© Коллектив авторов, 2010

Petra A.M.J. Scholtens[1], Philippe Alliet[2], Marc Raes[2], Martine S. Alles[1], Hilde Kroes[1], Gaenther Boehm[1,3], Leon M.J. Knippels[1], Jan Knol[1], Yvan Vandenplas[4]

ПОВЫШЕНИЕ ФЕКАЛЬНОГО СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А У ДЕТЕЙ, ПОЛУЧАЮЩИХ АДАПТИРОВАННУЮ МОЛОЧНУЮ СМЕСЬ, ОБОГАЩЕННУЮ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫМИ ГАЛАКТООЛИГОСАХАРИДАМИ И ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫМИ ФРУКТООЛИГОСАХАРИДАМИ*

[1]Numico Research, Wageningen 6700 CA, The Netherlands; [2]Virga Jesse Hospital, Hasselt 3500, Belgium; [3]Sophia Children's Hospital, Rotterdam 3015 GJ, The Netherlands; [4]University Hospital Brussel, Brussels 1090, Belgium

В представленном двойном слепом рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании авторы изучали эффект молочной смеси, обогащенной комплексом олигосахаридов в количестве 6 г/л (короткоцепочечные галактоолигосахариды (кцГОС) и длинноцепочечные фруктоолигосахариды (дцФОС) в соотношении 9:1), на уровень фекального секреторного иммуноглобулина А (sIgA) и на состав кишечной микрофлоры (КМФ). Под наблюдением находились 215 детей первых 26 недель жизни. После прекращения грудного вскармливания дети были случайным образом распределены на 2 группы, получающие молочную смесь, обогащенную кцГОС/дцФОС, или смесь без обогащения. Анализ образцов кала проводили после 8 и 26 недель приема смесей. Концентрацию фекального sIgA определяли с использованием ELISA, состав КМФ исследовали с помощью количественного флюоресцентного метода в сочетании с гибридизацией. Обе группы детей были сравнимы по своим характеристикам; дети, получающие грудное молоко, рассматривались как референтная группа. Полное обследование было осуществлено у 187 детей. После 26 недель исследования концентрация sIgA была достоверно выше (p<0,001) у детей, получавших смесь с кцГОС/дцФОС (719 мг/г), в сравнении с контрольной группой (263 мг/г). Кроме того, в исследуемой группе отмечено более высокое содержание бифидобактерий (60,4%) в сравнении с контрольной группой (52,6%; p<0,04). Частота выявления *Clostridium spp.* составила 0% и 3,27% соответственно (p<0,006). Таким образом, использование молочной смеси, обогащенной комплексом олигосахаридов (кцГОС/дцФОС), повышает уровень фекального sIgA, что позитивно сказывается на состоянии местного иммунитета.

Ключевые слова: *младенцы, молочная смесь, олигосахариды, фекальный секреторный иммуноглобулин А, кишечная микрофлора.*

In this double-blind randomized placebo-controlled study we investigated the effect of an infant milk formula with 6 g/L short-chain galacto- and long-chain fructo-oligosaccharides [(scGOS/lcFOS) ratio 9:1] on the development of the fecal secretory immunoglobulin A (sIgA) response and on the composition of the intestinal microbiota in 215 healthy infants during the first 26 wk of life. The infants stopped received breast milk were randomized to receive an infant milk formula with or without scGOS/lcFOS. Stool samples were collected after 8 and 26 wk of intervention. The concentration of fecal sIgA was determined by ELISA, and the composition of the intestinal microbiota was determined by quantitative fluorescent in situ hybridization. The scGOS/lcFOS group and the control group were compared in the statistical analysis. A breastfed group was included as a reference. In total, 187 infants completed the study. After 26 wk of intervention, in infants that were exclusively formula fed, the concentration of sIgA was higher (p<0,001) in the scGOS/lcFOS group (719 mg/g) than in the control group (263 mg/g). In addition, the percentages of bifidobacteria were higher in the scGOS/lcFOS group (60,4%) than in the control group (52,6%; p<0,04). The percentages of *Clostridium spp.* were 0,0 and 3,27%, respectively (p<0,006). In conclusion, an infant milk formula with 6 g/L scGOS/lcFOS results in higher concentrations of fecal sIgA, suggesting a positive effect on mucosal immunity.

Key words: *infants, milk formula, oligosaccharides, fecal secretory immunoglobulin A, intestinal microbiota.*

*Исследование инициировано компанией «NUMICO» (Голландия); статья опубликована в J. Nutr. 2008; 138: 1141–1147.

Пребиотики (ПБ) олигосахариды (ОС) представляют собой особый тип диетических волокон, которые не расщепляются пищеварительными ферментами. Поэтому они достигают в неизменном виде толстого кишечника, где расщепляются с участием кишечной микрофлоры (КМФ) [1]. Состав КМФ представляет собой огромное число видов бактерий, в том числе бифидобактерии (ББ), лактобактерии (ЛБ), бактероиды, клостридии. Становление КМФ зависит от типа вскармливания, установлены ряд различий у детей на искусственном и естественном вскармливании [2]. В составе кишечной микробиоты (КМБ) детей на грудном вскармливании преобладают ББ и ЛБ, в то время как у детей на искусственном вскармливании в состав КМБ входит значительно большее число разновидностей бактерий: кроме ББ и ЛБ, также бактероиды, энтеробактерии, клостридии [2]. Важным фактором, определяющим бифидогенную направленность развития КМБ, является комплекс ОС грудного молока (ГМ) [3]. Пребиотический эффект ОС ГМ выражается в селективной ферментации этих ОС определенными видами ББ и ЛБ, что приводит к росту именно этих видов микроорганизмов и подавлению роста патогенных и условно-патогенных бактерий (УПБ).

