

© Коллектив авторов, 2015

В.А. Ревякина, Е.Ю. Березина, М.И. Шавкина, И.А. Ларькова, Т.Б. Сенцова,  
И.В. Ворожко, Е.Д. Кувшинова, М.В. Бойцов

## УРОВНИ ЦИТОКИНОВ И СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А В ГРУДНОМ МОЛОКЕ МАТЕРЕЙ ДЕТЕЙ, ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К АТОПИИ

Отделение аллергологии ФГБНУ НИИ питания, Москва, РФ

Revyakina V.A., Berezina E.I.U., Shavkina M.I., Larkova I.A., Sentsova T.B., Vorozhko I.V.,  
Kuvshinova E.D., Boytsov M.V.

## CYTOKINES AND SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A SCALE IN BREAST MILK OF MOTHERS OF ATOPY PREDISPOSED CHILDREN

Division of Allergology of the Research Institute of Nutrition, Moscow, Russia

Исследованы уровни цитокинов и sIgA в грудном молоке (ГМ) 44 кормящих матерей. Выделены две группы. В 1-ю группу вошли 26 (59,1%) кормящих матерей с положительным аллергологическим анамнезом. 2-ю группу составили 18 (40,9%) кормящих женщин, не имеющих аллергических заболеваний у себя и ближайших родственников. Проведенные исследования показали, что в ГМ матерей с аллергией выявлялись низкие значения sIgA, трансформирующего ростового фактора  $\beta$  (TGF $\beta$ ), высокие уровни IL17A ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой матерей без аллергии. Концентрации IL2 в ГМ матерей обеих групп достоверно не отличались. Наблюдение за детьми в течение 6 месяцев показали, что 75% детей от матерей с аллергией имели кожные проявления аллергии против 22,2% детей от матерей без аллергии. Данные показатели можно рассматривать как биомаркеры прогноза развития аллергической патологии у детей, предрасположенных к атопии.

**Ключевые слова:** грудное молоко, кормящие матери, дети, атопия, цитокины, секреторный IgA.

The scale of cytokines and sIgA in breast milk (BM) of 44 breast-feeding mothers had been studied. Two groups were formed: the 1<sup>st</sup> group of 26 (59,1%) of breast-feeding mothers with a positive allergic history, and the 2<sup>nd</sup> group of 18 (40,9%) breast-feeding mothers without allergic diseases of their own and their nearest relatives. The research showed that there were low levels of secretory IgA (sIgA) and transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) and high level of IL17A ( $p < 0,05$ ) in the group of allergic mothers compared to non-allergic. The concentration of IL2 in BM of mothers in both groups did not differ significantly. The 6 months' observation after the infants showed that 75% of children from mothers with allergy had skin manifestations of allergy compared to 22,2% for children from mothers without allergy. These indicators can be considered as biomarkers for prognosis of development of allergic pathology in atopy predisposed children.

**Keywords:** breast milk, breast-feeding mothers, children, atopy, cytokines, secretory IgA.

### Контактная информация:

Ревякина Вера Афанасьевна – д.м.н., проф., зав. отделением аллергологии ФГБНУ НИИ питания  
Адрес: Россия, 115446 г. Москва, Каширское шоссе, 21  
Тел.: (499) 794-36-21, E-mail: 53567697@mail.ru  
Статья поступила 26.01.15, принята к печати 25.05.15.

### Contact Information:

Revyakina Vera Afanasevna – Ph.D., Prof., Head of the Division of Allergology of the Research Institute of Nutrition  
Address: Russia, 115446 Moscow, Kashirskoye highway, 21  
Tel.: (499) 794-36-21, E-mail: 53567697@mail.ru  
The article received 26.01.15, accepted for publication 25.05.15.

