



УДК 535.518; 57.083.3

ПЕРСПЕКТИВЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛАКТОФЕРРИНА В ЖЕНСКОМ МОЛОКЕ И МОЛОЗИВЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ

© 2026 г. Л. И. Мухаметова^{*,#}, С. А. Еремин^{*}, М. К. Колоколова^{*}, Ю. С. Лебедин^{**},
И. В. Михура^{***}, О. В. Стецюк^{****}, Т. И. Иванова^{*****}, С. В. Тиллиб^{*****,#}

^{*} Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1/3

^{**} ООО "ХЕМА", Россия, 125319 Москва, ул. 9-ая Парковая, 48/4

^{***} ФГБУН ГНЦ "Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова" РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

^{****} Перинатальный центр "Городская клиническая больница N.31 им. акад. Г.М. Савельевой",
Россия 119415 Москва, ул. Лобачевского, 42

^{*****} Институт биологии гена РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 34/5

Поступила в редакцию 14.08.2025 г.

После доработки 28.08.2025 г.

Принята к публикации 29.08.2025 г.

Лактоферрин человека (hLF) – многофункциональный гликопротеин, обладающий полезными свойствами: иммуномодулирующие, противовоспалительные, антибактериальные, противовирусные и антиоксидантные. hLF, содержащийся в грудном молоке, обеспечивает естественную защиту новорожденных от инфекций. Тестирование качества грудного молока и молозива – важная задача, которая позволит скорректировать питание ребенка. Известно большое количество методов определения hLF, чаще всего используют инструментальные и иммунные анализы. Однако необходимы простые и быстрые методы. Ранее нами была продемонстрирована возможность определения hLF методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (FPIA) с применением флуоресцентно меченных рекомбинантных нанотел верблюда, который занимал не более 10 мин. В данной работе показана возможность определения hLF в образцах молозива, которое отличается по составу от молока. Разработан одностадийный иммуноферментный анализ с применением поликлональных и моноклональных антител, который позволяет быстрее и с минимальным количеством стадий определять hLF в молоке и молозиве. Предел обнаружения ELISA составил 1.25 нг/мл. Методами FPIA и ELISA были протестированы 32 образца молозива и 10 образцов молока. Показано, что результаты определения hLF в молоке и молозиве методами FPIA и ELISA сопоставимы между собой. Разработанный высокочувствительный одностадийный ELISA может быть распространен и на другие физиологические жидкости человека, например, слезная жидкость или моча.

Ключевые слова: лактоферрин человека, нанотела, поляризационный флуоресцентный иммуноанализ, иммуноферментный анализ

DOI: 10.7868/S1998286026010103

ВВЕДЕНИЕ

Лактоферрин (LF) – это гликопротеин с молекулярной массой около 80 кДа, структура которого включает 690 аминокислотных остатков [1]. LF принадлежит к семейству трансферринов, и его аминокислотная последовательность демонстрирует 60% идентичности с последовательностью

сывороточного трансферрина [2]. Это структурное подобие указывает на эволюционное родство и, возможно, на общность некоторых функций [3]. Впервые лактоферрин был выделен в 1939 г. Соренсеном из коровьего молока, а позднее, в 1960 г., Йохансон осуществил выделение лактоферрина человека (hLF) из женского молока [1].

Сокращения: LF – лактоферрин; hLF – лактоферрин человека; FPIA – поляризационный флуоресцентный иммуноанализ; FP – поляризация флуоресценции, FITC -флуоресцеин-5-изотиоцианат.

[#] Автор для связи: (эл. почта: liliya106@mail.ru, tillib@genebiology.ru).

Лактоферрин обладает высоким сродством к ионам трехвалентного железа (Fe^{3+}). Константа диссоциации (K_D) для комплекса лактоферрин-железо составляет примерно 10^{-20} М, что указывает на очень прочное связывание [4]. Эта способность LF играет ключевую роль в регуляции уровня свободного железа в жидкостях организма. Важной характеристикой hLF оказывается его выраженная антимикробная активность, проявляющаяся в антибактериальных, противовирусных и противопаразитарных эффектах [5]. Механизмы этих эффектов активно изучаются, и вероятно, связаны со способностью лактоферрина связывать железо, которое служит важным фактором роста многих патогенных микроорганизмов [6]. Связывание железа лактоферрином лишает патогенов этого критически важного компонента, подавляя их рост и размножение [7]. hLF играет ключевую роль в различных физиологических процессах. Он выступает как защитный фактор, участвуя в иммунных ответах организма [5, 8]. Кроме того, существуют данные о его способности ингибировать рост опухолей, что открывает перспективы использования hLF в онкологической практике [9]. Некоторые исследования указывают, что LF влияет на ферментативную активность рибонуклеазы А, фермента, участвующего в расщеплении РНК. Более того, hLF регулирует клеточную пролиферацию и дифференцировку клеток, что критически важно для поддержания тканевого гомеостаза [9].

Лактоферрин, уникальный гликопротеин, присутствующий также и в молоке различных млекопитающих, но содержание его значительно варьируется в зависимости от вида животного и стадии лактации [10], что отражает различные потребности новорожденных в иммунной защите на ранних этапах жизни. Концентрация лактоферрина в женском грудном молоке заметно выше, чем в коровьем. В молозиве, первом молоке после родов, содержание hLF достигает значений свыше 5 г/л, которое постепенно снижается до уровня 2–3 г/л по мере перехода молока в зрелую стадию лактации [11]. В коровьем молоке концентрация лактоферрина составляет приблизительно 0.8 г/л, что существенно ниже, чем в человеческом [12]. Эти значительные различия в содержании LF напрямую связаны с особенностями иммунной системы новорожденных разных видов животных. Новорожденный ребенок, в силу своей незрелости и уязвимости перед инфекциями, имеет гораздо более высокую потребность в защитных факторах, которые обеспечивает LF. Он играет важную роль в борьбе с патогенными бактериями, вирусами и грибами, предотвращая их размножение и колонизацию в пищеварительном тракте. Высокая концентрация LF в человеческом молозиве – своеобраз-

ный "иммунный буфер", обеспечивающий защиту новорожденного в период не полностью сформированной собственной иммунной системы [2, 13].

Таким образом, высокое содержание LF в человеческом молозиве обеспечивает оптимальную защиту новорожденного. В свете этих фактов потенциал применения LF в медицине и пищевой промышленности кажется поистине огромным. Дальнейшие исследования, направленные на изучение его свойств, механизмов действия и особенностей гликозилирования различных видов лактоферрина, могут привести к созданию новых терапевтических препаратов и функциональных продуктов питания, способных улучшить здоровье человека и повысить устойчивость организма к инфекционным заболеваниям. Это открывает перспективы для разработки инновационных методов профилактики и лечения широкого спектра заболеваний, связанных с дисбалансом иммунной системы.