Ряд исследований продемонстрировали эффект специфического комплекса ПБ, состоящего из короткоцепочечных галактоолигосахаридов и длинноцепочечных фруктоолигосахаридов (кцГОС/дцФОС), имеющего также название IMMUNOFORTIS, на состав КМФ у детей первого полугодия жизни (в том числе, недоношенных), а также у детей второго полугодия жизни, получавших различные виды прикорма [4–8]. Эти исследования показали, что смесь кцГОС/дцФОС индуцирует развитие КМБ с высоким содержанием ББ, причем метаболическая активность КМФ этих детей близка к таковой у детей на грудном вскармливании [7]. Продемонстрирован также позитивный эффект смеси кцГОС/дцФОС на развитие иммунной системы. В двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании, представленном Moro и соавт. [9, 10], 206 детей с высоким риском развития атопии наблюдались в течение 6 месяцев, при этом одна группа детей получала молочную смесь на основе частичного гидролизата белка, обогащенную кцГОС/дцФОС, вторая группа получала смесь без ПБ. Общее число случаев атопического дерматита было достоверно ниже в группе детей, получавших смесь с ПБ, в сравнении с контрольной группой [9, 10]. У этих детей также была ниже заболеваемость инфекционными заболеваниями. В другом исследовании 326 детей были разделены на 2 группы и получали молочные смеси с кцГОС/дцФОС или без ПБ [11]. В этом открытом проспективном исследовании также продемонстрировано, что добавление в молочную смесь кцГОС/дцФОС снижает заболеваемость инфекциями [11]. Точный механизм данного иммуномодуляторного эффекта кцГОС/дцФОС до конца еще не установлен, но имеется понимание, что медиатором этого эффекта является КМФ. Иммунный ответ новорожденных детей представлен главным образом пассивными механизмами, такими как материнские IgG, полученные через плаценту в период беременности, и материнским секреторным IgA (sIgA), поступающим с ГМ [12]. Кроме пассивного получения sIgA с ГМ, происходит постепенное развитие собственной иммунной системы ребенка и самостоятельный синтез sIgA. КМФ может играть важную роль в развитии иммунной системы, в первую очередь в развитии местного мукозального иммунитета и синтезе sIgA [13]. В исследовании Bakker-Zierikzee и соавт. [14] 38 здоровых детей на искусственном вскармливании были распределены случайным образом на 2 группы, которые получали продукт с ПБ (кцГОС/дцФОС) или без них. Период наблюдения – с рождения до 32 недель. У детей, получавших смесь с кцГОС/дцФОС, отмечено достоверно более высокий уровень sIgA после 16-недельного наблюдения. Целью нашего исследования являлось изучение влияния адаптированной молочной смеси, обогащенной кцГОС/дцФОС, на уровень продукции фекального sIgA и на состав КМБ у здоровых детей первых 26 недель жизни. Важным отличием от исследования Bakker-Zierikzee и соавт. явилось то, что первоначально дети получали ГМ и включались в исследование после прекращения грудного вскармливания.

Материалы и методы исследования

Дизайн исследования: двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое. Длительность наблюдения – 6 месяцев. Результаты, представленные в данной статье, являются частью комплексного исследования [15]. Исследование было одобрено этическим комитетом Virga Jesse hospital в Бельгии.

Беременные женщины были включены для проведения исследования в клинике Virga Jesse и в Университетской клинике Брюсселя за 4 месяца до планируемых родов. Состояние детей и возможность их включения в исследование были оценены педиатром во время нахождения в клинике после рождения. В исследование включались здоровые доношенные дети с нормальной массой тела при рождении (между 5-м и 95-м перцентилем). Дети, имеющие отягощенный аллергоанамнез, наследственную патологию, гастроинтестинальные заболевания, подозрение на аллергию к белку коровьего молока, получающие пробиотики, были исключены из исследования. Участие в исследовании, как и возможность выхода из него в любой момент были добровольными, о чем родители подписывали соответствующий документ перед началом исследования.

Дети были случайным образом разделены на 2 группы, для вскармливания которых использовались два вида смеси, отличающиеся только

по наличию/отсутствию кцГОС/дцФОС в соотношении 9:1 (произведенных Numico). Дети распределялись по группам только после решения о необходимости перехода на искусственное вскармливание. С матерями проводилась работа по стимулированию лактации и были объяснены все преимущества грудного вскармливания.

Каждая пара мать/ребенок имели уникальный регистрационный номер, который сохранялся до конца исследования. Продукты были закодированы буквенным кодом. Рандомизация и выбор продукта были осуществлены до начала исследования специалистом, который не принимал участия в дальнейшем исследовании.

Количество ГМ или молочной смеси для питания фиксировалось родителями ежедневно в специальных дневниках. Все случаи нежелательных реакций верифицировались врачом в специальной форме. Сбор образцов кала для проведения анализа осуществлялся родителями перед визитом к врачу на 8-й и 26-й неделях. Родители были проинструктированы о методике сбора анализа кала. Образцы кала немедленно замораживали в специальных контейнерах и транспортировали в лабораторию с сохранением температуры.

