

ИЗМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ГРУДНОГО МОЛОКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПЕРИОДА ЛАКТАЦИИ И СРОКА ХРАНЕНИЯ*Костычева Е. М.,**Зотин А. А.**Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН***АННОТАЦИЯ.**

Проведено исследование изменения концентрации клеток и клеточного состава грудного молока в зависимости от срока лактации и хранения сцеженного молока. В грудном молоке обнаружено семь типов клеток, основные из которых – пенные клетки, лимфоциты и нейтрофилы. Реже встречаются моноциты. Макрофаги, базофилы и эпителиальные клетки обнаруживаются редко и, вероятно, попадают в молоко случайно. Наибольшая концентрация клеток в молоке наблюдается в молозиве и при прекращении кормления (2–29 тысяч клеток/мл). Повышенное содержание клеток в эти периоды в большой степени связано с пенными клетками. В переходном и зрелом молоке концентрация клеток существенно меньше (80–700 клеток/мл). В основном это лимфоциты и нейтрофилы, реже – моноциты. Изменения концентрации какого-либо типа клеток в переходном и зрелом молоке в зависимости от срока кормления не обнаружено. При хранении молока при 4°C содержание клеток уменьшается с разной скоростью для разных клеточных типов. Среднее время жизни лимфоцитов составляет 3.2 сут., пенных клеток – 2.1 сут, моноцитов – 1.8 сут., нейтрофилов – 1.2 сут.

Ключевые слова: грудное молоко, концентрация клеток, клеточный состав, пенные клетки, лимфоциты, нейтрофилы

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения основным фактором, влияющим на здоровье человека, является его образ жизни, в том числе питание. Для развивающегося детского организма здоровое питание особенно важно. Лучшей его формой для маленького ребенка, согласно рекомендациям ВОЗ, является грудное молоко. Оно имеет уникальный состав и не только является источником всех необходимых ребенку питательных веществ, но и содержит большое количество защитных факторов, обеспечивающих пассивный иммунитет и дальнейшее развитие собственного иммунитета ребенка. Материнские клетки защищают ребенка от инфекций и способствуют развитию собственной защиты. Накопленные данные свидетельствуют о существенном влиянии грудного вскармливания на снижение риска многих острых и хронических заболеваний. Следует отметить, что клетки грудного молока не только функционируют в организме ребенка, но и защищают молочную железу от инфекции во время лактации (Аверьянова, Артеменко, 2006; Котлуков и др. 2011; Newman, 2011; Дементьева, 2015; Hassiotou, Geddes, 2015).

Количественный и качественный состав клеток различается в зависимости от ряда факторов. Большинство исследователей отмечают существенное различие в клеточном составе грудного молока на разных стадиях лактации. Максимальное количество лейкоцитов наблюдается в молозиве (Дементьева, 2015). К концу 1-й недели после родов число этих клеток быстро уменьшается. Переходное и зрелое молоко характеризуются очень низким содержанием лейкоцитов при условии, что и мать и ребенок здоровы (Hassiotou, Geddes, 2015).

Число лейкоцитов в грудном молоке увеличивается на стадии инволюции (после прекращения кормления). Показано, что фагоциты в грудном молоке на этой стадии участвуют не только в удалении молока из молочных желез, но и в удалении

эпителиальных клеток железистой ткани (O'Brien et al., 2012).

Важный вопрос, касающийся клеточного состава молока, – изменение количества и состава клеток в зависимости от срока хранения сцеженного молока. Изучение этого вопроса поможет выявить максимальное время хранения грудного молока, за которое его клеточный состав менее всего изменяется, что поможет предоставлять более надежную иммунную защиту детям, вскармливаемым сцеженным грудным молоком.

Цель данной работы – изучение закономерностей изменения клеточного состава грудного молока в зависимости от срока лактации и времени хранения сцеженного молока.

Материалы и методы.