Сообщалось о наличии значительной корреляции между наличием вирусной инфекции у матерей, включая COVID-19 (SARS-CoV-2), и концентрацией hLF в образцах молозива [14]. Концентрация лактоферрина была выше в образцах молозива женщин с подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2 относительно матерей в контрольной группе. Образцы молозива матерей с активной инфекцией SARS-CoV-2 на момент родов содержали наибольшее количество hLF по сравнению с постинфекционными и контрольными образцами. Таким образом, hLF может быть значимым защитным фактором для новорожденных, находящихся на грудном вскармливании. Механизм защитного действия hLF может быть связан с его способностью образовывать комплексы с протеогликанами гепарансульфата (которые используются вирусами SARS-CoV-2 для проникновения в клетки), потенциально снижая риск заражения [15]. hLF также может влиять на взаимодействие с белком ACE2, ограничивая прикрепление вируса к мембране клетки [16], и кроме того может снижать риск воспаления и цитокинового шторма, поскольку тяжелая форма COVID-19 связана с чрезмерным воспалением (например, высоким уровнем IL-6, TNF- α). Лактоферрин помогает модулировать иммунные реакции, предотвращая гиперинфекцию. Сообщается также, что hLF участвует в поддержании здоровья кишечника, влияя на его микробиом [17], стимулируя рост полезных бактерий (например, бифидобактерий) и одновременно подавляя вредные патогены. Поскольку новорожденные подвержены окислительному стрессу, hLF, связывая избыток железа, уменьшает повреждение тканей свободными радикалами. Имеются клинические данные, указывающие

на то, что младенцы, находящиеся на грудном вскармливании, подвержены меньшему риску респираторных инфекций, что может быть связано, в том числе и с высоким содержанием лактоферрина [18]. Высказано предположение, что незначительные проявления симптомов заболевания у некоторых новорожденных, инфицированных COVID-19, могут быть связаны с защитными факторами, содержащимися в грудном молоке (хотя необходимы дополнительные исследования) [19].

Грудное молоко – лучший источник hLF для новорожденных [20], однако состав и ценность молока зависит от многих причин [21–23]. Если грудное вскармливание невозможно, то используются детские смеси с добавлением лактоферрина [17, 24]. Для профилактики инфекций недоношенным детям иногда назначают препараты, содержащие лактоферрин [25]. hLF, содержащийся в грудном молоке, обеспечивает естественную защиту новорожденных от инфекций [24, 26]. Поэтому необходимо контролировать содержание LF как в женском грудном молоке, так и в детских смесях [27]. Определение уровня hLF в женском молоке имеет важное значение по нескольким причинам: (1) иммунологическая защита новорожденного; (2) поддержка развития кишечника; (3) показатель качества молока и диагностика состояния матери (снижение уровня LF может указывать на возможные проблемы со здоровьем матери или на необходимость коррекции ее питания) [23, 28] и (4) для исследования и разработки смесей (изучение уровня лактоферрина помогает в разработке искусственных смесей, максимально приближенных по составу к грудному молоку, что особенно важно для детей, которые не могут получать грудное вскармливание). На сегодняшний день существует ряд методик, позволяющих определять концентрацию лактоферрина не только в грудном молоке, но и в других биологических жидкостях организма. Один из наиболее распространенных и надежных методов – высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC) [29,30]. Этот метод позволяет определить концентрацию лактоферрина с высокой точностью, однако требует наличия дорогостоящего специализированного оборудования, а также тщательной подготовки проб, включающей ряд этапов очистки и фильтрации образца молока для предотвращения засорения колонки. Кроме того, необходимы специальные знания и навыки для правильного проведения анализа и интерпретации полученных результатов.

Еще один современный и высокоточный метод определения лактоферрина – масс-спектрометрия. Этот метод позволяет не только определить концентрацию лактоферрина, но и установить его посттрансляционные модификации – изменения, происходящие с молекулой белка после синтеза, такие

как гликозилирование или фосфорилирование. Эти модификации могут влиять на биологическую активность лактоферрина. Часто масс-спектрометрия применяется в сочетании с жидкостной хроматографией (LC-МС) [31, 32], что позволяет предварительно разделять компоненты смеси, а затем определить каждый компонент с высокой точностью и чувствительностью. Этот комбинированный подход обеспечивает наиболее полную информацию о лактоферрине в образце. Электрофорез – более простой и менее затратный метод, используемый, преимущественно, для качественного анализа, однако он не дает точных количественных данных о концентрации аналита. Применение метода капиллярного электрофореза позволяет проводить и количественный анализ образцов [33]. Спектрофотометрический метод – более простой, он основан на измерении поглощения света белком при определенной длине волны. Однако, этот метод применим только для образцов, предварительно очищенных от других белков и компонентов молока, что значительно ограничивает его применение для анализа грудного молока без дополнительной сложной подготовки пробы.

Наиболее часто используются иммунные методы анализа LF. Метод латексной агглютинации основан на взаимодействии лактоферрина с антителами, иммобилизованными на поверхности латексных частиц [34]. Этот метод достаточно простой и быстрый, но менее точный, чем ВЭЖХ или масс-спектрометрия. Он часто используется для скрининговых исследований, позволяя быстро определить наличие или отсутствие LF в образцах. ELISA – наиболее распространен, поскольку применение специфичных к лактоферрину антител позволяет определять концентрацию белка в различных образцах с низким пределом обнаружения [35]. Известен и другой формат иммуноанализа определения hLF – это метод поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (FPIA) [36]. Метод FPIA основан на измерении степени поляризации флуоресцентного излучения, которая зависит от вращательной диффузии молекул в растворе [37]. При связывании флуоресцентно меченного вещества небольшого молекулярного веса с высокомолекулярной молекулой сигнал поляризации флуоресценции увеличивается [36]. В качестве распознающего реагента используются флуоресцентно меченные рекомбинантные нанотела верблюда, имеющие высокую аффинность к hLF. Данный метод позволяет быстро и количественно определять hLF в женском грудном молоке. Длительность анализа занимает не более 10 мин. Однако это исследование было проведено на очень ограниченном количестве реальных образцов молока, кроме того, не была

изучена возможность применения метода FPIA в молозиве, которое имеет более сложный и насыщенный состав, чем молоко.

В данном исследовании мы увеличили количество образцов молока и молозива здоровых женщин и предприняли попытку определить содержание лактоферрина методом FPIA с применением флуоресцентно меченных нанотел верблюда, полученных против различных эпитопов лактоферрина человека. Кроме того, полученные результаты будут сопоставлены с результатами, полученными новым методом иммуноферментного анализа с использованием моноклональных (MAb) и поликлональных (PAb) антител, полученных против hLF. Возможно, что сочетанное использование MAb и PAb позволит получить более чувствительный метод анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка метода ELISA с моноклональными антителами. Для создания чувствительной ELISA тест системы определения hLF были взяты моноклональные антитела XL38 или XL61, полученные против hLF, и их конъюгаты с пероксидазой хрена с различными разведениями. Первоначально подбирали пару иммунореагентов. В лунки планшета с предварительно сорбированными моноклональными антителами XL38 или XL61 (5 мкг/мл) добавляли hLF с различными концентрациями (0–10000 нг/мл). Затем после 30 мин инкубации и отмывки добавляли конъюгаты XL38-HRP или XL61-HRP с разведением 10000, 20000 и 40000 раз. На рис. 1 представлены результаты эксперимента для конъюгатов XL38-HRP и XL61-HRP с разведением в 10000 раз.

Как видно из рис. 1 при тестировании гомологичных пар, XL38/XL38-HRP и XL61/XL61-HRP, не наблюдалось заметного изменения оптической плотности при увеличении концентрации

hLF. Вероятно, эпитоп на hLF может быть экранирован антителом, сорбированным на планшете, и при добавлении гомологичного конъюгата Mab с пероксидазой связывания с hLF не наблюдается. Однако при тестировании пар с гетерологичными парами антител, XL38/XL61-HRP и XL61/XL38-HRP, наблюдается значительное увеличение сигнала, что свидетельствует о связывании конъюгата с лактоферрином. Поэтому для дальнейшей работы были выбраны пары XL61/XL38-HRP и XL38/XL61-HRP с титром конъюгата 1 : 10000. Используя данные пары реагентов, были построены калибровочные зависимости для определения hLF (рис. 2). Однако при тестировании системы для определения низких концентраций лактоферрина, при концентрации 1 нг/мл, ошибка измерения составляла около 230%, что свидетельствует о невозможности определения низких концентраций hLF в такой системе.