Замороженные фекальные пробы были размороженны на льду, после чего были приготовлены фекальные гомогенаты с 10% отношением веса к объему, для чего к 1 г кала было добавлено 9 мл фосфатно-солевого буферного раствора с последующей гомогенизацией этого раствора в течение 10 мин в гомогенизаторе Stomacher (IUL Instruments). 1 мл гомогенизированного фекального раствора был сразу зафиксирован в 3 мл свежего раствора параформальдегида (соотношение веса к объему 4%) в фосфатно-солевом буферном растворе и инкубировался в течение ночи при температуре 40 ^{0}C.

Зафиксированные пробы были разделены на аликвоты и хранились при температуре 20 ^{0}C для анализа КМБ. Остальные гомогенаты были разделены на аликвоты и хранились при температуре 80 ^{0}C для анализа sIgA.

Измерение содержания sIgA проводили с помощью энзим-связанного иммуносорбентного метода (ELISA). Значения sIgA определяли для отдельных фекальных проб, полученных на 8-й и 26-й неделях исследования. Анализ sIgA проводили описанным выше образом, с незначительными изменениями [14]. В планшеты с 96 ячейками NUNC Immuno-maxisorp были помещены на ночь секреторные компоненты иммуноглобулинов человека и мыши (Sigma, clone GA-1) при температуре 4 ^{0}C, 1:10 000 в фосфатно-солевом буферном растворе. Тщательно промытые отмывочным буфером (0,005% Tween-20 в фосфатно-солевом буферном растворе) планшеты были инкубированы в течение 1 ч при комнатной температуре фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 1% альбумин бычьей сыворотки (BSA) [PBS/BSA (Sigma, BSA Фракция V)] с целью блока неспецифических участков связывания белка. Супернатанты фекальных гомогенатов (размороженных на льду, перемешанных на вортексе и центрифугированных при 16 000 3 g в течение 5 мин при температуре 4 ^{0}C) были растворены в PBS/BSA от 2500 до 12 5000 раз. Очищенный человеческий IgA, выделенный из молозива (Sigma, I-1010), был использован в качестве стандартной калибровочной кривой при серийном разведении в PBS/BSA, начиная с 80 мг/л. После фиксации планшеты были промыты, пробы и образцы были инкубированы в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем планшеты снова были промыты, полученные пробы и образцы были инкубированы в течение 2 ч при комнатной температуре с биотинилированными моноклональными антителами иммуноглобулина человека и мыши (Pharmingen, клон G20–359), которые были добавлены в планшеты в концентрации 1 мг/л PBS/BSA. После 1 ч инкубации при комнатной температуре планшеты снова были промыты и затем инкубированы с конъюгатом стрептавидина с пероксидазой хрена (CLB, M2051), растворенным в PBS/BSA в соотношении 1:10 000, в течение 30 мин при комнатной температуре. Планшеты были промыты и инкубированы раствором одношагового ультратетраметилбензидинового субстрата (Pierce, 34028), дважды разведенным ацетатом натрия в концентрации 0,1 моль/л, pH 5,5 (Merck, 1.06268). Биокаталитическое изменение цвета было остановлено путем добавления стоп-реагента (1,8 моль/л H_2SO_4), после чего коэффициент поглощения был измерен при 450 нм с помощью планшет-ридера. Концентрации sIgA фекальных проб были рассчитаны по калибровочной кривой. Анализ проб проводили в течение двух последующих дней дважды в двух различных разведениях.

Анализ состава КМБ проводили путем количественной флюоресцентной гибридизации in situ, как было описано ранее [2, 16, 17]. Фекальные пробы были выложены на покрытые желатином предметные стекла (предметные стекла, состоящие из 8 квадратных ячеек площадью 1 см^2 каждая) (CBN Labsuppliers), высушены воздухом и смешаны со специфическими пробами Bif164 [16] *Bifidobacterium*, маркированных Cy3, 10 нг/кл, специфическими пробами Chis150/Clit135 *Clostridium histolyticum/Clostridium lituseburense*, маркированных Cy3, и специфическими пробами Ec1531 *Escherichia coli*, маркированных Cy3, либо инкубированы с 0,25 нг в 1 мл красителя 4,6-диамидино-2-фенилиндол для подсчета. Результаты были автоматически подсчитаны с помощью эпифлюоресцентного микроскопа и программного обеспечения для анализа полученного изображения. Процент ББ в пробе был определен путем анализа 25 случайно выбранных микроскопических снимков. На каждом снимке число ББ определялось путем подсчета всех клеток с помощью набора фильтров с красителем 4,6-диамидино-2-фенилиндол и подсчета всех ББ с помощью Cy3-фильтров (SP100 и 41007 соответственно, Chroma Technology).