Исследовано молоко, полученное методом сцеживания от кормящих матерей на разных стадиях лактации и от матерей, прекративших кормление. Использовали только что сцеженное или хранящееся от 1 до 8 сут при 4°C молоко. Сведения о взятых пробах молока приведены в табл. 1. Всего исследовано 26 проб молока от 26 матерей.

Клетки окрашивали по Хилькевичу (Кузьмич, 2019): к 10 мл молока добавляли смесь, состоящую из 0,3 мл красителя "ЭКОлаб-Гем-Романовский" (ЗАО ЭКОлаб, Россия) и 1 мл фосфатного буфера, и выдерживали 30-40 мин. Полученную клеточную взвесь использовали для подсчета концентрации клеток в камере Горяева и изготовления мазков.

При оценке концентрации клеток учитывали только живые клетки. Для этого часть мазков окрашивали 0,4% раствором трипанового синего (ООО НПП "ПанЭко", Россия), и рассчитывали долю окрашенных (погибших) клеток под микроскопом (Руководство..., 1965-1966). Число подсчитанных клеток составляло не менее 100 для каждого.

Таблица 1. Характеристика исследованных проб молока.

№ пробы	Дата взятия пробы	Пол ребенка	Возраст ребенка
Молозиво			
1	08.11.2017	Мальчик	2 дня
Переходное молоко			
2	22.11.2017	Мальчик	4 дня
3	12.11.2017	Девочка	5 дней
4	15.12.2017	Мальчик	2 нед.
Зрелое молоко			
5	22.12.2017	Мальчик	3 нед.
6	22.12.2017	Девочка	1 мес
7	25.11.2017	Девочка	2.5 мес
8	07.12.2017	Мальчик	4 мес
9	22.12.2017	Девочка	5 мес
10	15.12.2017	Мальчик	9 мес
11	15.12.2017	Мальчик	9 мес
12	26.10.2017	Мальчик	12 мес
13	22.12.2017	Девочка	12 мес
14	13.10.2017	Девочка	14 мес
15	30.11.2017	Мальчик	14.5 мес
16	30.11.2017	Мальчик	15 мес
17	15.12.2017	Девочка	16 мес
18	25.11.2017	Мальчик	17 мес
19	30.09.2017	Девочка	17.5 мес
20	28.10.2017	Девочка	18 мес
21	26.10.2017	Мальчик	24 мес
22	22.12.2017	Мальчик	27 мес
23	15.12.2017	Мальчик	48 мес
Прекрытие кормления			
24 ¹	18.11.2017	Мальчик	3 мес
25 ²	18.11.2017	Мальчик	24 мес
26 ³	08.11.2017	Мальчик	48 мес

Примечания. Срок прекращения кормления: ¹ – 2.3 мес; ² – 1.5 мес; ³ – 7 мес.

Клеточную формулу (долю каждого типа клеток), определяли на окрашенных по Хилькевичу мазках, подсчитывая не менее 100 клеток на каждом препарате.

Среднее время жизни (T) клеток при хранении молока рассчитывали по формуле:

$$T = \sum_{i=1}^8 i(p_{i-1} - p_i)$$

где p_{i-1} , p_i – концентрация данного типа клеток после $i-1$ и i дней хранения соответственно, отнесенная к концентрации этих клеток в молоке после взятия пробы ($i = 0$).

Зависимость концентрации клеток (y) от срока лактации (x) оценивали с помощью корреляционного отношения $\eta(y/x)$ (Ивантер, Коросов, 2010).

Рассчитывали также средние значения и стандартную ошибку среднего для измеренных параметров.

Результаты и обсуждение

Изменение клеточного состава молока в зависимости от срока лактации

Наиболее распространены в грудном молоке три типа клеток: лимфоциты, нейтрофилы и пенистые клетки. В значительно меньших количествах присутствуют еще четыре типа клеток: базофилы,

моноциты, макрофаги и эпителиальные клетки (рис. 1). Такой клеточный состав соответствует литературным данным (Witkowska-Zimny et al., 1917).