Поскольку при использовании пар моноклональных антител и их конъюгатов с пероксидазой XL61/XL38-HRP и XL38/XL61-HRP не удалось создать чувствительного метода анализа, далее в качестве сорбированного реагента была использована поликлональная антисыворотка кролика, полученная против hLF. Мы предположили, что сочетание поликлональных антител в качестве сорбированного реагента и моноклонального антитела как узнающего реагента позволит создать более чувствительный метод анализа (табл. 1).

Разработка тест системы PAb/MAb-HRP. Антисыворотка кролика, As283/U1/2408, с различными разведениями (1 : 10000, 1 : 100000, 1 : 1000000) в карбонатном буфере pH 9 была сорбирована на планшете. После обычных процедур отмывания и блокирования свободных участков в лунки планшета были добавлены стандартные растворы hLF с известными концентрациями 2–200 нг/мл. В качестве распознающих реагентов использовались конъюгаты моноклональных

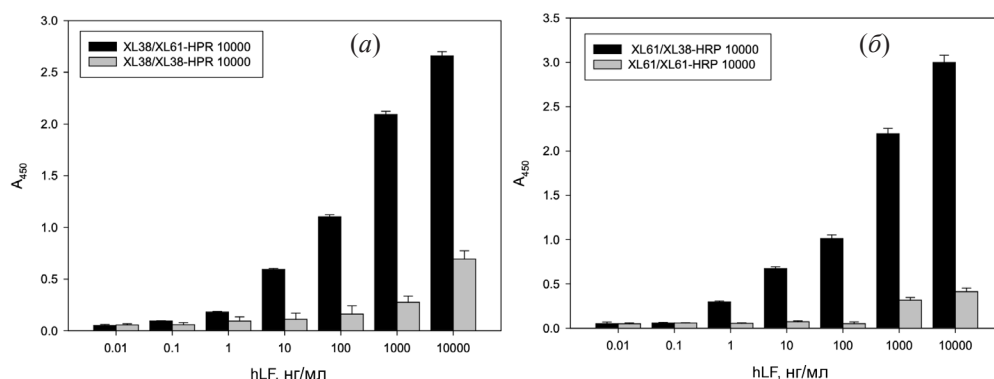


Рис. 1. Тестирование систем для определения hLF: (а) – сорбированное антитело XL38; (б) – XL61 с конъюгатами XL38-HRP или XL61-HRP с разведением 10000.

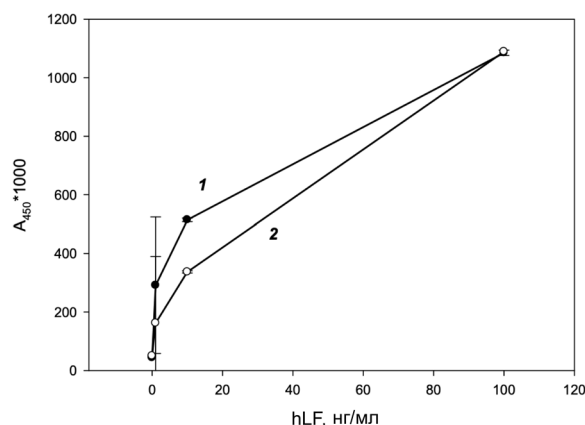


Рис. 2. Калибровочные зависимости определения hLF в следующих системах: XL61-XL38-HRP (кривая 1) и XL38-XL61-HRP (кривая 2).

Таблица 1. Методы определения лактоферрина в женском молоке

Метод	Предел обнаружения	Область определения	Ссылка
Высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC)	—	0.040–0.140 мг/мл	[29]
Капиллярный электрофорез	0.01 мг/мл	0.2–5.0 мг/мл	[30]
Метод латексной агглютинации	0.2 мкг/мл	—	[33]
Хемилюминесцентный иммуноферментный анализ	2.85 нг/мл	—	[34]
Радиальная иммунодиффузия	—	7.24–800 нг/мл	[40]
FPIA	—	0.25–4 мг/мл	[41]
ELISA	2 мкг/мл	3–10 мкг/мл	[36]
ELISA	0.065 мкг/мл	1–25 мкг/мл	[42]
ELISA	1.25 нг/мл	1.25–50 нг/мл	Данная работа

антител, XL38-HRP и XL61-HRP, с разведениями 1 : 20000, 1 : 40000, 1 : 80000. Для создания тест системы апробированы два формата ELISA: одностадийный и двухстадийный. В первом случае к сорбированной антисыворотке добавляли одновременно стандартные растворы лактоферрина и конъюгированное с пероксидазой хрена моноклональное антитело. Двухстадийный формат предусматривал последовательную ин-

кубацию стандартных растворов лактоферрина и конъюгатов моноклональных антител XL38-HRP и XL61-HRP. Полученные результаты показали, что конъюгаты XL38-HRP и XL61-HRP с одинаковыми пределами обнаружения распознавали hLF, связавшийся с PAb. В табл. 2 в качестве примера приведены результаты чувствительности (IC_{50}) для двух форматов ELISA тест-систем с использованием XL38-HRP.

Таблица 2. Величины IC_{50} для одностадийной и двухстадийной схем ELISA определения hLF в системе PAb/XL38-HRP

Разведение антисыворотки As283/U1/2408	Одностадийный ELISA			Двухстадийный ELISA		
	разведение конъюгата XL38-HRP			разведение конъюгата XL38-HRP		
	20000	40000	80000	20000	40000	80000
	IC_{50} (нг/мл)					
1000	4.51 ± 0.10	8.43 ± 0.21	13.61 ± 0.21	4.00 ± 0.11	7.51 ± 0.10	14.01 ± 0.10
10000	4.84 ± 0.21	8.00 ± 0.19	13.55 ± 0.12	4.15 ± 0.12	7.10 ± 0.22	12.51 ± 0.20
100000	12.86 ± 0.22	14.22 ± 0.12	14.94 ± 0.20	26.02 ± 0.21	23.05 ± 0.23	23.01 ± 0.23

На основании полученных данных для проведения дальнейшего анализа был выбран одностадийный формат ELISA с разведением антисыворотки 10000 раз и разведением конъюгата 20000 раз (табл. 3). Одностадийный формат проще в постановке анализа, а чувствительность метода одинакова. Калибровочная зависимость представлена на рис. 3.

Анализ был апробирован методом введено/найденно. В буферный раствор pH 7.4 был добавлен раствор hLF в фосфатно солевом буфере pH 7.4 с известными концентрациями, и по калибровочной зависимости (рис. 3) определяли содержание белка. После чего исследуемые образцы молока и молозива, предварительно разбавленные PBS в 200000 раз, проверяли на содержание лактоферрина, используя данную систему. Результаты измерения представлены в табл. 4. Разработанный ELISA метод определения лактоферрина требует достаточно сильного разведения образцов молока (200000 раз), что может вносить дополнительную ошибку в определения лактоферрина. Однако данная методика может быть полезна для определения белка в образцах с низким содержанием LF (плазма крови), в сильно разбавленных образцах, или об-

разцах, которые можно получить только в очень небольших количествах, например, слеза. В молоке и молозиве содержится большое количество лактоферрина от 1 до 5.5 мг/мл. Для определения мажорных белков лучше использовать метод, который не требует такого сильного разведения образца.