Грудное вскармливание (ГВ) – идеальная форма питания для ребенка, организм которого нуждается в постоянной защите от патогенных микроорганизмов и агрессивных факторов внешней среды. Грудное молоко (ГМ) содержит важные нутриенты (белки, жиры, лактозу, минералы), имеющие питательную ценность и необходимые для оптимального питания и развития ребенка. Помимо нутриентов, ГМ содержит гормоны, факторы роста, клетки (В- и Т-лимфоциты, нейтрофилы, макрофаги), белковые молекулы (секреторный IgA – sIgA, цитокины), связанные с иммунной системой [1–3]. Вполне вероятно, что многие из этих белковых молекул, не имеющих пищевого значения, обеспечивают развитие иммунной системы ребенка и тем самым защищают его от патогенных микроорганизмов и предупреждают развитие аллергии. Большинство лимфоцитов в ГМ составляют CD3+, CD8+-клетки. Они принимают участие в формировании феномена иммунологической толерантности, осуществляют защиту от патогенов окружающей среды. CD4+лимфоциты ГМ экспрессируют маркеры CD40L, sCD30, рецептор к IL2 и CD45RO+ – маркер, ассоциированный с иммунологической памятью. Полагают, что активированные Т-клетки матери компенсируют функцию Т-лимфоцитов новорожденных и обеспечивают их дифференцировку и созревание. Тот факт, что у детей, получающих ГМ, размеры тимуса в 2 раза больше, чем у детей, находящихся на искусственном вскармливании, возможно, подтверждает это предположение [4].

sIgA – основной иммуноглобулин женского молока. В нем содержатся и другие растворимые молекулы, способные оказывать иммуномодулирующие эффекты – молекулы адгезии (например, внутриклеточная молекула адгезии-1 и сосудистая молекула адгезии-1), гормоны, факторы роста и др.

Большое значение придается содержанию в ГМ трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ), где он находится преимущественно в виде TGF $\beta$ 2-изоформ. Он играет важную роль в регуляции иммунной системы. Через белок Foxp3 TGF $\beta$  влияет на регуляторные Т-клетки и Т-хелперы, оказывает противовоспалительное влияние на иммунный ответ, стимулирует синтез IgA и блокирует активацию лимфоцитов и макрофагов. В проведенных экспериментальных исследованиях было показано, что мыши с врожденным дефицитом TGF $\beta$  выживали в течение всего периода ГВ за счет содержания этого цитокина в материнском молоке. Назначение лабораторным животным TGF $\beta$  внутрь индуцировало формирование оральной толерантности [4]. Интерес ученых к изучению функций белка TGF $\beta$  возник несколько лет назад, когда они впервые заметили, что распространенность аллергических заболеваний (АЗ) среди пациентов с синдромом Лойса–Дитца выше, чем в популяции людей без этого заболевания. Результаты исследований последних лет свидетельствуют о том, что белок TGF $\beta$  не просто посредник в развитии АЗ.

Нарушения сигнальной функции TGF $\beta$  приводят к тому, что белок запускает каскад реакций, приводящий к развитию АЗ [5].

В ГМ содержатся и другие цитокины, например, IL1, IL6, IL8 вместе с их растворимыми рецепторами, ограничивающими их активность. Установлено, что в первые месяцы лактации в ГМ содержатся достаточное количество цитокинов, предполагая, что таким образом компенсируется незрелость иммунной системы новорожденного ребенка. Цитокины, антитела и другие компоненты иммунной системы, содержащиеся в ГМ, подтверждают, что собственная иммунная система ребенка находится под влиянием ГВ. Участие цитокинов ГМ в регуляции иммунного ответа ребенка, рожденного с незрелостью иммунной системы, возможно, предупреждает развитие ряда заболеваний, влияет на формирование оральной толерантности и развитие пищевой аллергии [6, 7]. В этой связи актуальными и перспективными являются исследования, направленные на поиск биомаркеров развития АЗ у новорожденных детей, находящихся на ГВ.

Исходя из вышесказанного, целью работы явилось выявление прогностического значения некоторых цитокинов ГМ для развития АЗ у новорожденных детей, предрасположенных к атопии.

#### Материалы и методы исследования

Обследованы 44 кормящих женщин в возрасте от 23 до 38 лет. Выделены две группы. В 1-ю группу вошли 26 (59,1%) кормящих матерей, страдающих АЗ или имеющих АЗ в роду. 2-ю группу составили 18 (40,9%) кормящих женщин, не имеющих АЗ у себя и ближайших родственников.