Клеточный состав молока в разных пробах различен. Наиболее часто встречаются лимфоциты – у 95.7% матерей (не были найдены только у одной матери, закончившей кормление). Нейтрофилы обнаружены в 73.9% проб, пенистые клетки – в 73.9% проб, моноциты – в 34.8% проб, макрофаги – в 13.0% проб, базофилы – в 8.7% проб.

Общая концентрация клеток

Концентрация всех клеток на различных сроках лактации представлена в табл. 2. В молозиве она составляет около 11 тыс. клеток/мл, затем резко падает до 80–700 клеток/мл в переходном и зрелом молоке и вновь возрастает при инволюции до 2000–29000 клеток/мл. Концентрация клеток в переходном и зрелом молоке широко варьирует и составляет в среднем 326 ± 40 клеток/мл ($n = 19$). (отличие корреляционного отношения $\eta = 0.22 \pm 0.26$ от 0 не достоверно). То есть, в этот период зависимости концентрации клеток от срока лактации не наблюдается. При инволюции концентрация клеток вновь увеличивается, варьируя от 1890 до 29415 клеток/мл (рис. 2).

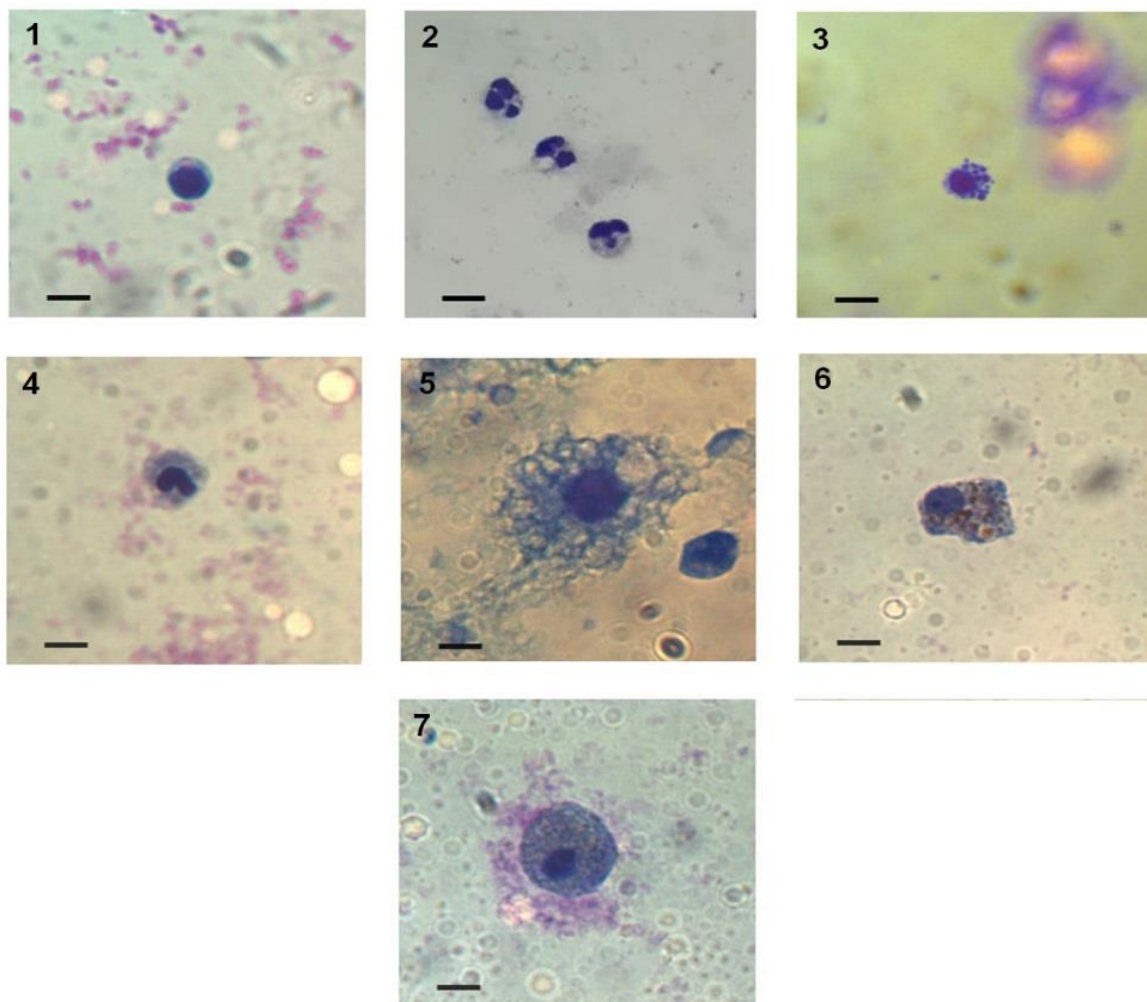


Рисунок 1. Клеточные типы, встречающиеся в грудном молоке.
1 – лимфоцит; 2 – сегментоядерные клетки; 3 – базофил; 4 – моноцит; 5 – макрофаг;
6 – эпителиальная клетка; 7 – пеннистая клетка. Масштабная линейка – 10 мкм.

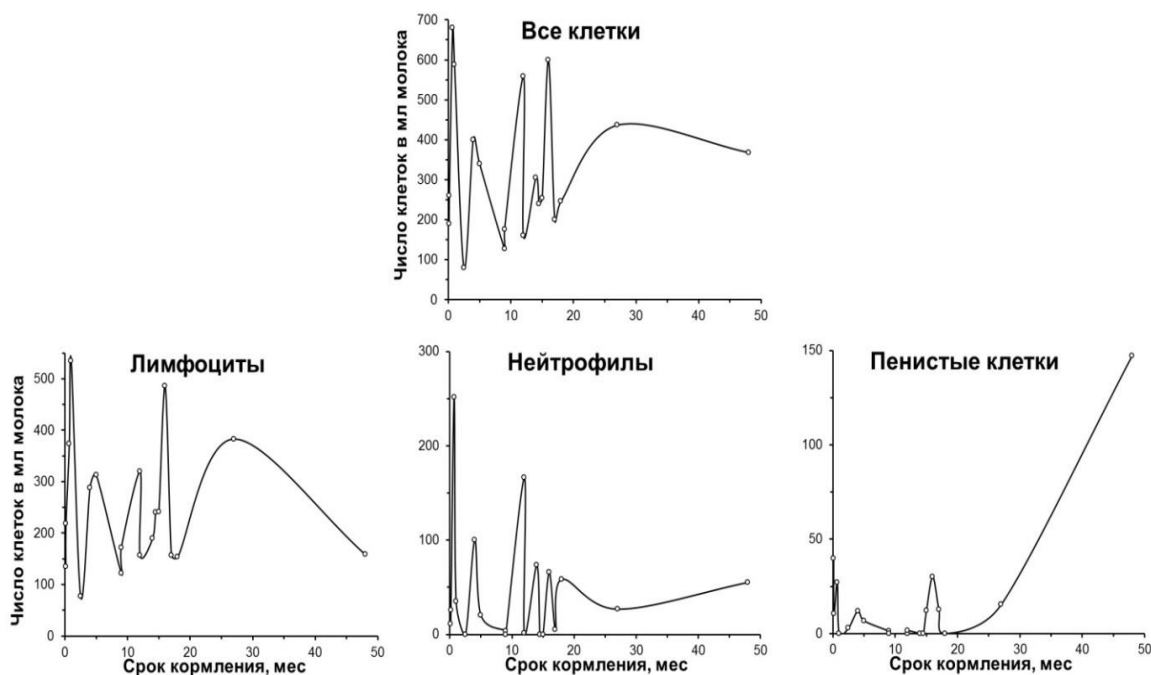


Рисунок 2. Изменение концентрации клеток в переходном и зрелом молоке в зависимости от срока кормления.