Определение hLF в молоке и молозиве методом FPIA. Такая методика была предложена нами в предыдущем исследовании [38]. Метод FPIA имеет более высокий предел обнаружения 2 мкг/мл, но требует разведение молока в 100–150 раз. В предыдущем исследовании мы продемонстрировали возможность определения hLF в женском грудном молоке методом FPIA, используя в качестве распознающего реагента однодоменные рекомбинантные нанотела верблюда, обладающие высокой специфичностью к человеческому лактоферрину [36]. В работе использовали anti-hLF5 и anti-hLF16, полученные на разных участках распознавания молекулы hLF. В предыдущих исследованиях показано, что эти нанотела не проявляют перекрестной реактивности с лактоферрином козы и имеют высокую селективность к hLF [36, 38]. Это очень важное

Таблица 3. Апробация метода определения hLF в одностадийном формате ELISA в системе PAb/ XL38-HRP при разведении антисыворотки 1 : 100000 и конъюгата 1 : 20000 раз

Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	%
2.5	2.4	96
5	4.8	97
10	10.4	104
20	19.8	99

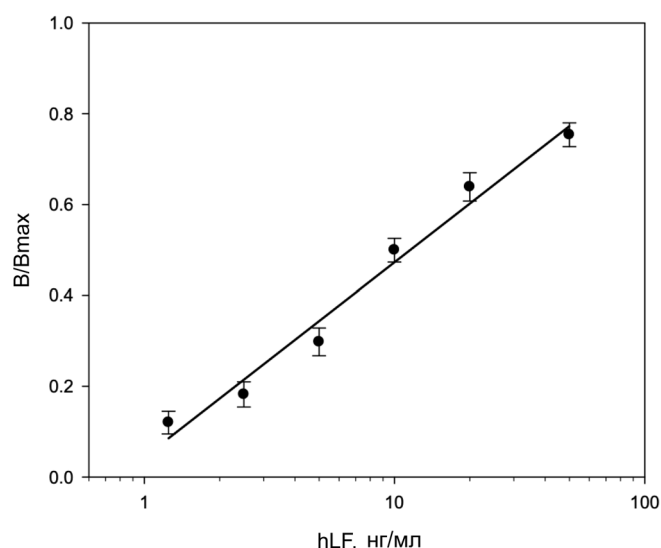


Рис. 3. Область определения hLF в одностадийном формате ELISA в системе PAb/ XL38-HRP при разведении антител 1 : 100000 и конъюгата 1 : 20000 раз.

Таблица 4. Результаты тестирования образцов молока (М) и молозива (МВ) методами FPIA и ELISA

Номер образца	Результаты FPIA, мг/мл		Результат ELISA мг/мл
	FITC-anti-hLF5	FITC-anti-hLF16	
1-МВ	5.55 ± 0.12	5.31 ± 0.22	5.31 ± 0.21
2-МВ	2.33 ± 0.18	2.14 ± 0.21	2.98 ± 0.31
3-МВ	5.27 ± 0.21	4.80 ± 0.25	4.67 ± 0.28
4-МВ	2.17 ± 0.15	1.98 ± 0.15	1.90 ± 0.12
5-МВ	1.75 ± 0.10	1.52 ± 0.17	1.98 ± 0.20
6-МВ	1.36 ± 0.12	1.78 ± 0.12	1.46 ± 0.14
7-МВ	1.07 ± 0.10	1.01 ± 0.10	1.12 ± 0.12
8-МВ	1.45 ± 0.12	1.56 ± 0.60	1.88 ± 0.18
9-МВ	1.00 ± 0.15	1.02 ± 0.14	1.10 ± 0.12
10-МВ	2.69 ± 0.20	2.70 ± 0.23	2.80 ± 0.14
11-МВ	3.00 ± 0.18	2.84 ± 0.22	2.68 ± 0.13
12-МВ	2.19 ± 0.19	2.47 ± 0.23	2.57 ± 0.12
13-МВ	2.77 ± 0.11	2.57 ± 0.14	2.76 ± 0.18
14-МВ	2.57 ± 0.17	2.38 ± 0.21	2.30 ± 0.21
15-МВ	5.77 ± 0.23	5.72 ± 0.23	5.91 ± 0.26
16-МВ	3.28 ± 0.25	2.75 ± 0.25	2.93 ± 0.28
17-МВ	2.72 ± 0.19	2.59 ± 0.13	2.75 ± 0.15
18-МВ	1.74 ± 0.20	2.34 ± 0.22	2.21 ± 0.19
19-МВ	2.41 ± 0.22	2.43 ± 0.23	2.63 ± 0.15
20-МВ	1.84 ± 0.20	2.05 ± 0.20	2.20 ± 0.18
21-МВ	2.18 ± 0.21	3.35 ± 0.26	2.98 ± 0.32
22-МВ	1.79 ± 0.18	1.17 ± 0.12	1.60 ± 0.12
23-МВ	2.41 ± 0.16	2.20 ± 0.18	2.60 ± 0.23
24-МВ	3.17 ± 0.17	3.27 ± 0.33	3.31 ± 0.21
25-МВ	3.21 ± 0.22	3.83 ± 0.24	3.35 ± 0.24
26-МВ	1.98 ± 0.23	2.05 ± 0.19	1.82 ± 0.26
27-МВ	1.54 ± 0.12	2.07 ± 0.21	1.82 ± 0.15
28-МВ	3.44 ± 0.25	3.97 ± 0.27	3.82 ± 0.26
29-МВ	2.08 ± 0.23	2.16 ± 0.23	1.89 ± 0.11
30-МВ	2.17 ± 0.22	1.98 ± 0.15	1.90 ± 0.15
31-МВ	3.24 ± 0.15	3.78 ± 0.24	3.24 ± 0.13
32-МВ	2.93 ± 0.17	2.62 ± 0.26	2.35 ± 0.14
1-М	1.55 ± 0.23	1.17 ± 0.14	1.42 ± 0.10
2-М	2.33 ± 0.18	2.23 ± 0.21	2.47 ± 0.12
3-М	1.57 ± 0.15	1.25 ± 0.11	1.54 ± 0.11
4-М	1.17 ± 0.14	1.16 ± 0.10	2.05 ± 0.12
5-М	1.75 ± 0.11	1.03 ± 0.13	1.82 ± 0.13
6-М	2.36 ± 0.21	1.97 ± 0.20	1.73 ± 0.15
7-М	1.40 ± 0.12	1.47 ± 0.15	1.12 ± 0.11
8-М	1.45 ± 0.17	1.62 ± 0.16	1.35 ± 0.12
9-М	2.00 ± 0.22	1.86 ± 0.20	2.35 ± 0.21
10-М	2.69 ± 0.23	2.88 ± 0.25	2.67 ± 0.23

свойство для разработки специфичных диагностических анализов белков в многокомпонентных образцах. Однако количество образцов женского молока в этих работах было ограничено, в экспериментах был использован только конъюгат FITC-anti-hLF5, и не показана возможность определения hLF в женском молозиве. Молозиво представляет собой более сложную матрицу по сравнению со зрелым грудным молоком. Молозиво содержит больше витаминов Е, А, С и минеральных веществ (натрий, калий, хлор, кальций, цинк, медь), более высокую концентрацию сывороточных белков и незаменимых аминокислот, триптофана, гистидина и метионина, меньшую концентрацию казеина. Содержание биологически активных веществ (антител, ферментов, гормонов) в нем значительно выше [39]. Все эти компоненты могут влиять на результат эксперимента, поэтому было важно показать возможность определения hLF в молозиве методом поляризации флуоресценции с помощью флуоресцентно меченных однодомен-

ных нанотел верблюда, как это было продемонстрировано на образцах молока в работе [36]. Ранее нами было показано, что флуоресцентно меченный конъюгат FITC-anti-hLF5 специфично и точно определяет hLF в образцах женского грудного молока. В данной работе мы хотели апробировать метод FPIA с применением в качестве распознающих реагентов двух конъюгатов FITC-anti-hLF5 и FITC-anti-hLF16 на 32 образцах женского молозива и 10 образцах молока, и сравнить результаты определения с новым методом ELISA.