Сбор ГМ у наблюдаемых женщин осуществляли через месяц после рождения ребенка. В ГМ этих матерей определяли содержание sIgA, IL17A, IL2, TGF $\beta$  [8, 9].

Образцы ГМ забирали в стерильные пластмассовые пробирки на 28–30-й день от рождения ребенка. Исследование sIgA проводили в течение 2 ч после забора молока, которое центрифугировали в течение 15 мин (3000 об/мин), снимали жировую пленку с поверхности молока и определяли содержание sIgA. Для исследования содержания sIgA в ГМ применяли метод радиальной иммунодиффузии с использованием моноспецифических антисывороток к SC-фрагменту IgA производства Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.И. Габричевского.

Образцы ГМ для определения цитокинов (IL17A, IL2, TNF $\beta$ ) после центрифугирования хранили при температуре –40 °С. Был использован иммуноферментный метод (ИФА) с применением коммерческих наборов BioSource International Inc., Бельгия.

Концентрацию общего IgE в сыворотке крови у наблюдаемых детей определяли методом ИФА с использованием тест-систем «Алкор Био» (Россия). Значения IgE-антител в сыворотке крови до 100 МЕ/мл расцениваются как норма.

Обработку полученных результатов исследования проводили с использованием пакета прикладных

программ Statistica фирмы StatSoft Inc (США). Для анализа полученных результатов определяли средние значения признака (M), стандартные ошибки среднего (m). Достоверность различий оценивали с помощью критерия Стьюдента для независимых и связанных выборок. Различия групп расценивали как статистически значимые при  $p < 0,05$  и высокозначимые – при  $p < 0,01$ .

### Результаты и их обсуждение

Под наблюдением находились 44 кормящих женщин и их дети с момента рождения до 6-месячного возраста. В зависимости от данных аллергологического анамнеза кормящие женщины были разделены на две группы. В 1-ю группу вошли 26 (59,1%) кормящих матерей, страдающих АЗ (бронхиальная астма, аллергический ринит, поллиноз) или имеющих АЗ в роду. 2-ю группу составили 18 (40,9%) кормящих женщин, не имеющих АЗ у себя и ближайших родственников

Результаты исследования уровней sIgA и цитокинов (TGF $\beta$ , IL17A, IL2) в ГМ кормящих женщин представлены в таблице. Анализ показателей sIgA в ГМ показал, что у женщин с аллергией они были достоверно ниже по сравнению с женщинами без аллергии ( $p < 0,05$ ). Известно, что sIgA в большом количестве поступает с материнским молоком и осуществляет функцию местного иммунитета. В ранее проведенных исследованиях у 3-месячных детей, чьи родители имели атопию, выявлялась транзиторная недостаточность sIgA, поэтому незрелая местная иммунная система у новорожденных не может справиться с повышенной нагрузкой антигенами. В связи с этим у детей с высоким риском развития атопии повышенное всасывание антигенов может привести к сенсибилизации, и в дальнейшем повторный контакт даже с небольшим количеством антигена оказывается достаточным для появления симптомов аллергии.

Концентрация TGF $\beta$  в ГМ кормящих женщин 1-й группы статически значимо ниже ( $p < 0,01$ ) аналогичного показателя у кормящих матерей 2-й группы. Как показали проведенные исследования, у женщин с положительным аллергологическим анамнезом отмечены статистически низкие значения IL17A в ГМ по сравнению с кормящими женщинами без аллергии. Уровни IL2 в ГМ у кормящих женщин 1-й группы досто-

верно не отличались от аналогичного показателя женщин 2-й группы ( $p < 0,1$ ).