Таблица 2. Количество клеток в 1 мл молока и процент клеточных типов на разных стадиях лактации.

Срок лактации (мес)	Всего	Лимфоциты	Нейтрофилы	Моноциты	Пенистые клетки	Макрофаги	Базофилы
Молозиво							
0.07	11285	4728 (41.9%)	0	76 (0.7%)	6481 (57.4%)	0	0
Переходное молоко							
0.13	190	135 (71.0%)	11 (6.0%)	2 (1.0%)	40 (21.0%)	0	2 (1.0%)
0.17	260	218 (84.0%)	26 (10.0%)	5 (2.0%)	10 (4.0%)	0	0
Зрелое молоко							
0.70	680	374 (5.0%)	252 (37.0%)	27 (4.0%)	27 (4.0%)	0	0
1	588	535 (91.0%)	35 (6.0%)	18 (3.0%)	0	0	0
2.5	80	77 (96.4%)	0	0	3 (3.6%)	0	0
4	400	288 (72.0%)	100 (25.0%)	0	12 (3.0%)	0	0
5	340	313 (92.0%)	20 (6.0%)	0	7 (2.0%)	0	0
9	127	122 (96.0%)	4 (3.0%)	0	1 (1.0%)	0	0
9	176	172 (97.3%)	0	5 (2.7%)	0	0	0
12	558	320 (57.3%)	166 (29.8%)	57 (10.2%)	0	0	15 (2.7%)
12	160	157 (98.0%)	2 (1.0%)	0	2 (1.0%)	0	0
14	306	189 (62.0%)	73 (24.0%)	34 (11.0%)	0	9 (3.0%)	0
14.5	240	240 (100.0%)	0	0	0	0	0
15	254	241 (95.2%)	0	0	12 (4.8%)	0	0
16	600	486 (81.0%)	66 (11.0%)	18 (3.0%)	30 (5.0%)	0	0
17	192	157 (81.6%)	5 (2.6%)	15 (7.9%)	13 (6.6%)	3 (1.3%)	0
18	246	153 (62.3%)	58 (23.8%)	8 (3.3%)	0	4 (1.6%)	22 (9.0%)
27	437	383 (87.7%)	27 (6.1%)	11 (2.6%)	15 (3.5%)	0	0
48	368	158 (43.0%)	55 (15.0%)	7 (2.0%)	147 (40.0%)	0	0
Прекращение кормления							
1.5*	5100	232 (4.5%)	193 (3.8%)	0	4675 (91.7%)	0	0
2.3*	29415	1889 (6.4%)	9985 (33.9%)	0	17541 (59.6%)	0	0
7*	1890	0	0	0	1890 (100.0%)	0	0

Примечание. * – срок после прекращения кормления, мес.

Концентрация клеток в молоке существенно различается по данным разных авторов. Полученные в ходе работы данные наиболее близко соответствуют сведениям, приводимым в на сайте Світмам... (2019), в работах Какулас (Kakulas, 2013) и Хассиоту и Гедес (Hassiotou, Geddes, 2015).

Наблюдаемое резкое снижение концентрации клеток при превращении молозива в переходное молоко совпадает с данными практически всех исследователей (Kakulas, 2013; Шипенко, 2015; Hassiotou, Geddes, 2015; Світмам..., 2019).

Пенистые клетки

Пенистые клетки составляют основную часть клеток молозива. Их концентрация составляет около 6.5 тысяч клеток/мл. В переходном молоке она резко снижается до приблизительно 25 клеток/мл. В зрелом молоке пенистые клетки встречаются редко вплоть до 27 мес. кормления. Их концентрация в этот период составляет в среднем 8 ± 2 клеток/мл ($n = 16$). Увеличение концентрации пенистых клеток до 147 клеток/мл отмечается при кормлении в течение 4 лет (рис. 2). Если не учитывать

данные для столь долгого срока кормления, то можно заключить, что концентрация пенистых клеток в переходном и зрелом молоке не зависит от срока лактации (отличие $\eta = 0.49 \pm 0.29$ от 0 не достоверно). При инволюции концентрация пенистых клеток резко увеличивается вплоть до уровня, наблюдаемого в молозиве, варьируя от 1.9 до 17.5 тысяч клеток/мл (табл. 2).

Пенистые клетки принадлежат к клеткам макрофагального ряда. Изменение их концентрации в молоке на разных стадиях лактации тесно связано с физиологическими перестройками, происходящими в молочной железе при становлении лактации и при инволюции (Андреева, 2006). В других органах пенистые клетки формируются обычно при протекании патологических процессов (Душкин, 2012), связанных с необходимостью осуществления фагоцитоза. Можно предположить, что появление пенистых клеток отражает процессы перестройки в тканях молочной железы и не имеет отношения к физиологическому состоянию ребенка.

Лимфоциты

Концентрация лимфоцитов в молозиве составляет около 4,7 тысяч клеток/мл. В переходном молоке она резко падает приблизительно до 200 клеток/мл (табл. 2). В зрелом молоке концентрация лимфоцитов колеблется от 77 до 535 клеток/мл. В среднем для переходного и зрелого молока она составляет 248 ± 29 клеток/мл ($n = 19$). Зависимости концентрации лимфоцитов от времени лактации не наблюдается (отличие $\eta = 0.32 \pm 0.25$ от 0 не достоверно) (рис. 2). При инволюции этот параметр широко варьирует от 0 до 1889 клеток/мл (табл. 2).

Как известно, лимфоциты ответственны за осуществление специфических иммунных реакций. Наличие этих клеток в молоке, по-видимому, связано с необходимостью поддерживать иммунитет младенца до тех пор, пока у него не сформируется собственная иммунная система. Лимфоциты осуществляют защиту от болезнетворных организмов не только в пределах желудочно-кишечного тракта, но и в организме ребенка (Kakulas, 2013).

Нейтрофилы

В молозиве нейтрофилы не обнаружены. Они появляются в переходном молоке в небольших количествах (около 20 клеток/мл). Их концентрация увеличивается в зрелом молоке, где она варьирует от 0 до 250 клеток/мл. Для переходного и зрелого молока концентрация нейтрофилов составляет в

среднем 47 ± 15 клеток/мл ($n = 19$). Зависимости концентрации нейтрофилов от времени лактации на этих стадиях не наблюдается (отличие $\eta = 0.32 \pm 0.25$ от 0 не достоверно) (рис. 2). При инволюции концентрация нейтрофилов широко варьирует от 0 до 10000 клеток/мл (табл. 2).

Считается, что нейтрофилы осуществляют фагоцитарную функцию в кишечнике младенца (Hassiotou, Geddes, 2015). Отсутствие нейтрофилов в некоторых пробах молока свидетельствует о том, что эти клетки либо не являются необходимыми для ребенка, либо они осуществляют защиту ребенка в определенных ситуациях, таких как повышенный риск заболевания из-за болезни матери или неблагоприятных условий внешней среды.

Моноциты

Концентрация моноцитов в молоке на всех этапах лактации сравнительно невелика. Наибольшая – в молозиве (78 клеток/мл). В переходном и зрелом молоке она колеблется от 0 до 57 клеток/мл (в среднем 11 ± 3 клеток/мл; $n = 19$). Зависимости концентрации моноцитов от времени лактации не наблюдается (отличие $\eta = 0.10 \pm 0.27$ от 0 не достоверно) (табл. 2). При инволюции моноциты не обнаружены.