В данной работе были получены и охарактеризованы конъюгаты нанотел с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), FITC-anti-hLF5 и FITC-anti-hLF16, при различных соотношениях FITC : белок – 1 : 1; 1 : 2 и 1 : 3. Молярное соотношение антител/FITC было определено спектрофотометрически в 10 мМ фосфатном буферном растворе (PBS, pH 7.4) по уравнению 1. Примеры спектров для FITC-anti-hLF16 приведены на рис. 4.

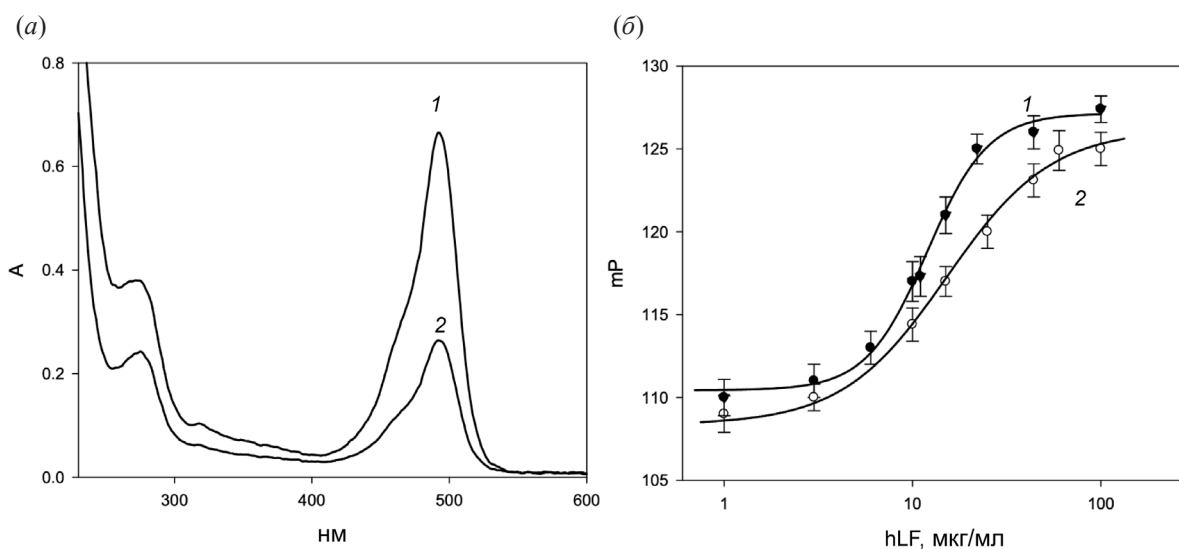


Рис. 4. (а) – УФ-видимые спектры флуоресцентно меченных нанотел верблюда anti-hLF16; (б) – зависимости изменения сигнала FP при связывании anti-hLF16 с различными концентрациями hLF при варьировании соотношения нанотело/краситель: кривая 1 – 1 : 2 и кривая 2 – 1 : 1.

Мы полагали, что увеличение степени модификации нанотел флуоресцеином позволит снизить предел обнаружения hLF, однако этого достичь не удалось, так как дальнейшее увеличение концентрации красителя не приводило к снижению предела обнаружения (LOD), 5.0 ± 0.1 и 5.6 ± 0.1 мкг/мл для конъюгатов anti-hLF16 (1 : 1) и (1 : 2), соответственно. Конъюгат anti-hLF16(1 : 3) не продемонстрировал существенного изменения сигнала при связывании с hLF. Подобную зависимость наблюдали и для конъюгатов anti-hLF5. Ве-

роятно, это связано с экранированием связывающих эпитопов на нанотелах флуоресцеином и возникновением стерических затруднений. Поэтому модификация нанотел с соотношением краситель : белок (1 : 1) выбрана как оптимальная.

Метод FPIA относится к методам смешал/измерил, что выступает его большим преимуществом. Мы использовали прямой формат FPIA, для этого готовили раствор флуоресцентно меченных нанотел FITC-anti-hLF5 и FITC-anti-hLF16 с концентрацией 5 нМ и добавляли 50 мкл стандарт-

ных растворов hLF. На рис. 5 приведены калибровочные зависимости для определения hLF методом FPIA, применяя в качестве распознающих реагентов FITC-anti-hLF5 и FITC-anti-hLF16. Как видно, с конъюгатом FITC-anti-hLF16 удалось получить чувствительный анализ, предел обнаружения составил 5.0 ± 0.1 мкг/мл. По данным зависимостям были определены концентрации hLF в образцах молозива (МВ) и молока (М) человека, результаты представлены в табл. 4.

Как видно из данных табл. 4 все результаты, полученные методами FPIA и ELISA, сопоставимы между собой. Сравнение результатов определения hLF в молоке и молозиве человека с использованием двух флуоресцентных конъюгатов FITC-anti-hLF5 и FITC-anti-hLF16 методом FPIA и разработанным одностадийным ELISA представлены на рис. 6.

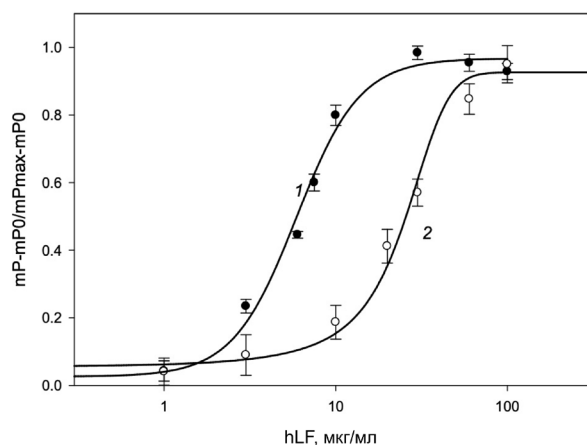


Рис. 5. Зависимость изменения сигнала FP от концентрации hLF при связывании с FITC-anti-hLF16 (1) и FITC-anti-hLF5 (2).

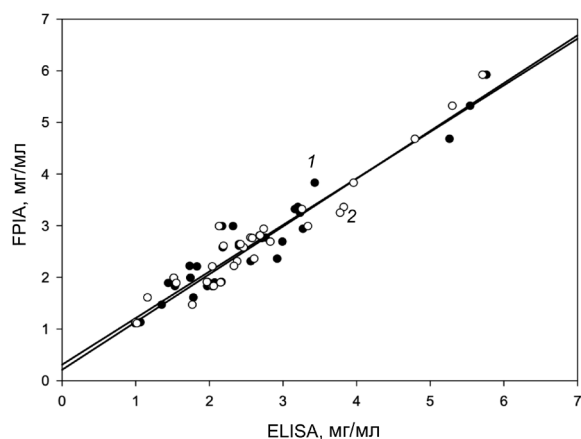


Рис. 6. Сравнение методов определения активности лактоферрина методом FPIA используя два флуоресцентно меченных нанотел FITC-anti-hLF5 (1) и FITC-anti-hLF16 (2) и ELISA. (1) $y = 0.31 + 0.90 \cdot x$ ($R^2 = 0.92$) и (2) $y = 0.21 + 0.92 \cdot x$ ($R^2 = 0.93$).

Наклон уравнения линейной регрессии и коэффициент корреляции (R^2) между FPIA и ELISA были близки к 1, что указывает на хорошую корреляцию между результатами обнаружения FPIA и ELISA (рис. 6). Можно сделать вывод о том, что оба метода можно использовать для определения лактоферрина в женском молоке и молозиве.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

FITC (флуоресцеинизотионат, изомер 1), человеческий лактоферрин (hLF), человеческий трансферрин (hTF), бычий сывороточный альбумин (BSA), человеческий сывороточный альбумин (HSA), казеин (Sigma-Aldrich, США), верблюжий наноанти-тела против человеческого лактоферрина anti-hLF5 (20.1 кДа) и anti-hLF16 (20.0 кДа) получены авторами статьи [28], мышинные моноклональные антитела XL38 и XL61, и антитела меченные пероксидазой хрена XL38-HRP и XL61-HRP, антисыворотка кролика против лактоферрина человека As283/U1/2408 (ООО XEMA, Россия). Планшеты разборные 96-луночные высокосорбционные, (ООО XEMA, Россия).