Таким образом, в ГМ кормящих женщин, страдающих АЗ или имеющих аллергические проявления в семье, выявлялись низкие показатели sIgA, TGF $\beta$ , высокие IL17A по сравнению с кормящими женщинами без аллергии. Не выявлено статистически значимых различий концентраций IL2 в ГМ у женщин в двух наблюдаемых группах. Выявленный цитокиновый дисбаланс у кормящих матерей с аллергией (низкие значения TGF $\beta$  и высокие уровни IL17A), по-видимому, является основой для развития пищевой сенсибилизации как пускового фактора для АЗ. По-видимому, дисбаланс цитокинов у детей в периоде формирования сенсибилизации определяет последующую форму иммунного ответа. Можно предположить, что уровни TGF $\beta$  и IL17A в ГМ определяют прогноз развития пищевой сенсибилизации и возникновения аллергической патологии у детей. С некоторой долей вероятности это подтверждается данными клинического исследования за детьми этих матерей.

У детей от женщин с аллергией (1-я группа) первые проявления на коже в виде гиперемии, участков экссудации на 1–3-м месяце жизни появились у 13, а на 3–6-м месяце – еще у 7 детей: всего у 76,9% детей от матерей с аллергией. У детей от женщин без аллергии (2-я группа) в течение первых 6 месяцев жизни первые проявления на коже наблюдались лишь у 4, что составило 22,2%. У всех детей с кожными проявлениями аллергии выявлялись высокие уровни общего IgE в сыворотке крови – от 125 до 250 МЕ/мл. Проведенное исследование подтверждает, что наследственная предрасположенность к атопии является высоким фактором риска развития АЗ у ребенка. Среди других прогностических факторов, способствующих развитию аллергической патологии у новорожденного ребенка, следует указать на низкие значения sIgA, TGF $\beta$  и высокие IL17A в ГМ кормящих женщин.

Таким образом, в силу особенностей иммунной системы ребенка раннего возраста основные защитные функции выполняют пассивно приобретенные сывороточные и секреторные антитела. Основными сывороточными антителами являются IgG матери, часть из которых переходит из ГМ в кровоток ребенка из кишечника. В регуляции иммунного ответа у новорожден-

Таблица

Уровни sIgA и цитокинов в ГМ наблюдаемых матерей

Показатели	1-я группа (n=28) кормящие женщины с положительным аллергологическим анамнезом	2-я группа (n=18) кормящие женщины с отрицательным аллергологическим анамнезом	P
sIgA, мг/дл	2,76 $\pm$ 0,13	3,88 $\pm$ 0,16	<0,05
TGF $\beta$ , pg/ml	43,2 $\pm$ 4,8	56,7 $\pm$ 6,4	<0,01
IL17A, pg/ml	0,33 $\pm$ 0,12	0,24 $\pm$ 0,11	<0,05
IL2, pg/ml	5,5 $\pm$ 0,7	4,6 $\pm$ 1,4	<0,1

ного ребенка участвуют противовоспалительные и провоспалительные цитокины. Контроль над эффектами провоспалительных цитокинов (IL1, IL6, IL8, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IFN $\beta$ ) выполняют противовоспалительные цитокины (IL4, IL10, IL13, TNF $\beta$ ). Они способны подавлять транскрипцию генов провоспалительных цитокинов в клетках-продуцентах, индуцировать синтез рецепторных антагонистов интерлейкинов и усиливать образование растворимых рецепторов. В разных ситуациях некоторые цитокины способны осуществлять противоположные эффекты, что свидетельствует о широком спектре их физиологических функций.

Для подавления гиперчувствительных (аллергических) реакций на пищевые антигены, попадающие в желудочно-кишечный тракт, существует оральная толерантность. Она индуцируется иммунной системой слизистой оболочки кишечника против пищевых антигенов и препятствует развитию у большинства людей пищевой аллергии. Оральная толерантность сопровождается появлением функционально активных Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4+CD25+, которые способны продуцировать регуляторные иммуносупрессивные цитокины – TGF $\beta$  и IL10. Считается, что иммуносупрессия посредством Т-регуляторных клеток может быть главным механизмом, поддерживающим оральную толерантность. Среди цитокинов, способствующих формированию оральной толерантности, наибольшее внимание привлекает TGF $\beta$ . Значительные количества TGF $\beta$  обнаруживаются в кишечнике в норме. Он синтезируется гемопоэтическими и эпителиальными клетками, важен в регуляции эпителиального гомеостаза и синтеза в В-клетках IgM и IgA, TGF $\beta$  и IL12, IFN $\gamma$  играет противоположную роль в иммунной регуляции в кишечнике и имеет решающее значение в индукции мукозального (местного) иммунного ответа и толерантности. Недостаточное количество TGF $\beta$  в ГМ матерей с аллергией подтверждает факт нарушения формирования оральной толерантности у рожденных детей.