Относительно небольшая концентрация моноцитов в молоке свидетельствует об их незначительной роли в поддержании иммунитета у ребенка.

Таблица 3. Изменение концентрации клеток молока (клеток/мл) на разных стадиях лактации при хранении.

Срок хранения (сут)	Всего	Лимфоциты	Нейтрофилы	Моноциты	Пенистые клетки	Макрофаги	Базофилы
Молозиво (2 дня кормления, проба № 1)							
0	11285	4728	0	76	6481	0	0
1	9254	3277	0	64	5912	0	0
2	7561	3329	0	113	4119	0	0
3	6907	3152	0	46	3709	0	0
4	6771	2781	0	242	3748	0	0
5	5643	2031	0	0	3611	0	0
6	3879	1401	0	0	2478	0	0
7	1016	534	0	0	482	0	0
8	418	255	0	0	163	0	0
Зрелое молоко (3 нед. кормления, проба № 5)							
0	680	374	252	27	27	0	0
1	480	360	91	10	19	0	0
2	334	242	70	8	13	0	0
3	165	130	21	5	8	0	0
4	86	76	3	1	6	0	0
5	53	49	1	0	3	0	0
6	24	22	0	0	1	0	0
7	12	11	0	0	1	0	0
8	5	4	0	0	1	0	0
Зрелое молоко (1 мес. кормления, проба № 6)							
0	588	523	35	18	12	0	0
1	490	438	27	15	10	0	0
2	189	172	14	0	4	0	0
3	145	131	10	0	4	0	0
4	115	112	1	0	2	0	0
5	70	68	0	0	2	0	0

Срок хранения (сут)	Всего	Лимфоциты	Нейтрофилы	Моноциты	Пенистые клетки	Макрофаги	Базофилы
6	32	32	0	0	0	0	0
7	16	16	0	0	0	0	0
8	10	10	0	0	0	0	0
Зрелое молоко (4 мес. кормления, проба № 8)							
0	400	360	125	0	15	0	0
1	357	281	73	0	11	0	0
2	252	246	25	0	8	0	0
3	158	180	6	0	6	0	0
4	102	97	2	0	1	0	0
5	80	85	1	0	3	0	0
6	49	50	1	0	1	0	0
7	10	9	0	0	0	0	0
Зрелое молоко (12 мес. кормления, проба № 12)							
0	558	320	166	57	0	0	15
2	462	318	101	43	0	0	0
5	408	312	53	41	0	0	3
6	315	256	24	32	0	0	2
Зрелое молоко (18 мес. кормления, проба № 20)							
0	246	170	58	8	0	2	5
3	221	170	35	9	0	0	4
4	172	153	10	3	0	2	2
7	123	101	10	2	0	2	2
8	16	16	0	0	0	0	0
Инволюция (2.3 мес. после прекращения кормления, проба № 24)							
0	29550	1861	9835	0	17287	0	0
1	12760	1148	2692	0	7388	0	0
2	7304	1061	394	0	4974	0	0
3	5456	1026	409	0	3366	0	0
4	3834	728	57	0	1284	0	0
5	880	186	0	0	107	0	0
7	342	23	0	0	67	0	0

Примечание: за 0 сут. принимали день взятия пробы молока.

Макрофаги, базофилы и эпителиальные клетки

Макрофаги и базофилы обнаружены всего в трех пробах (табл. 2). Их концентрация незначительна и не превышает 20 клеток/мл. Единичные эпителиальные клетки найдены в двух пробах (№ 18 и 24). Отсутствие макрофагов, базофилов и эпителиальных клеток в большинстве проб и их незначительная концентрация в остальных пробах дает

основание полагать, что эти клетки попадают в молоко случайно.

Одиночные макрофаги, по-видимому, проникают в молоко из соединительной ткани молочной железы, базофилы – из крови, эпителиальные клетки – из стенок выводных протоков или из альвеол.