Буферные растворы: 50 mM карбонат/бикарбонатном буфере pH 9 (CB) и 25 mM фосфатный буфер pH 7.4 содержащий 0.15 M NaCl (PBS).

Измерения сигнала FP проводили с использованием портативного флуориметра Sentry 200 (Ellie, США) ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 495/530 нм), оптическую плотность растворов при 450 нм измеряли на микропланшетном фотометре Bio-Rad 680, (Bio-Rad Laboratories Inc., США).

Получение и подготовка образцов молока и молозива. Материалом исследования послужило грудное молоко и молозиво, полученное от здоровых доноров-родильниц в период 2023–2024 гг. Всего в исследовании приняли участие $n = 42$ роженицы, подписавшие информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Исследуемая когорта родильниц представляла широкий возрастной диапазон (18–44 лет), в среднем 30.17 ± 5.7 лет. Абсолютный критерий включения в исследование — отсутствие тяжелой соматической и экстрагенитальной патологии у пациентки. Относительными критериями включения: одноплодная беременность в доношенном сроке гестации, самопроизвольные роды через естественные родовые пути, обеспечение грудного вскармливания новорожденному ребенку и его совместное пребывание с матерью в палате послеродового отделения. В микропробирки типа эппендорф объемом 2.0 мл производили сбор молозива на 1-е сутки и молока на 3-и сутки после своевременных самопроизвольных родов. Затем биологический материал замораживали и хранили при температуре -20°C до использования.

Приготовление стандартных растворов лактоферрина. Готовили растворы лактоферрина с известной концентрацией 10000, 1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 нг/мл из очищенного препарата лактоферрина в PBS.

Проведение и оптимизация ELISA анализа лактоферрина с МАb. Сорбция антител на планшеты. Моноклональные антитела XL38 и XL61 с концентрацией 5 мкг/мл в карбонатном буфере с pH 9 добавляли по 100 мкл в лунки высокосорбционных разборных 96-луночных планшетов (ООО ХЕМА, Москва, Россия) и инкубировали 18 ч при +4°C. По окончании инкубации планшет отмывали добавлением в каждую лунку 300 мкл отмывающего раствора (PBS + 0.1% TWIN 20) однократно. Затем в лунки добавляли по 100 мкл блокирующего буфера (PBS + 2% сахароза + 0.01% казеин) и инкубировали 3 ч при температуре 18–25°C. Блокирующий буфер удаляли и оставляли планшеты высушивать при температуре 18–25°C 3 суток.

Выбор пары иммунореагентов для МАb XL61 и XL38. В лунки планшета с сорбированными МАb XL61 или XL38 вносили по 100 мкл растворов hLF разных концентраций (0–10000 нг/мл) и инкубировали при 37°C 30 мин, затем планшет отмывали 3 раза внесением в каждую лунку по 300 мкл отмывающего раствора (PBS + 0.1% TWIN 20). Добавляли в лунки с лактоферрином по 100 мкл конъюгатов антител, меченных пероксидазой хрена XL38-HRP или XL61-HRP с разным разведением (1 : 10000; 1 : 20000 и 1 : 40000 раз). Инкубировали при 37°C 30 мин, затем планшет отмывали 5 раз внесением в каждую лунку по 300 мкл отмывающего раствора (PBS + 0.1% TWIN 20). В каждую лунку добавляли по 100 мкл субстратного раствора тетраметилбензидина (ТМБ). Инкубировали планшет в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин. По окончании инкубации вносили в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента (раствор серной кислоты, 5%). Измеряли оптическую плотность при 450 нм. Все эксперименты дублировали.

Построение калибровочных зависимостей с антителами XL61 и XL38. В лунку планшета с сорбированными антителами XL61 и XL38 вносили по 100 мкл растворов hLF разных концентраций (0–100 нг/мл) и инкубировали при 37°C 30 мин, затем планшет отмывали 3 раза внесением в каждую лунку по 300 мкл отмывающего раствора (PBS + 0.1% TWIN 20). Добавляли в лунки с лактоферрином по 100 мкл конъюгатов антител, меченных пероксидазой хрена XL38-HRP и XL61-HRP в выбранных разведениях. Далее поступали как в предыдущем случае. Значения оптической плотности лунок с градуировочным пробам используют для построения градуи-

ровочной кривой с помощью графика линейного вида. За результат измерений лактоферрина в исследуемой пробе принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений по формуле:

$$\bar{x} = (x_1 + x_2) / 2.$$

Проведение и оптимизация ELISA анализа hLF с антисывороткой кролика As283/U1/2408. Тестировали формат анализа с сорбированной на планшет поликлональной кроличьей антисывороткой As283/U1/2408. Растворы антисыворотки с разведением 1 : 1000, 1 : 10000, 1 : 100000, 1 : 1000000 в СВ с pH 9.0 помещали в каждую лунку по 100 мкл и инкубировали при +4°C 18 ч. Далее планшет отмывали и блокировали как описано выше.

Проверка форматов ELISA. Одностадийный ELISA. В лунку планшета с сорбированной антисывороткой вносили по 50 мкл растворов лактоферрина разных концентраций (0–100 нг/мл) и 50 мкл конъюгированного с пероксидазой хрена моноклонального антитела XL38-HRP или XL61-HRP с разными разведениями (1 : 10000; 1 : 20000 и 1 : 40000 раз). Инкубировали при 37°C 60 мин, затем планшет отмывали 5 раз внесением в каждую лунку по 300 мкл отмывающего раствора (PBS + 0.1% TWIN 20). В каждую лунку добавляли по 100 мкл ТМБ. Инкубировали планшет в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин. По окончании инкубации вносили в каждую лунку по 100 мкл раствора 5% серной кислоты. Измеряли оптическую плотность растворов при 450 нм. Все эксперименты дублировали.

Двухстадийный ELISA. В лунку планшета с сорбированной антисывороткой вносили по 100 мкл растворов лактоферрина разных концентраций (0–100 нг/мл). Инкубировали при 37°C 30 мин, затем планшет отмывали 3 раза внесением в каждую лунку по 300 мкл отмывающего раствора (PBS + 0.1% TWIN 20). Далее добавляли в лунки по 100 мкл конъюгатов антител, меченных пероксидазой хрена XL38-HRP или XL61-HRP с разными разведениями. Инкубировали при 37°C 30 мин, затем планшет отмывали 5 раз внесением в каждую лунку по 300 мкл отмывающего раствора (PBS + 0.1% TWIN 20). В каждую лунку добавляли по 100 мкл субстратного раствора тетраметилбензидина (ТМБ). Инкубировали планшет в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин. По окончании инкубации вносили в каждую лунку по 100 мкл раствор 5% серной кислоты. Измеряли оптическую плотность при 450 нм. Все эксперименты дублировали.