Для формирования оральной толерантности необходимо также и множество клеточных субпопуляций. Возможными кандидатами на данную роль являются CD4+ и CD8+ Т-клетки. Большинство исследователей считает, что CD4+ Т-клетки обязательны для развития оральной толерантности. В последнее десятилетие накопилось огромное количество данных о существовании дополнительных специфических субпопуляций Т-лимфоцитов и механизмов ими реализующих, назначение которых – обеспечивать поддержание толерантности на периферии. Речь идет прежде всего о естественных CD4+ CD25+ регуляторных Т-клетках (Treg-клетки) и CD4+ Т-лимфоцитах-хелперах 3-го типа (Th3), которые, функционируя, продуцируют ингибиторные цитокины [10]. Эти клетки располагаются внутри пейеровых бляшек и способствуют толе-

рантности прежде всего путем секреции TGF $\beta$  и в меньшей степени IL10 и IL4.

Нарушение формирования оральной толерантности, приводящее к пищевой аллергии, тесно связано с состоянием местного противомикробного иммунитета, качественным и количественным состоянием микробиоты. За противомикробный иммунитет ответственны Th17-клетки, дифференцирующиеся как FoxP3+Treg из антигенстимулированных наивных CD4+ в собственной пластинке слизистой оболочки в присутствии TGF $\beta$ , IL1, IL6, IL23, которые активируют фактор транскрипции ROR $\gamma$ t. Весьма любопытным является тот факт, что антигенстимулированные Т-клетки в естественных условиях могут нести на себе и FoxP3+ и ROR $\gamma$ t, таким образом выполняя и защитную, и регуляторную функцию одновременно. Роль Th17-клеток состоит в обеспечении иммунных реакций против внеклеточных патогенов за счет продукции семейства IL17, которые ответственны за привлечение нейтрофилов в очаг воспаления.

IL17 способствует увеличению синтеза хемокинов в различных тканях, а также миграции моноцитов и нейтрофилов к месту воспаления, аналогично INF $\gamma$ . Функции IL17 разнообразны, он активирует и подавляет продукцию различных факторов эпителиальными, эндотелиальными и гладкомышечными клетками, фибробластами, нейтрофилами, дендритными клетками, макрофагами и кератиноцитами. Семейство IL17 функционирует как противовоспалительные цитокины. Они способны подавлять транскрипцию генов провоспалительных цитокинов в клетках-продуцентах, индуцировать синтез рецепторных антагонистов интерлейкинов, усиливать образование растворимых рецепторов и снижать плотность провоспалительных рецепторов на клетках. Они действуют синергически с TGF $\beta$  и IL1. Баланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами является важным фактором в регуляции воспалительной реакции и от него во многом зависит характер течения болезни и ее исход. Цитокиновый дисбаланс является основой для развития хронических воспалительных заболеваний.

Все вышесказанное свидетельствует о том, многие процессы регуляции иммунного ответа у детей, предрасположенных к атопии, остаются нерасшифрованными и требуют дальнейших исследований.

### Выводы

1. Проведенное исследование подтверждает, что наследственная предрасположенность к атопии является высоким фактором риска развития АЗ у ребенка. Среди других факторов, способствующих развитию аллергической патологии у новорожденного ребенка, следует указать на низкие значения sIgA, TGF $\beta$  и высокие IL17 в ГМ кормящих женщин.



2. Низкие значения sIgA, TGF $\beta$  и высокие IL17 в ГМ кормящих матерей являются факторами, нарушающими формирование оральной толерантности у детей. В группе детей от мате-

рей с дисбалансом цитокинов ГМ проявления атопического дерматита развиваются в первые 6 месяцев в 75% случаев, а в группе контроля – в 22,2% случаев.

### Литература

1. Ким Флейшер Микаэльсон. Грудное вскармливание. В кн.: Практические аспекты педиатрической диетологии: Пер. с англ. Б. Колецко, ред. Базель: ЭсКаргер АГ, 2008: 92–97.
2. Фатеева Е.М. История организации вскармливания детей первого года жизни. Биотехнология. 2012; 1: 21–26.
3. Lawrence RA, Lawrence RM. Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession. 6 ed. St. Louis: Mosby, 2005.
4. Oddy WH, Halonen M, Martinez FD, et al. TGF- $\beta$  in human milk is associated with wheezing in infancy. J. Allergy Clin. Immunol. 2003; 112 (4): 723–728.
5. Frischmeyer-Guerrero PA, Guerrero AL, Oswald G, Chichester K, Myers L, Halushka MK, Oliva-Hemker M, Wood RA, Dietz HC. TGF Receptor Mutations Impose a Strong Predisposition for Human Allergic Disease. Science Translational Medicine. 2013; 5 (195): 195.
6. Ramer MS, Kakuma R. The optimal duration of exclusive breastfeeding: a systematic review. Adv. Exp. Med. Biol. 2004; 554: 63–77.
7. Черешнев В.А., Шмагель К.В. Иммунология. М.: Издательский Дом «Магистр-ИРЕСС», 2013: 448 с.
8. Srivastava MD, Brouhard B, Saneto R, Groh-Wargo SJ. Cytokines in human milk. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 1996; 93 (3): 263–287.
9. Bottcher MF, Jenmalm MC, Bjorksten B. Cytokines, chemokine and secretory IgA levels in human milk in relation to atopic disease and IgA production in infants. Pediatr. Allergy Immunol. 2003; 14: 34–41.
10. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. Nat. Immunol. 2008; 9 (3): 239–244.

© Коллектив авторов, 2014

И.И. Балаболкин, Е.В. Беляева, Л.Д. Ксензова, И.А. Ларькова, В.В. Ботвиньева

## КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛЛИНОЗОВ У ПОДРОСТКОВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ АЛЛЕРГЕНСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

ФГБУ «Научный центр здоровья детей» РАН, Москва, РФ

Balabolkin I.I., Belyaeva E.V., Ksenzova L.D., Lar'kova I.A., Botvinyeva V.V.

## CLINICAL AND PATHOGENETIC FEATURES OF HAY FEVER IN TEENAGERS AND THE EFFECTIVENESS OF A SPECIFIC ALLERGEN IMMUNOTHERAPY

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre of Children Health», Moscow, Russia

В статье представлены данные исследования особенностей развития, клинических проявлений и течения поллинозов у 87 подростков. Выявлены преобладание дебюта поллинозов у подростков в детском возрасте (79,3%) и более редкое (20,7%) возникновение его в подростковом возрасте, наличие более широкого спектра пыльцевой сенсибилизации и более легкого течения сезонного аллергического ринита. Установлено повышение уровня общего IgE и содержания IL4, IL5, IL10, IL12, IL13, sIL2R и снижение уровня IL6, IL8 и TNF $\alpha$  в сыворотке крови в период ремиссии болезни. Показаны высокая терапевтическая эффективность алергенспеци-

### Контактная информация:

**Балаболкин Иван Иванович** – д.м.н., проф., член-корр. РАН, главный научный сотрудник ФГБУ НЦЗД РАН  
Адрес: Россия, 119991 г. Москва, Ломоносовский пр-кт, 2/62  
Тел.: (499) 134-06-07, E-mail: [allergруппа@mail.ru](mailto:allergруппа@mail.ru)  
Статья поступила 10.06.14, принята к печати 28.01.15.

### Contact Information:

**Balabolkin Ivan Ivanovich** – Ph.D., Prof., Associate Fellow of Russian Academy of Sciences, Chief Scientific Officer with the Scientific Centre of Children Health  
Address: Russia, 119991 Moscow Lomonosov Prospect, 2/62  
Tel.: (499) 134-06-07, E-mail: [allergруппа@mail.ru](mailto:allergруппа@mail.ru)  
The article received 10.06.14, accepted for publication 28.01.15.