Согласно предварительным исследованиям нами определен размер выборки не менее 65 детей, который позволил бы установить различия в процентном содержании ББ между группами с учетом уровня достоверности менее 0,05 и значимости 80%. Анализ групп подтвердил, что обе группы были сравнимы по основным

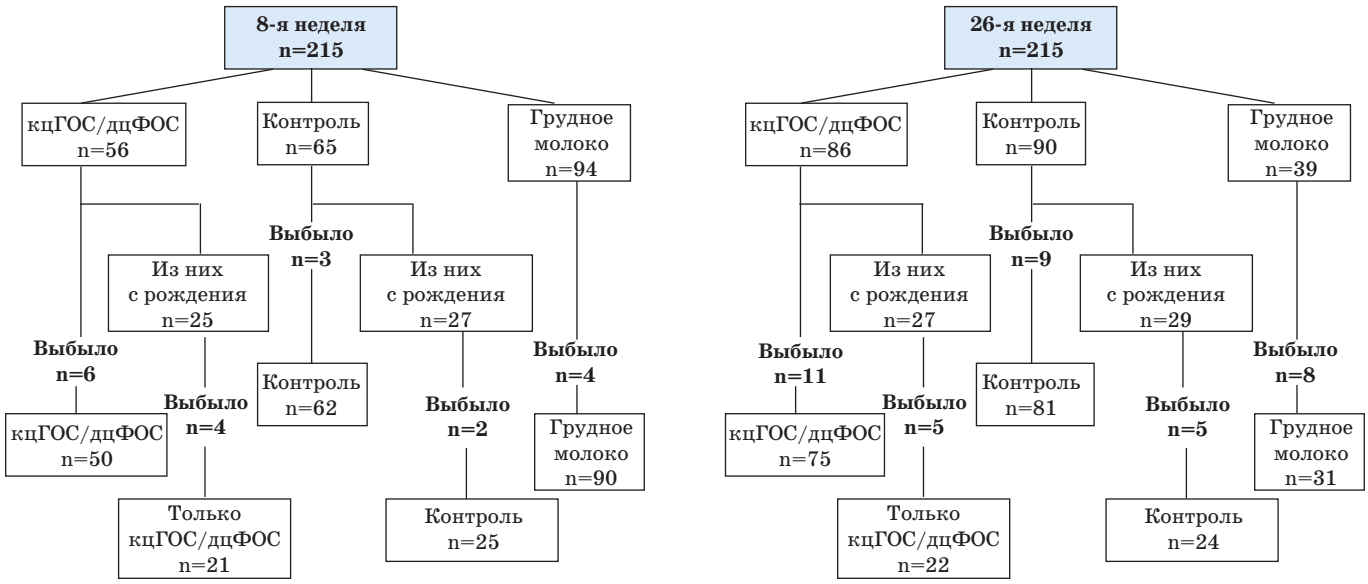

Рис. 1. Схема исследования.

показателям. Дети, первоначально получавшие ГМ, были представлены равномерно в обеих группах.

Результаты

215 детей были включены в исследование. Структура исследования представлена на рис. 1. Всего 202 ребенка полностью прошли курс обследования через 8 недель. Из них 21, 25 и 90 детей получали в течение исследования только один вид вскармливания (молочная смесь с/без ПБ или ГМ). 66 детей, стартовавших на грудном вскармливании, в дальнейшем были рандомизированы по группам, получавшим молочные смеси. 187 детей полностью завершили обследование через 26 недель. Среди них 22, 24 и 31 находились в течение всего наблюдения на одном виде вскармливания. Основные характеристики групп представлены в табл. 1.

Фекальный sIgA. После 26 недель наблюдения при анализе результатов исследования установлено, что концентрация sIgA в фекалиях была достоверно выше у детей, получавших обогащенную кцГОС/дцФОС смесь (729 мг/г), в сравнении с контрольной группой (377 мг/г) (рис. 2). Результаты, полученные у детей подгрупп, находящихся на исключительно искусственном вскармливании, были сравнимы с данными, полученными в полных группах: 719 мг/г и 263 мг/г соответственно (p=0,001).

Интестинальная микрофлора. После 8 недель наблюдения между группами детей, получавших молочные смеси, различий в процентном содержании ББ и клостридий в кале установлено не было (табл. 2). При сравнении подгрупп детей, находящихся только на искусственном вскармливании, частота выявления *E. coli* в кале была ниже у детей, получавших смесь, обогащенную кцГОС/дцФОС, в сравнении с контрольной группой. К концу исследования (26 недель) у детей, получавших обогащенную кцГОС/дцФОС смесь, частота выявления ББ в кале была выше, чем в контрольной группе, а *Clostridium spp.* – ниже в сравнении с контрольной группой. Результаты в подгруппах детей, получавших исключительно молочные смеси, были аналогичными.

Обсуждение

В данном исследовании дети, получавшие молочную смесь, обогащенную кцГОС/дцФОС, имели достоверно более высокое содержание фекального sIgA в сравнении с детьми, получавшими смесь аналогичного состава без ПБ. Наиболее наглядно данные, полученные после 26 недель приема смеси, продемонстрировали позитивное влияние ПБ кцГОС/дцФОС на концентрацию sIgA в кале.