Получение и характеристика FITC-меченных конъюгатов anti-hLF. Нанотела анти-hLF5 и анти-hLF16, специфически распознающие hLF, были получены в периплазме бактерий с использованием ранее полученных клонов бактери-

продуцентов [38]. Затем их выделяли из периплазматического экстракта с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии, очищали и характеризовали с помощью хроматографического, электрофоретического и иммуноферментного анализов, как описано ранее [38]. Полученные нанотела anti-hLF5 и anti-hLF16 конъюгировали с FITC и спектрофотометрически оценивали количество присутствующего белка, а также степень изменения аминокрупп белка [36]. Полученные коэффициенты экстинкции, $\varepsilon_{280} = 29780 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (anti-hLF5 0.91 мг/мл) и $\varepsilon_{280} = 28260 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (anti-hLF16 0.87 мг/мл), были использованы для расчета концентраций антител [32]. Молярный коэффициент экстинкции FITC составлял $73000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Характеристику полученных иммуноконъюгатов проводили спектрофотометрически в 10 mM PBS (pH 7.4) по уравнению (1):

$$\text{anti-hLF}/\text{FITC} = \frac{A_{492} * \varepsilon_{\text{anti-hLF}}}{(A_{280} - C * A_{492}) * \varepsilon_{\text{FITC}}}, \quad (1)$$

где A_{492} – оптическая плотность на длине волны максимума поглощения FITC (492 нм), A_{280} – оптическая плотность на длине волны максимума поглощения антител (280 нм), $\varepsilon_{\text{anti-hLF}}$ – молярный коэффициент экстинкции антитела на длине волны 280 нм, $\varepsilon_{\text{FITC}}$ – молярный коэффициент экстинкции FITC на длине волны максимума поглощения, C-фактор коррекции для FITC на длине волны 280 нм ($c = 0.35$).

Определение hLF методом FPIA. Растворы антител FITC-anti-hLF5 или FITC-anti-hLF16 в TWS получали с концентрацией 5 нМ. Затем 0.950 мл TWS смешивали с 0.050 мл стандартного раствора hLF в различных концентрациях (0–1000 нг/мл) и измеряли интенсивность сигнала исследуемого раствора и изменение поляризации флуоресценции (mP). Все измерения дублировали. Значения mP со стандартными растворами различных концентраций усредняли и использовали для построения градуировочной кривой. Для определения hLF образцы молока и молозива предварительно разбавляли в PBS в 100 – 150 раз и проводили измерения как описано выше.

Статистическая обработка результатов. Для статистической обработки и визуализации полученных данных использовали программы RIDAWIN (ООО XEMA) и OriginPro 2018 (Northampton, MA, USA).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан высокочувствительный ELISA и показана возможность определения лактоферрина человека в молоке и молозиве двумя иммунными методами: ELISA и FPIA. Получены конъюгаты рекомбинантных нанотел верблюда anti-hLF5

и anti-hLF16 с различным количеством модифицированных флуоресцеином групп и показано, что оптимальным соотношением белок/краситель оказалось соотношение 1 : 1. Продемонстрирована возможность определения лактоферрина человека в женском молоке и молозиве методом FPIA используя в качестве распознающих реагентов два флуоресцентно меченных рекомбинантных нанотел верблюда FITC-anti-hLF5 или FITC-anti-hLF16. Показано, что оба нанотела демонстрируют сопоставимые результаты и могут быть использованы для определения hLF. Разработаны одностадийный и двухстадийный форматы ELISA, в котором использовали в качестве сорбированного иммунореагента поликлональную сыворотку кролика, а в качестве распознающего реагента – конъюгат моноклонального антитела с пероксидазой хрена. Такое сочетание антител позволило получить высокочувствительный метод определения лактоферрина. Оба формата ELISA продемонстрировали предел обнаружения 1.25 нг/мл. Поскольку одностадийный формат требует меньше времени и манипуляций без потери чувствительности он был выбран для тестирования образцов. Были проанализированы 32 образца молозива и 10 образцов молока методами FPIA и ELISA. Показано, что оба метода дают сопоставимые результаты и могут быть использованы для определения лактоферрина человека в молоке и молозиве. Оба метода обладают высокой чувствительностью и специфичностью. Предел обнаружения ELISA более чем на три порядка ниже, чем для FPIA. Однако для определения мажорного белка молока hLF удобнее использовать быстрый гомогенный FPIA, длительность которого занимает всего 10 мин. Определение лактоферрина в физиологических жидкостях человека – важный прогностический маркер ряда заболеваний, включая онкологию, поэтому высокочувствительный ELISA метод может быть распространен и на другие физиологические жидкости человека: плазма крови, слезная жидкость, моча и т.д.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова проект № 1210415000398.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов исследований.

Информированное согласие было получено от всех участников исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

САЕ, СВТ, ЛИМ – концепция и руководство работой; ЛИМ, МКК, ТИИ, ОВС – проведение экспериментов; СВТ, ЮСЛ, ЛИМ – обсуждение результатов исследования; ЛИМ, ИВМ – написание текста; САЕ, СВТ – редактирование текста статьи.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- González-Chávez S.A., Arévalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q. // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2009. V. 33. P. 301.e1–301.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020>
- Karav S., German J., Rouquié C., Le Parc A., Barile D. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. P. 870.
<https://doi.org/10.3390/ijms18040870>
- Baker E.N., Baker H.M., Kidd R.D. // *Biochem. Cell Biol.* 2002. V. 80. P. 27–34.
<https://doi.org/10.1139/o01-153>
- Baker H.M., Baker E.N. // *Bio. Metals*. 2004. V. 17. P. 209–216.
<https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000027694.40260.70>
- Cao X., Ren Y., Lu Q., Wang K., Wu Y., Wang Y., Zhang Y., Cui X., Yang Z., Chen Z. // *Front. Nutr.* 2023. V. 9. P. 1018336.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1018336>
- Huang Y., Tao Y., Yang H., Zhang J., Yan B., Zhang H., Chen W., Fan D. // *J. Agric. Food Chem.* 2025. V. 73. P. 10665–10680.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c11535>
- Gruden Š., Poklar Ulrih N. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 11264.
<https://doi.org/10.3390/ijms222011264>
- Cornish J., Joseph R., Lin J., Irwin S., Perera J., Calton K., Hussan J., Wen J., Crawford H., Matthews B.G., Ashton N.N., Williams D., Baker H.M., Baker E.N., Swift S. // *Biochem. Cell Biol.* 2025. V. 103. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1139/bcb-2024-0101>
- Hu Z., Li W., Wei L., Ma J. // *Biochim. Biophys. Acta BBA – Rev. Cancer*. 2025. V. 1880. P. 189330.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2025.189330>
- Kulesza-Bronczyk B., Bień A., Sobieraj P., Orczyk-Pawilowicz M., Lis-Kuberka J., Czosnykowska-Lukacka M., Bzikowska-Jura A. // *Sci. Rep.* 2023. V. 13. P. 22434.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-50124-1>
- Zhou Y., Duan Y., Jiang S., Zhang Y., Liu M., Gu X., Li Y., Zhang N., Jiang R., Yang Z., Lai J. // *Pediatr. Res.* 2025 may 9.
<https://doi.org/10.1038/s41390-025-04109-7>
- Kim B.J., Kuhfeld R.F., Haas J.L., Anaya Y.M., Martinez R.R., Sah B.N.P., Breen B., Newsham K., Malinczak C.-A., Dallas D.C. // *Nutrients*. 2024. V. 16. P. 2360.
<https://doi.org/10.3390/nu16142360>
- Sadchikov P.E., Goldman I.G., Namazova-Baranova L.S., Yatsik G.V., Borovik T.E., Chernousov A.D., Romanchenko A.I., Sadchikova E.R., Lukoyanova O.L., Zvonkova N.G. // *Pediatr. Pharmacol. (New York)*. 2016. V. 13. P. 607–613.
<https://doi.org/10.15690/pf.v13i6.1677>
- Gawel P., Lukianowski B., Kościelska-Kasprzak K., Bartoszek D., Krajewska M., Królak-Olejnik B. // *Biomedicines*. 2024. V. 12. P. 1120.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines12051120>
- Lang J., Yang N., Deng J., Liu K., Yang P., Zhang G., Jiang C. // *PLoS ONE*. 2011. V. 6. P. e23710.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023710>
- Piacentini R., Centi L., Miotto M., Milanetti E., Di Rienzo L., Pitea M., Piazza P., Ruocco G., Boffi A., Parisi G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 5436.
<https://doi.org/10.3390/ijms23105436>
- Conesa C., Bellés A., Grasa L., Sánchez L. // *Pharmaceutics*. 2023. V. 15. P. 1569.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061569>
- Telang S. // *Nutrients*. 2018. V. 10. P. 1228.
<https://doi.org/10.3390/nu10091228>
- Briana D.D., Papadopoulou A., Syridou G., Marchisio E., Kapsabeli E., Daskalaki A., Papaevangelou V. // *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2022. V. 35. P. 6704–6707.
<https://doi.org/10.1080/14767058.2021.1920010>
- Pillai A., Jhaveri I., Sakthar S., Kabra N. // *Int. Breastfeed. J.* 2022. V. 17. P. 30.
<https://doi.org/10.1186/s13006-022-00471-y>
- Keikha M., Shayan-Moghadam R., Bahreynian M., Kelishadi R. // *Int. Breastfeed. J.* 2021. V. 16. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/s13006-020-00354-0>
- Chrustek A., Dombrowska-Pali A., Olszewska-Slonina D. // *PLOS ONE*. 2021. V. 16. P. e0255252.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255252>
- Villavicencio A., Rueda M.S., Turin C.G., Ochoa T.J. // *Biochem. Cell Biol.* 2017. V. 95. P. 12–21.
<https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0060>
- Morello R., De Rose C., Martino L., Raffaelli F., Zampino G., Valentini P., Buonsenso D. // *Ital. J. Pediatr.* 2025. V. 51. P. 119.
<https://doi.org/10.1186/s13052-025-01961-5>
- Ashraf M.F., Zubair D., Bashir M.N., Alagawany M., Ahmed S., Shah Q.A., Buzdar J.A., Arain M.A. // *Biol. Trace Elem. Res.* 2024. V. 202. P. 56–72.
<https://doi.org/10.1007/s12011-023-03658-4>
- Peroni D.G., Fanos V. // *Acta Paediatr.* 2020. V. 109. P. 2139–2140.
<https://doi.org/10.1111/apa.15417>
- Ostertag F., Grimm V.J., Hinrichs J. // *Food Chem.* 2025. V. 463. P. 141365.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141365>
- Sindi A.S., Stinson L.F., Lai C.T., Gridneva Z., Leghi G.E., Netting M.J., Wlodek M.E., Muhlhausler B.S., Zhou X., Payne M.S., Geddes D.T. // *J. Nutr. Biochem.* 2025. V. 135. P. 109760.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2024.109760>

