with probiotic secretion in curbing the growth of meticillin – resistant *Staphylococcus aureus*. / P.W. Chen, T.T. Jheng, C.L. Shyu, F.C. Mao // *J. Med. Microbiol*. – 2013. – V.62. – P.1845–1851.

64. Child Study Investigators. Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life. / M.B. Azad, T. Konya, DS Guttman [и др.] // *Clin Exp Allergy*. – 2015. – V.45(3). – P.632 – 43.
65. Choi, H. Linking childhood allergic asthma phenotypes with endotype through integrated systems biology: Current evidence and research needs. / H. Choi, W.M. Song, B. Zhang // *Rev. Environ. Health*. – 2017. – V.32. – P.55–63.
66. Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. / A.T. Stefka, T. Feehley, P. Tripathi [и др.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2014. – V.111(36). – P.13145 – 50.
67. Commensal microbe – derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. / Y. Furusawa, Y. Obata, S. Fukuda [и др.] // *Nature*. – 2013. – V.504(7480). – P.446 – 50.
68. Comstock, S.S. Dietary bovine lactoferrin alters mucosal and systemic immune cell responses in neonatal piglets / S.S. Comstock, E.A. Reznikov, N. Contractor, S.M. Donovan // *JNutr*. – 2014. – V.144(4). – P.525 – 32.
69. Conesa, C. Recombinant human lactoferrin: a valuable protein for pharmaceutical products and functional foods. / C. Conesa, M. Calvo, L. Sánchez // *Biotechnol Adv*. – 2010. – V.28(6). – P.831 – 838.
70. Coppola, S. The potential role of preventive and therapeutic immunonutrition strategies for pediatric food allergy: A mini – review. / S. Coppola, L. Carucci, R. De Michele, R. Berni Canani // *Front Nutr*. – 2022. – V.2. – E.1050554.
71. Correlation between lactoferrin and beneficial microbiota in breast milk and infant’s feces. / P. Mastromarino, D Capobianco, G Campagna [и др.] // *Biometals*. – 2014. – V.27(5). – P.1077 – 86.
72. Current insights on early life nutrition and prevention of allergy. / G. Ferrante, M. Carta, C. Montante [и др.] // *Front Pediatr*. – 2020. – V.8. – P.448.
73. Davis, E.C. Gut microbiome in the first 1000 days and risk for childhood food allergy. / E.C. Davis, C Monaco, R Insel, K.M. Järvinen // *Ann Allergy Asthma Immunol*. – 2024, – V15. – P.1081 – 1206

74. Development of the preterm infant gut microbiome: a research priority. / M.W. Groer, AA Luciano, LJ Dishaw [и др.] // *Microbiome* – 2014. – V.2. – P.38.
75. Dierick, M. Minireview: Lactoferrin, a versatile natural antimicrobial glycoprotein which modulates host innate immunity / M. Dierick, D. Vanrompay, B. Devriendt, E. Cox // *Biochem Cell Biol.* – 2021. – V.99 (1). – P.61 – 65.
76. Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. / K.S. Kim, SW Hong, D. Han [и др.] // *Science.* – 2016. – V.351(6275). – P.858 – 63.
77. Dietary supplementation with bovine lactoferrampin – lactoferricin produced by *Pichia pastoris* fed – batch fermentation affects intestinal microflora in weaned piglets. / X.S. Tang, H. Shao, T.J. Li [и др.] // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2012. – V.168. – P.887–898.
78. Differences in innate immune function between allergic and nonallergic children: new insights into immune ontogeny. / M.K. Tulic, M. Hodder, A. Forsberg [и др.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2011. – V.127(2). – P.470 – 478.
79. Domínguez, O. Relationship Between Atopic Dermatitis and Food Allergy. / O. Domínguez, AM Plaza, M. Alvaro // *Curr Pediatr Rev.* – 2020. – V.16(2). – P.115 – 122.
80. Duijts, L. Breastfeeding protects against infectious diseases during infancy in industrialized countries. A systematic review. / L. Duijts, M. K. Ramadhani, H. A. Moll // *Maternal & Child Nutrition* – 2009. – V.5(3). – P.199–210.
81. Duncan, S.H. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. / S.H. Duncan, P. Louis // *Environ. Microbiol.* – 2009. – V.11. – P.2112–2122.
82. Dynamics of the preterm gut microbiome in health and disease. / A. Cuna, MJ Morowitz, I Ahmed [и др.] // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2021. – V.320(4). – P.411 – 419.
83. Early – life gut microbiome composition and milk allergy resolution. / S. Bunyavanich, N. Shen, A. Grishin [и др.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2016. – V.138(4). – P.1122 – 1130.

84. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. / M.C. Arrieta, L.T. Stiemsma, P.A. Dimitriu [и др.] // *Sci. Transl. Med.* – 2015. – V.7. – P.307.
85. Eberl, G. Immunity by equilibrium. / G. Eberl // *Nat Rev Immunol.* – 2016. – V.16(8). – P.524 – 32.
86. Effect of bovine lactoferrin addition to milk in yogurt manufacturing. / I. Franco, E. Castillo, MD Pérez [и др.] // *J Dairy Sci.* – 2010. – V.93(10). – P.4480 – 9.
87. Effect of lactoferrin on enteroaggregative *E. coli* (EAEC) / T.J. Ochoa, E.L. Brown, C.E. Guion [и др.] // *Biochem. Cell Biol.* – 2006. – V.84. – P.369–376.
88. Effects of lactoferrin on neonatal pathogens and *Bifidobacterium breve* in human breast milk. / T. Woodman, T. Strunk, S. Patole [и др.] // *PLoS One.* – 2018. – V.13(8). – E.0201819.
89. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on bovine lactoferrin. // *EFSA Journal* – 2012. – V.10(7). – P.2811.
90. Elazab, N. Probiotic administration in early life, atopy, and asthma: A meta – analysis of clinical trials. / N. Elazab, A. Mendy // *Pediatrics.* – 2013. – V.132. – P.666–676.
91. Endo – beta – N – acetylglucosaminidases from infant gut – associated bifidobacteria release complex N – glycans from human milk glycoproteins. / D. Garrido, C. Nwosu, S. Ruiz – Moyano [и др.] // *Mol. Cell. Proteom.* – 2012. – V.11. – P.775–785.
92. Enhanced Th1 response to *Staphylococcus aureus* infection in human lactoferrin – transgenic mice / C. Guillen, I.B. McInnes, D.M. Vaughan [и др.] // *J Immunol.* – 2002. – V.168(8). – P.3950 – 3957.
93. Enigk, K. Activity of five antimicrobial peptides against periodontal as well as non – periodontal pathogenic strains / K. Enigk, H. Jentsch, A.C. Rodloff, K. Eschrich, C. – S. Stingu // *J Oral Microbiol.* – 2020. – V.12 (1). – E. 1829405
94. Epigenetic regulation of early nutrition on immune system. In: Preedy VR, Patel VB, editors. / L. Paparo, R. Aitoro, R. Nocerino [и др.] // *Handbook of*

- Nutrition, Diet, and Epigenetics Cham: Springer International Publishing AG; – 2018) – . – V.10. – P.1007
95. Epithelial barrier hypothesis: Effect of the external exposome on the microbiome and epithelial barriers in allergic disease. / Z. Celebi Sozener, B. Ozdel Ozturk, P. Cerci [и др.] // *Allergy*. – 2022. – V.77(5). – P.1418 – 1449.
96. Esch BCAM. The Impact of Milk and Its Components on Epigenetic Programming of Immune Function in Early Life and Beyond: Implications for Allergy and Asthma. / Porbahaie M, Abbring S [и др.] // *Front Immunol*. – 2020. – V.11. – P.2141.
97. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. / S. Arboleya, A. Binetti, N. Salazar [и др.] // *FEMS Microbiol. Ecol*. – 2012. – V.79. – P.763–772.
98. Establishment of the intestinal microbiota and its role for atopic dermatitis in early childhood. / J. Penders, K. Gerhold, EE. Stobberingh [и др.] // *J Allergy Clin Immunol*. – 2013. – V.132(3). – P.601 – 607.
99. Exclusive breast – feeding for at least 4 months protects against otitis media. / B. Duncan, J. Ey, C. J. Holberg [и др.] // *Pediatrics* – 1993. – V.91(5). – P.867–872.
100. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. / C. Hill, F. Guarner, G. Reid [и др.] // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. – 2014. – V.11(8). – P.506 – 14.
101. Exploring the Potential of Human Milk and Formula Milk on Infants'; Gut and Health. / H.Y. Chong, LT Tan, JW Law [и др.] // *Nutrients*. – 2022. – V.14(17). – E.3554.
102. Factors affecting early – life intestinal microbiota development. / Y. Vandenplas, VP. Carnielli, J. Ksiazuk [и др.] // *Nutrition*. – 2020. – V.78. – E.110812.

103. Farnaud, S. Lactoferrin: a multifunctional protein with antimicrobial properties / S. Farnaud, R.W. Evans // *Mol Immunol.* – 2003. – V.40(7). – P.395–405.
104. 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. – V.8. – P.2.
105. Fiocchi, A. Current Use of Probiotics and Prebiotics in Allergy / A. Fiocchi, MD Cabana, M. Mennini // *J Allergy Clin Immunol Pract* – 2022. – V.10(9). – P.2219 – 2242.
106. Gallego G.C. Functional compounds in breast milk. / Pérez Conesa, D., Bernal Cava, MJ., Periago Castón, MJ., Ros Berruezo, G. // *Enfermería Global.* – 2009. – V.16.
107. Garcia – Montoya, I.A. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. / I.A. Garcia – Montoya, TS Cendon, S Arevalo – Gallegos, Q. RasconCruz // *Biochim Biophys Acta.* – 2012. – V.1820(3). – P.226–236.
108. Genuneit, J. Epidemiology of Allergy: Natural Course and Risk Factors of Allergic Diseases. / J. Genuneit, M. Standl // *Handb Exp Pharmacol.* – 2022. – V.268. – P.21 – 27
109. Geuking, M.B. Metabolites from intestinal microbes shape Treg. / M.B. Geuking, K.D. McCoy // *Cell Res* – 2013. – V.23. – P.1339–1340.
110. Ghadimi, D. Epigenetic imprinting by commensal probiotics inhibits the IL–23/IL–17 axis in a vitro model of the intestinal mucosal immune system. / D. Ghadimi, U. Helwig, J. Schrezenmeir, KJ Heller, M. de Vrese // *J Leukoc Biol.* – 2012. – V.92. – P.895–911.
111. Gibbons, J. Iron – free and iron – saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer. / J. Gibbons, J.R. Kanwar, R.K. Kanwar // *BMC Canc.* – 2015. – V.15. – P.425.
112. Gifford J.L. Lactoferricin: a lactoferrin – derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties / J.L. Gifford, H.N. Hunter, H.J. Vogel // *Cell Mol Life Sci.* – 2005. – V.62(22). – P.2588 – 2598.

113. Goldman, I. Application potential of recombinant human lactoferrin in antibiotic – resistant infection control. In: Recent advances in clinical medicine. / I. Goldman, A. Chernousov, E. Sadchikova // Proceedings of the International Conference on Medical Pharmacology (PHARMACOLOGY '10). – 2010. – P.315–321
114. Gonzalez – Visiedo, M. Manipulating the microbiome to enhance oral tolerance in food allergy. / M. Gonzalez – Visiedo, M.D. Kulis, D.M. Markusic // Cell Immunol. – 2022. – V.82. – E.104633.
115. Gopalakrishna, K.P. Influence of Maternal Milk on the Neonatal Intestinal Microbiome. / K.P. Gopalakrishna, TW. Hand // Nutrients. – 2020. – V.12(3) – P.823 – 825.
116. Grimshaw, K.E. Diet and food allergy development during infancy: Birth cohort study findings using prospective food diary data. / K.E. Grimshaw, J. Maskell // J. Allergy Clin. Immunol. – 2014. – V.133. – P.511–519.
117. Groves, M.L. The isolation of a red protein from milk / M.L. Groves // J Am Chem Soc. – 1960. – V.82. – P.3345–3350.
118. Growth – promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. / W.S. Kim, M. Ohashi, T. Tanaka [и др.] // Biometals. – 2004. – V.17. – P.279–283.
119. Gut microbiome and innate immune response patterns in I g E – associated eczema. / C.E. West, P. Rydén, D. Lundin [и др.] // Clin. Exp. Allergy. – 2015. – V.45. – P.1419–1429.
120. Gut Microbiota as a Target for Preventive and Therapeutic Intervention against Food Allergy. / R. Aitoro, L. Paparo, A. Amoroso [и др.] // Nutrients. – 2017. – V.9(7). – P.672.
121. Hao, L. Lactoferrin: major physiological functions and applications / L. Hao, Q. Shan, J. Wei, F. Ma, P. Sun // Curr Protein Pept Sci. – 2019. – V.20(2). – P.139 – 144.
122. Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans. Characterization of α – D – Galp – (1 3) – β – D – Gal – and α – NeuAc – (2 6) – β – D – GalpNAc – (1 4) – β

- D – GlcNAc – substituted N – linked glycans. / B. Coddeville, G. Strecker, J.M. Wieruszeski [и др.] // *Carbohydr.Res.* – 1992. – V.236. – P.145–164.
123. High levels of butyrate and propionate in early life are associated with protection against atopy. / C. Roduit, R. Frei, R. Ferstl [и др.] // *Allergy.* – 2019. – V.74. – P.799–809.
124. Hol, J. The acquisition of tolerance toward cow’s milk through probiotic supplementation: A randomized, controlled trial. / J. Hol, E.H. van Leer // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2008. – V.121. – P.1448–1454.
125. Hornef, M.W. ‘Layered immunity’ and the ‘neonatal window of opportunity’ – timed succession of non – redundant phases to establish mucosal host–microbial homeostasis after birth. / M.W. Hornef, N. Torow // *Immunology.* – 2020. – V.159(1). – P.15 – 25.
126. Hörnell, A. Infant feeding – a scoping review for Nordic Nutrition Recommendations 2023. / A. Hörnell, H. Lagström // *Food Nutr Res.* – 2024 – V5. – P.68.
127. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. / M.C. Collado, S. Rautava, J. Aakko [и др.] // *Sci Rep* – 2016. – V.6. – E.23129
128. Human lactoferrin interacts with soluble CD14 and inhibits expression of endothelial adhesion molecules, E – selectin and ICAM – 1, induced by the CD14 – lipopolysaccharide complex / S. Baveye, E. Ellass, D.G. Fernig [и др.] // *Infect Immun.* – 2000. – V.68 (12). – P.6519–6525.
129. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. / H. Curtis, G. Dirk, K. Rob [и др.] // *Nature.* – 2012. – V.486. – P.207–214.
130. Human milk and mucosa – associated disaccharides impact on cultured infant fecal microbiota. / A. Rubio – del – Campo, C. Alcántara, M.C. Collado [и др.] // *Sci. Rep.* – 2020. – V.10. – P.11845.

131. Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves Haemophilus surface proteins at arginine – rich sites. / D.R. Hendrixson, J. Qiu, S.C. Shewry [и др.] // Mol. Microbiol. – 2003. – V.47. – P.607–617.
132. Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. / C. Liepke, K. Adermann, M. Raida [и др.] // Eur J Biochem. – 2002. – V.269(2). – P.712 – 8.
133. Hung, H.C. Meta – analysis of the effect of scaling and root planing, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss / H.C. Hung, C.W. Douglass // J Clin Periodontol. – 2002. – V.29(11). – P.975–986.
134. Hwang, P.M. Three – dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. / P.M. Hwang, N. Zhou, X. Shan, C.H. Arrowsmith, H.J. Vogel // Biochemistry. – 1998. – V.37. – P.4288–4298.
135. Hwang, S.A. Lactoferrin modulation of IL – 12 and IL – 10 response from activated murine leukocytes / S.A. Hwang, K.M. Wilk, Y.A. Bangale, J.K. Actor // Med Microbiol Immunol. – 2007. – V.196(3). – P.171 – 180.
136. Ihekweazu, F.D. Development of the pediatric gut microbiome: Impact on health and disease. / F.D. Ihekweazu, J. Versalovic // Am. J. Med. Sci. – 2018. – V.356. – P.413–423.
137. Impact of breast feeding on admission for pneumonia during postneonatal period in Brazil: Nested case – control study. / J. A. César, C. G. Victora, F. C. Barros [и др.] // BMJ (Clinical Research Ed.) – 1999. – V.318(7194). – P.1316–1320.
138. Impact of delivery mode – associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. / M. Reyman M.A. van Houten, D. van Baarle [и др.] // Nat. Commun. – 2019. – V.10. – P.4997.
139. Impact of intrapartum and postnatal antibiotics on the gut microbiome and emergence of antimicrobial resistance in infants. / T. Tapiainen, P. Koivusaari, L. Brinkas [и др.] // Sci. Rep. – 2019. – V.9. – P.10635.

140. Influence of infant diets on the ecology of the intestinal tract of human flora – associated mice. / D.J. Hentges, WW. Marsh, BW. Petschow [и др.] // *J Pediatr Gastroenterol Nutr* – 1992. – V.14. – P.146–152
141. Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta – analysis. / M. Pammi, J. Cope, PI. Tarr [и др.] // *Microbiome* – 2017. – V.5. – P.31.
142. Intestinal microbiota – derived short – chain fatty acids regulation of immune cell IL – 22 production and gut immunity. / W. Yang, T. Yu, X. Huang [и др.] // *Nat Commun.* – 2020. – V.11(1). – P.4457.
143. Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. / S. Arboleya, B. Sanchez, C. Milani [и др.] // *J Pediatr* – 2015. – V.166. – P.538–544.
144. Intestinal Microbiota in Early Life and Its Implications on Childhood Health. / L. Zhuang, H. Chen, S. Zhang [и др.] // *Genomics Proteomics Bioinformatics.* – 2019. – V.17(1). – P.13 – 25.
145. Iron metabolism in infants: influence of bovine lactoferrin from iron – fortified formula. / C. Ke, Z. Lan, L. Hua [и др.] // *Nutrition.* – 2015. – V.31(2). – P.304 – 9.
146. Isolation of a bifidogenic peptide from the pepsin hydrolysate of bovine lactoferrin. / H. Oda, H. Wakabayashi, K. Yamauchi [и др.] // *Appl Environ Microbiol.* – 2013. – V.79(6). – P.1843 – 9.
147. It's Alive: Microbes and Cells in Human Milk and Their Potential Benefits to Mother and Infant. / L. Bode, M. McGuire, P. Rodriguez [и др.] // *Advances in Nutrition* – 2014. – V.5(5). – P.571–573.
-
148. Jaiswal, L. Recent perspective on cow's milk allergy and dairy nutrition. / L. Jaiswal, M. Worku // *Crit Rev Food Sci Nutr.* – 2022. – V.62(27). – P.7503 – 7517.
149. Jenssen, H. Antimicrobial properties of lactoferrin. / H. Jenssen, R.E. Hancock // *Biochimie.* – 2009. – P.91. – V.19–29.

150. Jiang, R. Comparison of bioactivities of talactoferrin and lactoferrins from human and bovine milk. / R. Jiang, X. Du, B. J. Lonnerdal // *Pediatr Gastroenterol Nutr.* – 2014. – P.59(5). – V.642–652.
151. Johansson, B. Isolation of an iron – containing red protein from human milk. / B. Johansson // *Acta Chem Scand.* – 1960. – V14. – P.510–512.
152. Johnson, A.M.F. Window – of – opportunity: neonatal gut microbiota and atopy. / A.M.F. Johnson, RW. DePaolo // *Hepatobiliary Surg Nutr.* – 2017. – V.6(3). – P.190 – 192.
153. Karlsson, H. Pattern of cytokine responses to Gram–positive and Gram–Negative commensal bacteria is profoundly changed when monocytes differentiate into dendritic cells. / H. Karlsson, P Larsson, AE. Wold, A. Rudin // *Infect Immun.* – 2004. – V.72. – P.2671–8.
154. Kell, D.B. The biology of lactoferrin, an iron – binding protein that can help defend against viruses and bacteria. / D.B. Kell, EL Heyden, E. Pretorius // *Front Immunol* – 2020. – V.11. – P.1221.
155. Kim, W.S. Comparison of Growth Promoting Effects on Bifidobacterium spp. by Bovine Lactoferrin Hydrolysates. / W.S. Kim, M. Rahman, H. Kumura, K..Shimazaki // *Biosci Microflora.* – 2005. – V.24(4). – P.119 – 123
156. Kuhara, T. Oral administration of lactoferrin increases NK cell activity in mice via increased production of IL – 18 and type I IFN in the small intestine / T. Kuhara, K. Yamauchi, Y. Tamura, H. Okamura // *J Interferon Cytokine Res.* – 2006. – V.26 (7). – P.489 – 499.
157. Label – free proteomic analysis reveals differentially expressed Wolbachia proteins in *Tyrophagus putrescentiae*: Mite allergens and markers reflecting population – related proteome differences. / T. Erban, P.B. Klimov, K. Harant [и др.] // *Proteom.* – 2021. – V.249. – E.104356.
158. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. / M. Mohamadzadeh, S. Olson, WV. Kalina [и др.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2005. – V.102. – P.2880–5.

159. Lactoferrin administration into the nostril alleviates murine allergic rhinitis and its mechanisms. / S.B. Wang, YQ Deng, J. Ren [и др.] // *Scand J Immunol.* – 2013. – V.78(6). – P.507 – 15.
160. Lactoferrin and cancer disease prevention. / L. Rodrigues, J. Teixeira, F. Schmitt [и др.] // *Crit Rev Food Sci Nutr.* – 2009. – V.49(3). – P.203–217.
161. Lactoferrin and oral diseases: Current status and perspective in periodontitis / F. Berlutti, A. Pilloni, M. Pietropaoli [и др.] // *Ann Stomatol (Roma).* – 2011. – V.2(3–4). – P.10–18.
162. Lactoferrin and oral pathologies: a therapeutic treatment / L. Rosa, M.S.Lepanto, A. Cutone [и др.] // *Biochem Cell Biol.* – 2021. – V.99 (1). – P.81 – 90.
163. Lactoferrin down – regulates the LPS – induced cytokine production in monocytic cells via NF – KB / L. Haversen, B.G. Ohlsson, M. Hahn – Zoric [и др.] // *Cell Immunol.* – 2002. – V.220(2). – P.83–95.
164. Lactoferrin for prevention of neonatal sepsis. / C.G. Turin, A. Zea – Vera, A. Pezo [и др.] // *Biometals.* – 2014. – V.27. – P.1007–1016.
165. Lactoferrin immunomodulation of DTH response in mice / J.K. Actor, S.A. Hwang, M. Olsen [и др.] // *Int Immunopharmacol.* – 2002. – V.2 (4). – P. 475–86.
166. Lactoferrin induces concentration – dependent functional modulation of intestinal proliferation and differentiation. / V. Buccigrosside, G. Marco, E. Bruzzese [и др.] // *Pediatr Res.* – 2007. – V.61(4). – P.4104.
167. Lactoferrin levels in gingival crevicular fluid and saliva of HIV – infected patients with chronic periodontitis / S.M. Ferreira, L.S. Goncalves, S.R. Torres [и др.] // *J Investig Clin Dent.* – 2015. – V.6(1). – P.16 – 24.
168. Lactoferrin Levels in Human Milk after Preterm and Term Delivery. / M. Albenzio, A. Santillo, I. Stolfi [и др.] // *Am J Perinatol.* – 2016. – V.33(11). – P.1085 – 9.
169. Lactoferrin, a multi – functional glycoprotein: Active therapeutic, drug nanocarrier & targeting ligand / Elzoghby A.O. Abdelmoneem M.A., Hassanin I.A. [и др.] // *Biomaterials.* – 2020. – V.263. – E.120355

170. Lactoferrin: A critical mediator of both host immune response and antimicrobial activity in response to Streptococcal infections / J. Lu, J. Francis, R.S. Doster [и др.] // *ACS Infect Dis.* – 2020. – V.6(7). – P.1615 – 1623.
-
171. Lactoferrin: A glycoprotein involved in immunomodulation, anticancer, and antimicrobial Processes / Q. Rascon – Cruz, E.A. Espinoza – Sanchez, T.S.Siqueiros – Cendon [и др.] // *Molecules.* – 2021. – V.26 (1). – P.205.
172. Lawrence, R. M. Human breast milk: Current concepts of immunology and infectious diseases. / R. M. Lawrence, C. A. Pane // *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* – 2007. – V.37(1). – P.7–36.
173. Legrand, D. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses / D. Legrand, E. Ellass, M. Carpentier, J. Mazurier // *Cell Mol Life Sci.* – 2005. – V.62(22). – P.2549 – 2559.
174. Loh, S. The effect of different milks and milk proteins on the growth of *Bifidobacterium infantis* ATCC 27920 in vitro. / S. Loh, I. Jr., Maznah // *Malays. J. Nutr.* – 1999. – V.5. – P.61–70.
175. Lönnerdal, B. Human milk proteins: Key components for the biological activity of human milk. / Lönnerdal B. // *Advances in Experimental Medicine and Biology* – 2004. – V.554. – P.11–25.
176. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. / T.R. Abrahamsson, H.E. Jakobsson, A.F.J. Andersson [и др.] // *Allergy Clin. Immunol.* – 2012. – V.129. – P.434–440.
177. Magnuson, J.S. Structural homology of human, bovine, and porcine milk lactoferrins: evidence for shared antigenic determinants. / J.S. Magnuson, JF Henry, TT Yip, TW. Hutchens // *Pediatr Res.* – 1990. – V.28(2). – P.176–181.
178. Manev, V. Effect of lactoferrin on the phagocytic activity of polymorphonuclear leucocytes isolated from blood of patients with autoimmune diseases and *Staphylococcus aureus* allergy. / V. Manev, A. Maneva, L. Sirakov // *Adv Exp Med Biol.* – 1998. – V.443. – P.321 – 30.
179. Manzoni, P. Clinical Benefits of Lactoferrin for Infants and Children. / Manzoni P. // *J. Pediatr.* – 2016. – V.173. – P.43–52.
-

180. Martin, C.R. Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. / C.R. Martin, P – R Ling, GL. Blackburn // *Nutrients*. – 2016. – V.8(5). – P.279.
181. Mazmanian, S.K. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. / S.K. Mazmanian, CH Liu, AO Tzianabos, DL. Kasper // *Cell*. – 2005. – V.122(1). – P.107 – 18.
182. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. / M.J. Gosalbes, S. Llop, Y. Vallès [и др.] // *Clin Exp Allergy*. – 2013. – V.43(2). – P.198 – 211.
183. Microbial population changes and their relationship with human health and disease. / A.I. Álvarez – Mercado, M. Navarro – Oliveros, C. Robles – Sánchez [и др.] // *Microorganisms*. – 2019. – V. 7. – P.68.
184. Microbiome and Allergic Diseases. / M. Pascal, M. Perez – Gordo, T. Caballero [и др.] // *Front Immunol*. – 2018. – V.9. – P.1584.
185. Microbiome Composition and Its Impact on the Development of Allergic Diseases. / D.G. Peroni, G. Nuzzi, I. Trambusti [и др.] // *Front Immunol*. – 2020. – V.23(11). – P.700.
186. Microbiota and Food Allergy. / S.A. Shu, AWT. Yuen, E. Woo [и др.] // *Clin Rev Allergy Immunol*. – 2019. – V.57(1). –P.83 – 97.
187. Microbiota therapy acts via a regulatory T cell MyD88/ROR γ t pathway to suppress food allergy. / A. Abdel – Gadir, E. Stephen – Victor, G.K. Gerber [и др.] // *Nat. Med*. – 2019. – V.25. – P.1164–1174.
188. Miller – Catchpole, R. Lactoferrin can supply iron for the growth of *Bifidobacterium breve*. / R. Miller – Catchpole, E. Kot, G. Haloftis, S. Furmanov, A. Bezkorovainy // *Nutr Res*. – 1997. – V.17. – P.205–213.
189. Mills, D.A. Translating neonatal microbiome science into commercial innovation: metabolism of human milk oligosaccharides as a basis for probiotic efficacy in breast – fed infants. / D.A. Mills, JB German, CB Lebrilla, MA Underwood. // *Gut Microbes*. – 2023. – V.15(1). – E.2192458

190. Morrow, A. L. Human – milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast – feeding infants against infectious diarrhea./ A. L. Morrow, G. Ruiz – Palacios, X.M., Jiang, D. S. Newburg // *The Journal of Nutrition*, – 2005. – V.135(5). – P.1304–1307.
191. Mosca, F. Bovine lactoferrin supplementation supports immune and antioxidant status in healthy human males / F. Mosca, PA Connellan, CJ Oliver, CA Morris, LM. Stevenson // *Nutr Res*. – 2008. – V.28(9). – P.583 – 9.
192. Mosca, F. Human milk: composition and health benefits. / F. Mosca, ML. Gianni // *Pediatr Med Chir*. – 2017. –V.39(2). – P.155.
193. Mother's and offspring's use of antibiotics and infant allergy to cow's milk / J. Metsälä, A. Lundqvist, LJ. Virta [и др.] // *Epidemiology*. – 2013. – V.24(2). – P.303 – 9.
194. Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin. / T.G. Kanyshkova, S.E. Babina, D.V. Semenov [и др.] // *Eur. J. Biochem*. – 2003. – V.270. – P.3353–3361.
195. Nagaoka, K. Human lactoferrin induces asthmatic symptoms in NC/Nga mice. / K. Nagaoka, T. Ito, K. Ogino, E. Eguchi, Y. Fujikura // *Physiol Rep*. – 2017. – V.5(15). – E.13365.
196. Nasal disinfection for the prevention and control of COVID – 19: A scoping review on potential chemo – preventive agents / L. Cegolon, M. Javanbakht, G. Mastrangelo [и др.] // *Int J Hyg Environ Health*. – 2020. – V.230. – E.113605.
197. Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. / M. Yassour, T. Vatanen, H. Siljander [и др.] // *Sci. Transl. Med*. – 2016. – V.8. – P.343 – 381.
198. NEOLACTO Research Group. Lactoferrin concentration in breast milk of mothers of low – birth – weight newborns. / C.G. Turin, A. Zea – Vera, MS. Rueda [и др.] // *J Perinatol*. – 2017. – V.37(5). – P.507 – 512.
199. Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation. / K.E. Fujimura, AR Sitarik, S Havstad [и др.] // *Nat Med*. – 2016. – V.22(10). – P.1187 – 1191.

200. Neonatal microbiota development and the effect of early life antibiotics are determined by two distinct settler types. / A. Eck, N.B. Rutten, M.M. Singendonk [и др.] // PLoS ONE. – 2020. – V.15. – E.0228133.
201. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann [и др.] // Science. – 2004. – V.303(5663). – P.1532–1535.
202. Newburg, D.S. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. / D.S. Newburg, G. M. Ruiz – Palacios, A. L. Morrow // Annual Review of Nutrition, – 2005. – V.25. – P.37–58.
203. Nony, E. Proteomics for Allergy: From Proteins to the Patients. / E. Nony, M. Le Mignon, S. Brier, A. Martelet, P. Moingeon // Allergy Asthma Rep. – 2016. – V.16. – P.1–9.
204. Notarbartolo, V. The First 1000 Days of Life: How Changes in the Microbiota Can Influence Food Allergy Onset in Children. / V. Notarbartolo, M. Carta, S. Accomando, M. Giuffrè // Nutrients. – 2023. – V.15(18). – P.4014
205. Nurturing the Early Life Gut Microbiome and Immune Maturation for Long Term Health. / S.K. Dogra, C. Kwong Chung, D. Wang [и др.] // Microorganisms. – 2021. – V.9(10). – P.2110.
206. Nutrition Trends and Affluent Parents Drive the Global Baby Foods and Infant Formula Market, According to New Report by Global Industry Analysts, Inc. – 2014.
207. Obesity and gut – microbiota – brain axis: A narrative review. / A. Asadi, N. Shadab Mehr, MH Mohamadi [и др.] // J Clin Lab Anal. – 2022. – V.36(5). – E.24420.
208. Oda, H. Lactoferrin and bifidobacteria / H. Oda, H. Wakabayash, K. Yamauchi, F. Abe // Biometals. – 2014. – V.27(5). – P.915 – 22.
209. Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance / J. Togawa, H. Nagase, K.Tanaka [и др.] // J Gastroenterol Hepatol. – 2002. – V.17(12). – P.1291–1298.

210. Oral lactoferrin to prevent nosocomial sepsis and necrotizing enterocolitis of premature neonates and effect on T – regulatory cells. / I.M. Akin, B. Atasay, F. Dogu [и др.] // *Am J Perinatol.* – 2014. – V.31(12). – P.1111 – 20.
211. Oral supplementation with bovine whey – derived Ig – rich fraction and lactoferrin improves SCORAD and DLQI in atopic dermatitis. / P.L. Tong, NP. West, AJ. Cox [и др.] // *J Dermatol Sci.* – 2017. – V.85(2). – P.143 – 146.
212. Oral therapeutic administration of a probiotic mixture suppresses established Th2 responses and systemic anaphylaxis in a murine model of food allergy. / E. Schiavi, B. Barletta, C. Butteroni [и др.] // *Allergy* – 2011. – V.66. – P.499–508.
213. Oram, J. Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron – chelating agents. / J. Oram, B. Reiter // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gen. Subj.* – 1968. – V.170. – P.351–365.
214. Papathoma, E. Cesarean section delivery and development of food allergy and atopicdermatiti sinearly childhood. / E. Papathoma, M. Triga // *Pediatr. Allergy Immunol.* – 2016. – V.27. – P.419–424.
215. Park, Y.W. Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. / Y.W. Park, M.S. Nam, J.Korean // *Food Sci. Anim. Resour.* – 2015. – V.35. – P.831–840.
216. Pathogenesis of allergic diseases and implications for therapeutic interventions. / J. Wang, Y. Zhou, H. Zhang [и др.] // *Signal Transduct Target Ther.* – 2023. – V.8(1). – P.138.
217. Perez – Muñoz, M.E. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: Implications for research on the pioneer infant microbiome. / M.E. Perez – Muñoz, M. – C. Arrieta, A.E. Ramer – Tait, J. Walter // *Microbiome.* – 2017. – V.5. – P.48.
218. Perinatal and Early – Life Nutrition, Epigenetics, and Allergy. / N. Acevedo, B. Alashkar Alhamwe, L. Caraballo [и др.] // *Nutrients.* – 2021. – V.13(3). – P.724.
219. Persistence of birth mode – dependent effects on gut microbiome composition, immune system stimulation and antimicrobial resistance during the

- first year of life. / S.B. Busi, L. de Nies, J. Habier [и др.] // ISME Commun. – 2021. – V.1(1). – P.8.
220. Petschow, B.W. Ability of lactoferrin to promote the growth of Bifidobacterium spp. in vitro is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. / B.W. Petschow, R.D. Talbott, R.P. Batema // J. Med. Microbiol. – 1999. – V.48. – P.541–549.
221. Petschow, B.W. Growth promotion of Bifidobacterium species by whey and casein fractions from human and bovine milk. / B.W. Petschow, R.D. Talbott // J. Clin. Microbiol. – 1990. – V.28. – P.287–292.
222. Pietrobelli, A. Nutrition in the First 1000 Days: Ten Practices to Minimize Obesity Emerging from Published Science. / A. Pietrobelli, M. Agosti, MeNu Group. // Int J Environ Res Public Health. – 2017. – V.14(12). – P.1491.
223. Plaza – Díaz, J. Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development. / J. Plaza – Díaz, L. Fontana, A. Gil // Nutrients. – 2018. – V.10(8). – P.1038.
224. Plunkett, C.H. The Influence of the Microbiome on Allergic Sensitization to Food. / C.H. Plunkett, CR. Nagler // J Immunol. – 2017. – V.198(2). – P.581 – 589.
225. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. / M. Tomita, W. Bellamy, M. Takase [и др.] // J. Dairy Sci. – 1991. – V.74. – P.4137–4142.
226. Prado, EL. Children Staying Smaller but Growing Smarter Beyond the First 1000 Days. / EL. Prado // J Nutr. – 2021. – V.151(7). – P/1684 – 1685.
227. Pre – and perinatal characteristics and breast milk immune markers. / J. Burch, W. Karmaus, V. Gangur [и др.] // Pediatr Res. – 2013. – V.74. – P.615–621.
228. Probiotics have a different immunomodulatory potential in vitro versus ex vivo upon oral administration in children with food allergy. / A.E. Flinterman, EF Knol, AG Van Ieperen [и др.] // Int Arch Allergy Immunol. – 2007. – V.143. – P.237–44.

229. Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo – controlled trial. / M. Kalliomäki, S. Salminen, H. Arvilommi [и др.] // *Lancet*. – 2001. – V.357. – P.1076–1079.
230. Production of human lactoferrin in animal milk. / I. Goldman, SG Georgieva, YG Gurskiy [и др.] // *Biochem Cell Biol*. – 2012. – V.90(3). – P.513–519.
231. Prolonged breast feeding as prophylaxis for recurrent otitis media. / Saarinen U. M. // *Acta Paediatrica Scandinavica* – 1982. – V.71(4). – P.567–571.
232. Proteome mapping of human skim milk proteins in term and preterm milk. / C.E. Molinari, Y.S. Casadio, B.T. Hartmann [и др.] // *Journal of Proteome Research* – 2012. – V.11(3). – P.1696 – 1714.
233. Proteomic Analysis of Putative Latex Allergens. / T. Yagami, Y. Haishima, T. Tsuchiya [и др.] // *Int. Arch. Allergy Immunol*. – 2004. – V.135. – P.3–11.
234. Rainard, P. Activation of the classical pathway of complement by binding of bovine lactoferrin to unencapsulated *Streptococcus agalactiae*. / P. Rainard // *Immunology*. – 1993. – V.79(4). – P.648–652.
235. Randomised phase IIb trial to assess the efficacy of ReCharge ice cream in preventing chemotherapy – induced diarrhoea. / D.A. Perez, KJ. Sharples, R. Broom [и др.] // *Support Care Cancer*. – 2015. – V.23(11). – P.3307 – 15.
236. Randomized controlled trial of lactoferrin for prevention of sepsis in peruvian neonates less than 2500 g. / T.J. Ochoa, J. Zegarra, L. Cam [и др.] // *Pediatr Infect Dis J*. – 2015. – V.34(6). – P.571–576.
237. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. / H. Bisgaard, N. Li, K. Bonnelykke [и др.] // *J. Allergy Clin. Immunol*. – 2011. – V.128. – P.646–652.
238. Regulation of physiological and pathological Th1 and Th2 responses by lactoferrin / R. Fischer, H. Debbabi, M. Dubarry [и др.] // *Biochem Cell Biol*. – 2006. – V.84 (3). – P. 303–311.

239. Robertson, R.C. The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond. / R.C. Robertson, AR. Manges, BB. Finlay, AJ. Prendergast // Trends Microbiol. – 2019. – V.27(2). – P.131 – 147.
240. Role of heparan sulphate proteoglycans in the regulation of human lactoferrin binding and activity in the MDA – MB – 231 breast cancer cell line / E. Damiens, I. El Yazidi, J. Mazurier [и др.] // Eur J Cell Biol. – 1998. – V.77 (4). – P.344–351.
241. Salivary lactoferrin as biomarker for Alzheimer’s disease: Brain – immunity interactions / F. Bermejo – Pareja, T. del Ser, M. Valentí [и др.] // Alzheimer’s Dement. – 2020. – V.16. – P.1196–1204.
242. Schwarzenberg, S.J. Advocacy for Improving Nutrition in the First 1000 Days to Support Childhood Development and Adult Health. / S.J. Schwarzenberg, MK. Georgieff; COMMITTEE ON NUTRITION // Pediatrics. – 2018. – V.141(2). – E.20173716.
243. Shelby R. D. Influence of Growth Factors on the Development of NEC. / R. D. Shelby, B. Cromeens, T. M. Rager, G. E. Besner // Clinics in Perinatology – 2019. – V.46(1). – P.51–64.
244. Shimazaki, K. Comparison of bovine, sheep and goat milk lactoferrins in their electrophoretic behavior, conformation, immunochemical properties and lectin reactivity. / K. Shimazaki, N. Kawano, YC. Yoo // Comp Biochem Physiol B. – 1991. – V.98(2 – 3). – P.417 – 22.
245. Singh, P.K. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. / P.K. Singh, M.R. Parsek, E.P. Greenberg, M.J. Welsh // Nature. – 2002. – V.417. – P.552–555.
246. Soerensen, M. The proteins in whey / S.P.L. Soerensen // C R Trav Lab Carlsberg. – 1939. – V.23. – P.55–99.
247. Studying Lactoferrin N – Glycosylation. / S. Karav, J.B. German, C. Rouquie [и др.] // Int. J. Mol. Sci. – 2017. – V.18. – P.870.

248. Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean – section birth. / Y. Shao, SC. Forster, E. Tsaliki [и др.] // *Nature*. – 2019. – V.574(7776). – P.117 – 121.
249. *Subdoligranulum variabile* gen. nov., sp. nov. from human feces. / K. Holmstrøm, MD Collins, T Møller [и др.] // *Anaerobe*. – 2004. – V.10(3). – P.197 – 203.
250. Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin: 1. Effect on the faecal flora. / A.K. Roberts, R. Chierici, G. Sawatzki [и др.] // *Acta Paediatr* – 1992. – V.81. – P.119–124.
251. Sweeney, A. Early intervention of atopic dermatitis as a preventive strategy for progression of food allergy. / A. Sweeney, V. Sampath, KC. Nadeau // *Allergy Asthma Clin Immunol*. – 2021. – V.17(1). – P.30.
252. Synergistic activity of synthetic N – terminal peptide of human lactoferrin in combination with various antibiotics against carbapenem – resistant *Klebsiella pneumoniae* strains / P. Morici, W. Florio, C. Rizzato [и др.] // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. – 2017. – V.36 (10). – P.1739–1748.
253. Tang M.L. Administration of a probiotic with peanut oral immunotherapy: A randomized trial. / M.L. Tang, A.L. Ponsonby // *J. Allergy Clin. Immunol*. – 2015. – V.135. – P.737–744.
254. Telang, S. Lactoferrin: A Critical Player in Neonatal Host Defense. / S. Telang // *Nutrients*. – 2018. – V.10(9). – P.1228.
255. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. / R. Cabrera – Rubio, MC Collado, K Laitinen [и др.] // *Am J Clin Nutr*. – 2012. – V.96(3). – P.544 – 51.
256. The Impact of Lactoferrin on the Growth of Intestinal Inhabitant Bacteria. / A. Vega – Bautista, M. de la Garza, JC. Carrero [и др.] // *Int J Mol Sci*. – 2019. – V.20(19). – P.4707 – 4709.
257. The microbial metabolites, short – chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. / P.M. Smith, MR. Howitt, N. Panikov [и др.] // *Science*. – 2013. – V.431. – P.569–73.

258. The Regulatory T Cell Lineage Factor Foxp3 Regulates Gene Expression through Several Distinct Mechanisms Mostly Independent of Direct DNA Binding. / X. Xie, M.J. Stubbington, J.K. Nissen [и др.] // *PLoS Genet.* – 2015. – V.11(6). – E.1005251.
259. The Relationship Between Breast Milk Components and the Infant Gut Microbiota. / G. Boudry, E. Charton, I. Le Huerou – Luron [и др.] // *Front Nutr.* – 2021. – V.8. – E.629740.
260. The Role of Early Life Microbiota Composition in the Development of Allergic Diseases. / M. Tuniyazi, S. Li, X. Hu [и др.] // *Microorganisms.* –2022. – V.10(6). – P.1190.
261. Thompson – Chagoyan, O.C. Changes in faecal microbiota of infants with cow's milk protein allergy — a Spanish prospective case – control 6 – month follow – up study. / O.C. Thompson – Chagoyan, J.M. Vieites // *Pediatr. Allergy Immunol.* – 2010. – V.21 Pt 2. – E.394–e400.
262. Tian, H. Influence of bovine lactoferrin on selected probiotic bacteria and intestinal pathogens. / H. Tian, I.S. Maddox, L.R. Ferguson, Q. Shu // *Biometals.* – 2010. – V.23. – P.593–596.
263. Transgenic milk containing recombinant human lactoferrin modulates the intestinal flora in piglets. / W. Hu, J. Zhao, J. Wang [и др.] // *Biochem Cell Biol.* – 2012. – V.90(3). – P.485 – 96.
264. Urschel, D. Butyrate as a Bioactive Human Milk Protective Component Against Food Allergy. / D. Urschel, V. Hernandez – Trujillo // *Pediatrics.* – 2021. – V.148. – P.21–S22.
265. Variations in concentrations of lactoferrin in human milk: a nine country survey. / E. Lien, J. Jackson, C. Kuhlman [и др.] // *Adv Exp Med Biol.* – 2004. – V.554. – P.423 – 6
266. Variations in oral microbiota and salivary proteomics reveal distinct patterns in polysensitized individuals. / Y. Wang, Q. Zhang, C. Wang [и др.] // *Allergy.* – 2022. – V.77. – P.1899–1902.

267. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and soluble VEGF receptor 1 (sFlt – 1) levels in early and mature human milk from mothers of preterm versus term infants. / A. Loui, E. Eilers, E. Strauss [и др.] // *Journal of Human Lactation: Official Journal of International Lactation Consultant Association* – 2012. – V.28(4). – P.522–528.
-
268. Villavicencio, A. Factors affecting lactoferrin concentration in human milk: how much do we know? / A. Villavicencio, MS. Rueda, CG. Turin, TJ. Ochoa // *Biochem Cell Biol.* – 2017. – V.95. – P.12 – 21.
269. Wakabayashi, H. Modulation of immunity – related gene expression in small intestines of mice by oral administration of lactoferrin. / H. Wakabayashi, N. Takakura, K. Yamauchi, Y. Tamura // *Vaccine Immunol.* – 2006. – V.13(2). – P.239 – 45.
270. Wang, B. Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. / B. Wang, YP. Timilsena, E. Blanch, B. Adhikari // *Crit Rev Food Sci Nutr.* – 2019. – V.59(4). – P.580 – 596.
271. Ward, P.P. Lactoferrin and host defense. / P.P. Ward, S. Uribe – Luna, OM. Conneely // *Biochem Cell Biol.* – 2002. – V.80(1). – P.95 – 102.
272. Willyard, C. The drug – resistant bacteria that pose the greatest health threats / C. Willyard // *Nature.* – 2017. – V.543(7643). – P.15.
-
273. Yi, D.Y. Human Breast Milk Composition and Function in Human Health: From Nutritional Components to Microbiome and MicroRNAs. / D.Y. Yi, SY. Kim // *Nutrients.* – 2021. – V.13(9). – P.3094.
274. Zhao, J. Comparative proteome analysis of *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* grow non beta – glucans from different sources and a model for their utilization. / J. Zhao, P.C. Cheung // *J. Agric. Food Chem.* – 2013. – V.61. – P.4360–4370.
275. Zhao, W. The gut microbiome in food allergy. / W. Zhao, HE. Ho, S. Bunyavanich // *Ann Allergy Asthma Immunol.* – 2019. – V.122(3). – P.276 – 282.

276. α – Lactalbumin and caseinglycomacropptide do not affect iron absorption from formula in healthy term infants. / E.A. Szymlek – Gay, B. Lonnerdal, SA. Abrams [и др.] // J Nutr. – 2012. – V.142(7). – P.1226–1231.