Подобные результаты были получены и в исследовании Bakker-Zierikzee и соавт. [14], в котором дети, рандомизированные на 2 группы, получали молочные смеси с/без ПБ в течение 4 месяцев. В этом исследовании получены следующие данные по концентрации sIgA в кале: 654 мг/г, 449 мг/г и 767 мг/г в группах детей, получавших обогащенную смесь, стандартную смесь и ГМ соответственно. При этом достоверных различий установлено не было, что могло быть связано с недостаточным размером выборки (13, 13 и 12 детей). Важным отличием нашего исследования от исследования Bakker-Zierikzee и соавт. явилось то, что нами были включены в исследование дети, которые стартовали с грудного вскармливания, но затем перешли на вскармливание молочными смесями. Причем мы имели возможность оценить результаты у детей, находящихся как на исклю-

Таблица 1

Основные характеристики групп исследования, в том числе подгрупп, находящихся на искусственном вскармливании с момента рождения

Показатели	кцГОС/дцФОС		Контроль		Грудное вскармливание (n)
	вся группа (n)	подгруппа (n)	вся группа (n)	подгруппа (n)	
Пол, % мальчиков	57,0 (86)	66,7 (27)	54,4 (90)	55,2 (29)	53,8 (39)
% оперативных родов	25,9 (85)	22,2 (27)	22,2 (90)	27,6 (29)	15,4 (39)
Streptococcus B.-позитивные, %	15,1 (86)	22,2 (27)	26,7 (90)	20,7 (29)	12,8 (39)
Масса тела при рождении, г	3510,7±436,7 (86)	3610,0±448,7 (27)	3340,3±453,8 (90)	3312,1±434,1 (29)	3400,0±393,8 (39)
Рост при рождении, см	50,8±1,9 (84)	51,2±1,9 (26)	50,3±2,2 (88)	49,9±1,9 (28)	50,3±1,9 (39)
Окружность головы, см	34,6±1,4 (82)	35,0±1,5 (25)	34,4±1,4 (87)	34,4±1,3 (28)	34,7±1,5 (38)
Оценка по шкале Апгар на 1-й мин	8,7±0,9 (83)	8,5±1,1 (27)	8,6±0,7 (82)	8,6±0,5 (28)	8,6±0,5 (38)
Оценка по шкале Апгар на 5-й мин	9,5±0,7 (83)	9,4±0,8 (27)	9,4±0,9 (81)	9,5±0,7 (28)	9,6±0,5 (38)
Искусственное вскармливание, %	61,3±34,8 (86)	99,0±4,4 (27)	64,5±32,5 (90)	99,8±0,4 (29)	0,4±0,7 (39)
Грудное вскармливание, %	38,7±34,8 (86)	1,0±4,4 (27)	35,5±32,5 (90)	0,2±0,4 (29)	99,6±0,7 (39)
Длительность грудного вскармливания, нед	11,5±10,0 (75)	0,3±0,7 (22)	10,3±9,0 (81)	0,1±0,3 (24)	26,0±0,0 (31)
Аллергия у одного из родителей, %	33,7 (86)	33,3 (27)	38,2 (89)	31,0 (29)	57,9 (38)

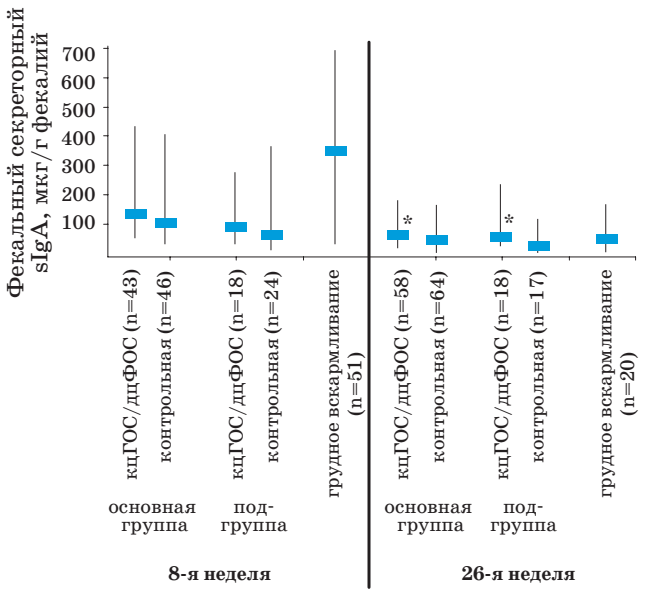

Рис. 2. Концентрация фекального sIgA после 8 и 26 недель в целом по группам и подгруппам на исключительно искусственном вскармливании.
*$p<0,05$.

чительно искусственном вскармливании с начала исследования, так и у детей, которые начинали с грудного вскармливания. Важность данного различия заключается в том, что с ГМ дети получают материнский sIgA. Это подтверждено в нашем исследовании следующим фактом: дети, находящиеся на грудном вскармливании, имеют более высокий уровень фекального sIgA в 8 недель в сравнении с детьми, находящимися на искусственном вскармливании. Различия в концентрации sIgA в кале между детьми, находящимися на искусственном и естественном вскармливании, к 26 неделям становятся не столь выраженными, что, возможно, связано со снижением уровня sIgA в ГМ и развитием собственной способности к его синтезу у ребенка [18]. Кроме sIgA, ГМ содержит и особые факторы, например, такие как sIgA-стимулирующие цитокины, которые стимулируют развитие собственной иммунной системы ребенка [12, 19]. Kuitunen и Savilahti [20] сравнили концентрацию фекального sIgA у доношенных и недоношенных детей, получавших ГМ или искусственные молочные смеси. Концентрация sIgA в кале была выше у детей, находящихся на грудном вскармливании, в течение всего периода наблюдения. Пробиотики также повышали уро-

Таблица 2

Кишечная микрофлора и показатели pH кала у наблюдаемых детей

Показатели	Сроки исследования, нед	ГОС/ФОС (n)	Контрольная группа (n)	Грудное вскармливание (n)
Бифидобактерии, %:	8	49,5 (0/83,6)* (41)	40,4 (0/75)	33,2 (0/74) (49)
основная группа	26	59,8 (37,1/88)**(66)	47,2 (12,1/64) (74)	63,9 (20,1/103,2) (30)
подгруппа	8	53,4 (0/79,1) (16)	40,2 (0/75,2) (24)	33,2 (0/74) (49)
	26	60,4 (37,8/93,3)** (19)	52,6 (1,3/68,7) (21)	63,9 (20,1/103,2) (30)
Клостридии, %:	8	0 (0/1,6) (42)	0 (0/13,8) (47)	0 (0/16,2) (50)
основная группа	26	1,1 (0/8) (68)	3,9 (0/10,4)** (74)	10 (0/6,1) (30)
подгруппа	8	0 (0/2,9) (17)	0 (0/15,5) (24)	0 (0/1,62) (50)
	26	0 (0/3,6)** (20)	3,3 (0/9,6) (21)	0 (0/6,1) (30)
Кишечная палочка, %:	8	2,8 (0/13) (42)	3,7 (0/21) (47)	1 (0/19,7) (50)
основная группа	26	1,8 (0/4,8) (20)	0,5 (0/14,5) (74)	2,6 (0/11,1) (30)
подгруппа	8	1,7 (0/8,3)** (17)	5,8 (1,1/25,3) (24)	1 (0/19,7) (50)
	26	6,2 (5,4/7,3) (21)	6,3 (5,6/7,7) (24)	6,1 (5,0/7,6) (32)
pH кала:	8	5,9 (4,9/7,5)** (47)	6,8 (5,7/7,9) (60)	5,7 (4,8/7,3) (83)
основная группа	26	6,2 (5,4/7,3)** (71)	6,5 (5,4/7,7) (82)	6,1 (5,0/7,6) (32)
подгруппа	8	6,3 (5,2/7,8)** (19)	7 (5,6/8,0) (26)	5,7 (4,8/7,3) (83)
	26	6,2 (5,4/7,3) (21)	6,3 (5,6/7,7) (24)	6,1 (5,0/7,6) (32)

*Показатели срединного значения (10-й/90-й перцентили); **отличие от контрольной группы $p<0,05$.

вень sIgA [21]. В открытом, неконтролируемом исследовании Fukushima и соавт. [21] повышение sIgA в кале было обнаружено у детей, получавших молочные смеси с *Bifidobacterium lactis* Bb-12. В исследовании, представленном Mullie и соавт. [22], ферментированная смесь с *Bifidobacterium breve strain* C50 и *Streptococcus thermophilus* также оказывала позитивное влияние на уровень sIgA в кале. Viljanen и соавт. [23] представили исследование, которое включало наблюдение за рандомизированными на группы детьми с симптомами атопии, которые получали различные виды пробиотиков, либо плацебо. Концентрация фекального sIgA имела тенденцию к несколько более высоким значениям у детей, получавших один или два пробиотика, в сравнении с группой плацебо. Различия большей частью были связаны со снижением уровня фекального sIgA в группе плацебо, но не с повышением его уровня в группе, получавшей пробиотики. Данное исследование подтвердило тот факт, что у детей на грудном вскармливании уровень фекального sIgA выше, но далеко не всегда представляется возможным классифицировать данный вид sIgA (молочный или фекальный, т.е. материнский или собственный).

Основная функция фекального sIgA состоит в агглютинации микроорганизмов и предотвращении адгезии патогенных бактерий и вирусов к слизистой оболочке кишечника [12, 13, 24–26]. Другой важной его функцией является поддержание гомеостаза КМФ. Исследования на животных показали значительное повышение содержания анаэробных бактерий в кишечнике мышей при отсутствии нормального количества sIgA, при нормализации продукции sIgA происходил возврат к нормальному составу КМФ [27]. Таким образом, с одной стороны, состав КМФ регулирует продукцию sIgA, с другой стороны, sIgA сам регулирует состав КМФ, предотвращая сверхстимуляцию иммунной системы. В то же время присутствие бактерий-комменсалов содействует постоянной стимуляции иммунной системы без привлечения механизмов воспаления. Представляют интерес находки Liepke и соавт. [28] о том, что секреторный компонент ГМ может оказывать бифидогенный эффект, способствующий росту полезной КМФ, а также играет особую роль в поддержании бактериального гомеостаза. Это исследование установило сильную связь между составом КМФ и мукозальной иммунной системой.

Как было показано ранее, существует несколько исследований [4–8], показавших, что пребиотическая смесь кцГОС/дцФОС в соотношении 9:1 индуцирует КМФ с высоким уровнем содержания ББ и метаболической активностью близкой к таковой у детей на грудном вскармливании. Близкие к этим результаты были получены и в нашем исследовании: высокий процент ББ и более низкое содержание *Clostridium spp.* в группе детей, получавших молочную смесь, обогащенную кцГОС/дцФОС, в сравнении с контрольной группой на 26-й неделе исследования. Во всех группах отмечено доминирование ББ, но неожиданным явился тот факт, что процент ББ оказался ниже в группе детей на грудном вскармливании в сравнении с обеими группами, получавшими молочные смеси. Столь же низкие показатели уровня ББ на грудном вскармливании получены и в исследовании Bakker-

Zierikzee и соавт. [29]. В исследовании Penders и соавт. [30] количество ББ было практически одинаковым у детей, находящихся на грудном и искусственном вскармливании. Хотя результаты наших исследований были несколько неожиданными, они могут быть связаны с некоторыми региональными различиями состава как ГМ, так и КМБ. В качестве примера указываем на сравнительное исследование у взрослых волонтеров, показавшее различия в процентном содержании ББ в нескольких странах [31]. В нашем исследовании процентное содержание *Clostridium spp.* был достоверно ниже в группе детей, получавших кцГОС/дцФОС, в сравнении с контрольной группой на 26-й неделе исследования. Процент *E. coli* был ниже в группе детей, получавших ПБ, на 8-й неделе исследований и не отмечено различий на 26-й неделе. Уровень *Clostridium spp.* и *E. coli* являются маркерами более зрелой КМБ. *Clostridium spp.* включает несколько различных штаммов *Clostridium perfringens* и *Clostridium difficile* и их низкий процент является показателем низкого содержания патогенных бактерий.

Микробный пейзаж – важный фактор, определяющий направленность развития иммунной системы младенцев [13]. Иммунная система беременной женщины имеет Th2-направленность, что связано с предотвращением отторжения плода [32, 33]. Вследствие сохранения этой направленности ребенок рождается с иммунной системой, имеющей Th2-направленность [34].

Поскольку такой ответ способствует возникновению аллергических реакций, переключение и некоторое торможение Th2-ответа являются весьма желательными. Согласно гигиенической гипотезе, микробная стимуляция является абсолютно необходимым фактором запуска механизма Th1-ответа [35, 36]. Регуляторные Т-клетки, безусловно, также играют важную роль, как в формировании Th1-, так и Th2-ответа [36]. Развитие здоровой КМФ может оказывать благотворное влияние на Т-регуляторные клетки, определяющие поворот в сторону Th1- или Th2-предпочтения [35–37]. Секреторный IgA может продуцироваться в ответ на стимуляцию патогенными бактериями через Th2-ответ или в ответ на стимуляцию бактериями-комменсалами через регуляторные Т-клетки. Из результатов нашего исследования мы не можем сделать однозначный вывод, было ли повышение концентрации фекального sIgA обусловлено увеличением уровня бактерий-комменсалов, таких как ББ, или это связано с патогенными бактериями. Однако, так как уровень *Clostridium spp.* и *E. coli* был несколько ниже у детей, получавших смесь, обогащенную кцГОС/дцФОС, мы можем высказать предположение, что повышение процентного содержания ББ могло быть стимулирующим фактором для продукции sIgA.

Исследования на животных показали, что обогащение диеты кцГОС/дцФОС может также индуцировать системный иммунный ответ [38, 39].

Таким образом, обогащение диеты детей первого года жизни кцГОС/дцФОС может иметь функциональный эффект, выражающийся, в частности, в стимуляции синтеза sIgA. Данная статья сфокусирована исключительно на влиянии ПБ на продукцию sIgA и будущие исследования должны будут подробнее раскрыть другие функциональные эффекты.

Заключение

Использование адаптированной молочной смеси, обогащенной кцГОС/дцФОС в соотношении 9:1, приводит к увеличению концентрации фекального sIgA, что позитивно влияет на местный иммунитет у детей первых месяцев жизни.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gibson GR, Roberfroid MB.* Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 1995; 125: 1401–1412.

2. *Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC et al.* Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2000; 30: 61–67.

3. *Newburg DS.* Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2000; 30 (Suppl. 2): S8–17.

4. *Boehm G, Lidestri M, Casetta P et al.* Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm infants. Arch. Dis. Child Fetal. Neonatal. Ed. 2002; 86: F178–181.

5. *Moro G, Minoli I, Mosca M et al.* Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2002; 34: 291–295.

6. *Schmelzle H, Wirth S, Skopnik H et al.* Randomized double-blind study of the nutritional efficacy and bifidogenicity of a new infant formula containing partially hydrolyzed protein, a high beta-palmitic acid level, and nondigestible oligosaccharides. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2003; 36: 343–351.

7. *Knol J, Scholtens P, Kafka C et al.* Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2005; 40: 36–42.

8. *Scholtens PA, Alles MS, Bindels JG et al.* Bifidogenic Effects of Solid Weaning Foods With Added Prebiotic Oligosaccharides: A Randomised Controlled Clinical Trial. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2006; 42: 553–559.

9. *Moro G, Arslanoglu S, Stahl B et al.* A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. Arch. Dis. Child. 2006; 91: 814–819.

10. *Arslanoglu S, Moro GE, Boehm G.* Early supplementation of prebiotic oligosaccharides protects formula-fed infants against infections during the first 6 months of life. J. Nutr. 2007; 137: 2420–2424.

11. *Bruzzese E, Volpicelli M, Salvini F et al.* Effect of early administration of GOS/FOS on the prevention of intestinal and extra-intestinal infections in healthy infants. 39thh Annual Meeting of the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Dresden, Germany, 2006: PN2–18.

12. *Hanson LA, Korotkova M, Lundin S et al.* The transfer of immunity from mother to child. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2003; 987: 199–206.

13. *Walker WA.* Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2000; 30: (Suppl 2): S2–7.

14. *Bakker-Zierikzee AM, Tol EA, Kroes H et al.* Faecal SIgA secretion in infants fed on pre- or probiotic infant formula. Pediatr. Allergy Immunol. 2006; 17: 134–140.

15. *Alliet P, Scholtens P, Raes M et al.* Effect of prebiotic galacto-oligosaccharide, long-chain fructo-oligosaccharide infant formula on serum cholesterol and triacylglycerol levels. Nutrition. 2007; 23: 719–723.

16. *Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ et al.* Quantitative fluorescence in situ hybridization of Bifidobacterium spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. Appl. Environ. Microbiol. 1995; 61: 3069–3075.

17. *Jansen GJ, Wildeboer-Veloo AC, Tonk RH et al.* Development and validation of an automated, microscopy-based method for enumeration of groups of intestinal bacteria. J. Microbiol. Methods. 1999; 37: 215–221.

18. *Goldman AS, Garza C, Nichols BL, Goldblum RM.* Immunologic factors in human milk during the first year of lactation. J. Pediatr. 1982; 100: 563–567.

19. *Field CJ.* The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. J. Nutr. 2005; 135: 1–4.

20. *Kuitunen M, Savilahti E.* Mucosal IgA, mucosal cow's milk antibodies, serum cow's milk antibodies and gastrointestinal permeability in infants. Pediatr. Allergy Immunol. 1995; 6: 30–35.

21. *Fukushima Y, Kawata Y, Hara H et al.* Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. Int. J. Food Microbiol. 1998; 42: 39–44.

22. *Mullie C, Yazourh A, Thibault H et al.* Increased poliovirus-specific intestinal antibody response coincides with promotion of *Bifidobacterium* longum-infantis and *Bifidobacterium* breve in infants: a randomized, double-blind, placebocontrolled trial. Pediatr. Res. 2004; 56: 791–795.

23. V*iljanen M, Kuitunen M, Haahtela T et al.* Probiotic effects on faecal inflammatory markers and on faecal IgA in food allergic atopic eczema/dermatitis syndrome infants. Pediatr. Allergy Immunol. 2005; 16: 65–71.

24. *Van de Perre P.* Transfer of antibody via mother's milk. Vaccine. 2003; 21: 3374–3376.

25. *Mazanec MB, Nedrud JG, Kaetzel CS, Lamm ME.* A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. Immunol. Today. 1993; 14: 430–435.

26. *Bouvet JP, Fischetti VA.* Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. Infect. Immun. 1999; 67: 2687–2691.

27. *Suzuki K, Meek B, Doi Y et al.* Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgAdeficient gut. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004; 101: 1981–1986.

28. Liepke C, Adermann K, Raida M et al. Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. Eur. J. Biochem. 2002; 269: 712–718.

29. *Bakker-Zierikzee AM, Alles MS, Knol J et al.* Effects of infant formula containing a mixture of galacto- and fructo-oligosaccharides or viable *Bifidobacterium* animalis on the intestinal microflora during the first 4 months of life. Br. J. Nutr. 2005; 94: 783–790.

30. *Penders J, Thijs C, van den Brandt PA et al.* Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth. Cohort Study. Gut. 2007; 56: 661–667.

31. *Mueller S, Saunier K, Hanisch C et al.* Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72: 1027–1033.

32. *Raghupathy R.* Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. Semin. Immunol. 2001; 13: 219–227.

33. *Reinhard G, Noll A, Schlebusch H et al.* Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998; 245: 933–938.

34. *Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ et al.* Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. J. Immunol. 1998; 160: 4730–4737.

35. *Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R.* Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. Science. 2002; 296: 490–494.

36. *Rook GA, Brunet LR.* Microbes, immunoregulation, and the gut. Gut. 2005; 54: 317–320.

37. *Bach JF.* The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. N. Engl. J. Med. 2002; 347: 911–920.

38. *Vos AP, Haarman M, Vanginkel JW et al.* Dietary supplementation of neutral and acidic oligosaccharides enhances Th1-dependent vaccination responses in mice. Pediatr. Allergy Immunol. 2007; 18: 304–312.

39. *Vos AP, Haarman M, Buco A et al.* A specific prebiotic oligosaccharide mixture stimulates delayed-type hypersensitivity in a murine influenza vaccination model. Int. Immunopharmacol. 2006; 6: 1277–1286.

40. *Macpherson AJ, Harris NL.* Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. Nat. Rev. Immunol. 2004; 4: 478–485.

41. *Roller M, Rechkemmer G, Watzl B.* Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. J. Nutr. 2004; 134: 153–156.

РЕФЕРАТЫ

ПЕРИНАТАЛЬНАЯ ЛЕТАЛЬНАЯ БОЛЕЗНЬ ГОШЕ

Перинатальная летальная болезнь Гоше (ПЛБГ) – редкая форма болезни Гоше, и ее часто считают отдельной формой 2 типа болезни Гоше. Авторы приводят историю ребенка, у которого была прогрессирующая гепатомегалия, ихтиоз, генерализованный отек кожи и перинатальная энценфалопатия и который умер, прожив 6 часов. Аутопсия выявила выраженную гепатоспеломегалию, ихтиоз, гистологическую картину инфильтрации печени, селезенки, легких, тимуса, лимфоузлов и костного мозга клетками Гоше. Генетическое тетсирование родителей показало, что оба они явились носителями гена болезни Гоше.

Plakkal N, Soraisham AS, Jirapradittha J, Pinto-Rojas A. Indian J. Pediatr. 2010; 6.