29. Parra-Saavedra K.J., Macias-Lamas A.M., Silva-Jara J.M., Solís-Pacheco J.R., Ortiz-Lazareno P.C., Aguilar-Uscanga B.R. // *J. Food Sci. Technol.* 2022. V. 59. P. 4907–4914.
<https://doi.org/10.1007/s13197-022-05579-x>
30. Oberčkal J., Liaqat H., Matijašić B.B., Rozman V., Treven P. // *J. Chromatogr. B.* 2023. V. 1214. P. 123548.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123548>
31. Zhang J., Lai S., Cai Z., Chen Q., Huang B., Ren Y. // *Anal. Chim. Acta.* 2014. V. 829. P. 33–39.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.025>
32. Zhang Y., Lou F., Wu W., Dong X., Ren J., Shen Q. // *J. AOAC Int.* 2017. V. 100. P. 133–138.
<https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0259>
33. Chen H., Wang Z., Fan F., Shi P., Xu X., Du M., Wang C. // *eFood.* 2021. V. 2. P. 147–153.
<https://doi.org/10.2991/efood.k.210720.001>
34. Tanaka M., Date M., Mizuno K. // *Int. Breastfeed. J.* 2024. V. 19. P. 74.
<https://doi.org/10.1186/s13006-024-00680-7>
35. Alhalwani A. // *Curr. Anal. Chem.* 2024. V. 20. P. 209–216.
<https://doi.org/10.2174/0115734110298646240206061830>
36. Mukhametova L.I., Eremin S.A., Arutyunyan D.A., Goryainova O.S., Ivanova T.I., Tillib S.V. // *Biochem. Moscow.* 2022. V. 87. P. 1679–1688.
<https://doi.org/10.1134/S0006297922120227>
37. Mukhametova L.I., Eremin S.A. // *Front. Biosci.-Elite.* 2024. V. 16. P. 4.
<https://doi.org/10.31083/j.fbe1601004>
38. Tillib S.V., Privezentseva M.E., Ivanova T.I., Vasilev L.F., Efimov G.A., Gursky Y.G., Georgiev G.P., Goldman I.L., Sadchikova E.R. // *J. Chromatogr. B.* 2014. V. 949–950. P. 48–57.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.12.034>
39. Bezkorovainy A. // *J. Dairy Sci.* 1977. V. 60. P. 1023–1037.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83984-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83984-2)
40. Shen W., Xuan Z., Liu H., Huang K., Guan X., Guo B. // *Foods.* 2024. V. 13. P. 953.
<https://doi.org/10.3390/foods13060953>
41. Janssen P.T., Van Bijsterveld O.P. // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1983. V. 220. P. 171–174.
<https://doi.org/10.1007/BF02186663>
42. Alhalwani A.Y., Repine J.E., Knowles M.K., Hufman J.A. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. P. 1389–1396.
<https://doi.org/10.1007/s00216-017-0779-7>

Prospects for Determining Lactoferrin in Human Milk and Colostrum Using Immunological Diagnostic Methods

L. I. Mukhametova^{* #}, S. A. Eremin^{*}, M. K. Kolokolova^{*}, Yu. S. Lebedin^{**}, I. V. Mikhura^{***},
O. V. Stetsiuk^{****}, T. I. Ivanova^{*****}, and S. V. Tillib^{***** #}

[#]E-mail: liliya106@mail.ru; tillib@genebiology.ru

^{*} Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, ul. Leninskie Gory, 1/3 119991 Moscow, Russia

^{**} XEMA, 9-ya Parkovaya ul., 48/4, Moscow, 125319 Russia

^{***} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{****} Savelyeva Perinatal Center City Clinical Hospital No. 31, ul. Novatorov, 3, Moscow, 119421 Russia

^{*****} Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 34/5, Moscow, 119334 Russia

Human lactoferrin (hLF) is a multifunctional glycoprotein with beneficial properties: immunomodulatory, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, and antioxidant. hLF, present in breast milk, provides natural protection for newborns against infections. Testing the quality of breast milk and colostrum is an important task that allows for the adjustment of infant nutrition. There are numerous methods for determining hLF, with instrumental and immunoassays being the most commonly used. However, simple and rapid methods are needed. Previously, we demonstrated the possibility of determining hLF using polarization fluorescence immunoassay (FPIA) with fluorescently labeled recombinant camelid nanobodies, which took no more than 10 min. This work shows the possibility of determining hLF in colostrum samples, which differs in composition from milk. A one-step enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using polyclonal and monoclonal antibodies has been developed, allowing for faster and minimal-step determination of hLF in milk and colostrum. The detection limit of ELISA was 1.25 ng/mL. Using FPIA and ELISA methods, 32 colostrum samples and 10 milk samples were tested. The results of hLF determination in milk and colostrum using FPIA and ELISA were comparable. The developed highly sensitive one-step ELISA can also be extended to other human physiological fluids, such as tear fluid or urine.

Keywords: human lactoferrin, nanobodies, polarization fluorescence immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay