



Тихон Н.М.¹ ✉, Ляликов С.А.¹, Белевцев М.В.², Купчинская А.Н.², Дубовик О.С.², Гаевская Е.А.¹, Новосад Е.А.³, Никольская А.К.⁴

¹ Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

³ Гродненский областной клинический перинатальный центр, Гродно, Беларусь

⁴ Городская клиническая больница скорой медицинской помощи г. Гродно, Гродно, Беларусь

Влияние иммунных факторов пуповинной крови и грудного молока на содержание эозинофильного нейротоксина в моче младенцев

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, разработка методических подходов, анализ и интерпретация данных, подготовка статьи и написание текста – Тихон Н.М.; концепция и дизайн исследования, критический пересмотр и редактирование статьи – Ляликов С.А.; разработка методических подходов и лабораторных методов исследования, критический пересмотр и редактирование статьи – Белевцев М.В.; лабораторные методы исследования, обработка данных, написание текста – Купчинская А.Н.; лабораторные методы исследования, обработка данных – Дубовик О.С.; сбор и обработка данных, обзор литературы, написание текста – Гаевская Е.А.; разработка методических подходов, организация сбора и обработки материала, написание текста – Новосад Е.А., Никольская А.К.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственной программы научных исследований на 2021–2025 гг. ГПНИ 4 «Трансляционная медицина», подпрограмма 4.2 «Фундаментальные аспекты медицинской науки», задание 3.32 (01.01.2022–31.12.2024; № госрегистрации 20220218, от 28.02.2022).

Этическое заявление. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Подана: 06.04.2023

Принята: 11.09.2023

Контакты: tsikhannat@gmail.com

Резюме

Цель. Установить концентрацию эозинофильного нейротоксина (ЭоН) в моче у младенцев первых месяцев жизни, выделить иммунные факторы пуповинной крови и грудного молока, а также клинико-анамнестические данные, влияющие на его содержание.

Материалы и методы. В проспективное когортное исследование включено 102 пары мама – ребенок. Материалы для исследования: пуповинная кровь, грудное молоко (1 месяц после родов), моча (в возрасте младенцев 1 и 3 месяца). Концентрацию эозинофильного нейротоксина (ЭоН) в моче, IgE и ИЛ-4, ИЛ-5, TSLP, ИЛ-6, ИЛ-10, TGFβ₁ в грудном молоке и пуповинной крови определяли методом ИФА. Содержание ЭоН в моче представлено с пересчетом на креатинин (мкг/ммоль Cr). Концентрацию креатинина в моче определяли кинетическим методом, основанным на реакции Яффе.

Результаты. Медиана концентрации ЭоН в моче у младенцев в возрасте 1 и 3 месяца была равна 19,7 мкг/ммоль Cr [14,1; 32,2] и 18,7 мкг/ммоль Cr [10,5; 30,9] соответственно. У детей, принимающих витамин D с 1-го месяца жизни, уровень ЭоН в возрасте 3 месяцев был значительно ($p=0,037$) ниже, чем у младенцев, которые начали прием витамина D позже: Ме 14,1 мкг/ммоль Cr [9,2; 22,7] и 22,4 мкг/ммоль Cr [10,6; 33,7] соответственно. Концентрации ИЛ-4 ($r=0,36$; $p=0,034$) и ИЛ-5 ($r=0,34$; $p=0,053$)

в пуповинной крови положительно коррелируют с содержанием ЭоН в моче младенцев в возрасте 1 месяц; концентрация TSLP в пуповинной крови ($r=0,30$; $p=0,05$) и грудном молоке ($r=0,41$; $p=0,024$) с содержанием ЭоН в моче в возрасте 3 месяца; уровни IgE в пуповинной крови ($r=0,35$; $p=0,045$) и грудном молоке ($r=0,46$; $p=0,012$) с ЭоН в моче младенцев в возрасте 1 и 3 месяца.

Заключение. Концентрация эозинофильного нейротоксина в моче в первые месяцы жизни выше у младенцев, подвергшихся экспозиции более высоких концентраций IgE и Th2-ассоциированных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5, TSLP) внутриутробно через пуповинную кровь и с грудным молоком, а также не принимавших профилактические дозы витамина D с первого месяца жизни.

Ключевые слова: цитокины, пуповинная кровь, грудное молоко, иммунное программирование

Natallia M. Tsikhan¹ ✉, Siarhey A. Lialikau¹, Mikhail V. Belevtsev², Aliaksandra H. Kupchynskaya², Volha S. Dubovik², Yeuheniya A. Hayeuskaya¹, Ekaterina A. Navasad³, Alena K. Nikolskaya⁴

¹ Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

² Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

³ Grodno Regional Clinical Perinatal Center, Grodno, Belarus

⁴ City Clinical Emergency Hospital of Grodno, Grodno, Belarus

Effect of Cord Blood and Breast Milk Immune Factors on Urine Eosinophil-Derived Neurotoxin Concentration in Infants

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept, research design, research methods, data analysis, article writing – Natallia M. Tsikhan; concept, research design, article revision and correction – Siarhey A. Lialikau; development of methodological approaches and laboratory research methods, article revision and correction – Mikhail V. Belevtsev; laboratory research methods, text writing, data analysis – Aliaksandra H. Kupchynskaya; laboratory research methods, data analysis – Volha S. Dubovik; data collection and processing, literature review, text writing – Yeuheniya A. Hayeuskaya; development of methodological approaches, organizing and processing of specimens, text writing – Ekaterina A. Navasad, Alena K. Nikolskaya.

Funding. The study was carried out with the financial support of the State Research Program for 2021–2025 No. 4 "Translational Medicine", subprogram 4.2 "Fundamental Aspects of Medical Science", task 3.32 (01.01.2022–31.12.2024; State Registration No. 20220218, dated 02/28/2022).

Ethics statement. The study was approved by the local ethics committee.

Submitted: 06.04.2023

Accepted: 11.09.2023

Contacts: tsikhannat@gmail.com

Abstract

Purpose. To determine the level of urine eosinophil-derived neurotoxin in first months old infants; to identify cord blood and breast milk immune factors, as well as clinical signs and anamnesis data influenced on it.

Materials and methods. 102 mother-child dyads were recruited for the prospective cohort study. Material: cord blood, breast milk (1 month after giving birth), urine (in infants

aged 1 and 3 months). Level of IgE, IL-4, IL-5, TSLP, IL-6, IL-10, TGFβ1 in breast milk and in cord blood, as well as urine eosinophil-derived neurotoxin (u-EDN) concentration were detected by ELISA. u-EDN concentration is presented as the U-EDN/creatinine ratio (in µg per mmol Cr). Urinary creatinine level was measured with the alkaline picrate method (Jaffé reaction).

Results. Median u-EDN concentration in infants aged 1 and 3 months was 19.7 µg/mmol Cr [14.1; 32.2] and 18.7 µg/mmol Cr [10.5; 30.9], respectively. u-EDN concentration in 3 mo old infants who started vitamin D prophylaxis at the 1st month after birth was significantly ($p=0.037$) lower than in infants who started vitamin D later: Me 14.1 µg/mmol Cr [9, 2; 22.7] and 22.4 µg/mmol Cr [10.6; 33.7], respectively. IL-4 ($r=0.36$; $p=0.034$) and IL-5 ($r=0.34$; $p=0.053$) concentrations in cord blood correlate with u-EDN concentration in 1 mo old infants; TSLP concentration in cord blood ($r=0.30$; $p=0.05$) and in breast milk ($r=0.41$; $p=0.024$) correlate with u-EDN concentration in 3 months old infants; cord blood IgE level ($r=0.35$; $p=0.045$) and breast milk IgE level ($r=0.46$; $p=0.012$) correlate with u-EDN concentration in 1 month old and 3 months old infants, respectively.

Conclusion. u-EDN concentration was significantly ($p=0.037$) higher in first months old infants who exposed to higher concentrations of IgE and Th2-associated cytokines (IL-4, IL-5, TSLP) via cord blood and breast milk and didn't initiate vitamin D prophylaxis after birth.

Keywords: cytokines, cord blood, breast milk, immune programming

■ ВВЕДЕНИЕ

Основным направлением борьбы с эпидемией аллергических заболеваний является первичная профилактика, в основе которой лежит формирование иммунной толерантности [1, 2]. Внутриутробное и раннее постнатальное развитие, а именно первая тысяча дней жизни, являются самым уязвимым временным промежутком для установления Th1/Th2 баланса и развития оральной толерантности [3, 4]. В этом контексте особый интерес представляет изучение влияний иммунных факторов матери на становление иммунной системы ребенка во время беременности и кормления грудью, так называемое иммунное программирование. Синтезируемые в организме матери цитокины, а также ее IgG могут попадать в организм плода трансплацентарно и участвовать в становлении и «обучении» иммунной системы ребенка. Иммунные факторы грудного молока не только компенсируют функциональную незрелость иммунной системы слизистых оболочек младенца, как предполагали ранее, но и могут пересекать интестинальный барьер и напрямую взаимодействовать с клетками иммунной системы. Благодаря этому они могут «обучать» и индуцировать дифференцировку иммунных клеток ребенка в определенном направлении, способствовать становлению мукозальной иммунной системы и формированию иммунной толерантности [5, 6].

В патогенезе аллергических заболеваний, особенно в детском возрасте, ключевую роль играет T2-воспаление, медиаторы которого индуцируют дифференцировку Т-лимфоцитов в Th2-типа, переключение В-лимфоцитов на синтез IgE и миграцию эозинофилов с развитием эозинофильного воспаления [7, 8]. Количество эозинофилов в периферической крови не может использоваться с диагностической целью и

для оценки активности аллергического процесса, так как не имеет прямой корреляции с концентрацией их в шоковом органе. Кроме того, число эозинофилов в периферической крови имеет циркадные ритмы, а также подвержено влиянию внешних факторов, таких как, например, курение [9, 10].

Измерение активности дегрануляции эозинофилов имеет биологически более важное значение, чем просто определение количества эозинофилов [11]. Активированные эозинофилы выделяют из своих гранул цитокины, липидные медиаторы, хемотаксические полипептиды и цитотоксические белки. Цитотоксические эозинофильные белки включают главный основной белок, эозинофильную пероксидазу, эозинофильный катионный белок (ЭоКБ) и эозинофильный нейротоксин (ЭоН). Два последних из перечисленных рассматриваются как потенциальные маркеры аллергических заболеваний [12, 13]. Однако ЭоН имеет ряд преимуществ в том числе и для использования в рутинной клинической практике. Содержание этого белка может одинаково эффективно измеряться в различных биологических жидкостях – кровь, стул, моча, бронхоальвеолярный лаваж [14]. Возможность использовать неинвазивные методики для получения биоматериала особенно актуальна в педиатрии. В отличие от ЭоКБ и числа эозинофилов в периферической крови концентрация ЭоН зависит от активности и стадии воспалительного процесса, что важно для ранней диагностики и мониторинга лечения заболевания [15, 16]. Физические свойства эозинофильного нейротоксина также определяют ряд его преимуществ. ЭоН в силу его катионных свойств менее «липкий», в отличие от ЭоКБ, что препятствует прилипанию к стенкам пробирки и, соответственно, минимизирует ошибки в определении концентрации. ЭоН имеет высокую стабильность при хранении, в том числе после повторных циклов замораживание-оттаивание. При комнатной температуре его концентрация в крови остается стабильной в течение 24 часов, при температуре от +4 °C до +8 °C – 7 дней, при замораживании минимум год. ЭоН не имеет циркадных ритмов и не чувствителен к курению. Таким образом, с лабораторной и аналитической точки зрения все перечисленные свойства делают эозинофильный нейротоксин очень привлекательным маркером активации эозинофилов, хорошо отражающим активность эозинофильного воспаления [11].

Уровень эозинофильных белков активно изучается при различных аллергических заболеваниях прежде всего с целью мониторинга эффективности их лечения и оценки тяжести заболевания. Однако содержание эозинофильных белков в крови и моче у детей первого года жизни, в период становления иммунной толерантности и в доклиническую стадию аллергических заболеваний не исследовано, что определяет актуальность нашей работы.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить концентрацию эозинофильного нейротоксина в моче у младенцев первых месяцев жизни, выделить иммунные факторы пуповинной крови и грудного молока, а также клиничко-anamnestические данные, влияющие на его содержание.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для участия в исследовании были включены 102 беременные женщины и рожденные ими дети (n=102) в соответствии с разработанными критериями. Критерии включения: беременные женщины (III триместр) в возрасте 18–45 лет с неотягощенным

и отягощенным индивидуальным аллергоанамнезом (бронхиальная астма, аллергический ринит, атопический дерматит или аллергический контактный дерматит); наличие информированного согласия на участие в исследовании. Критерии невключения: беременность, наступившая в результате ЭКО; соматическая патология в стадии суб- и декомпенсации; сахарный диабет. Критерии исключения: отказ от участия в исследовании, отсутствие комплаентности, патологическое течение беременности, признаки инфекционного заболевания в течение месяца, предшествующего родам, прием стероидов за 1 месяц до исследования. Критерий включения для детей: письменное информированное согласие родителей на участие ребенка в исследовании. Критерии невключения: недоношенность, ребенок, родившийся в результате ЭКО. Критерии исключения: тяжелое течение сопутствующей соматической патологии, признаки инфекционного заболевания в неонатальном периоде, отказ родителей от участия в исследовании, отсутствие комплаентности. Набор женщин и детей в группы осуществляется на базе УЗ «Гродненский областной клинический перинатальный центр» и УЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи г. Гродно» (акушерско-физиологические отделения, отделения для новорожденных детей). Дети наблюдались в динамике с момента рождения до 3 месяцев включительно. С помощью специально разработанной анкеты у женщин, включенных в исследование, выяснялись акушерский и аллергологический анамнез, особенности быта семьи, прием витамина D.

Материалом для исследования служили пуповинная кровь, грудное молоко, полученное у женщины через 1 месяц после рождения ребенка; моча, собранная у младенцев в возрасте 1 и 3 месяца.

Матери детей были подробно инструктированы о способе сбора образцов грудного молока и мочи у их младенцев. Забор пуповинной крови осуществляла акушерка родового отделения.

Мочу собирали в стерильные пластиковые контейнеры, после чего их хранили в холодильнике – температурный диапазон от +4 до +8 °C. В течение 4–6 часов от момента сбора пробы мочи доставлялись в лабораторию, где их замораживали в эпипендорфах для длительного хранения при температуре –24 °C.

Грудное молоко мать сцеживала в стерильные пластиковые контейнеры, которые хранили в холодильнике при диапазоне температуры от +4 °C до +8 °C. В течение последующих 4–6 часов пробы доставляли в лабораторию, где грудное молоко замораживали в микропробирках и хранили первые месяцы при температуре –24 °C, далее при –70 (80) °C. После оттаивания образцы центрифугировали при 1500×g в течение 15 мин. при +4 °C, чтобы разделить жировой и водный слои. Липидный слой удаляли кончиком пипетки, для иммуноферментного анализа использовали полупрозрачную сыворотку.

Пуповинную кровь забирали после рождения ребенка шприцом из пуповинного остатка со стороны плаценты из v. umbilicalis в пробирки с ЭДТА. После забора пробирки с кровью хранились при температуре +4 °C не более 6–8 часов, после чего кровь центрифугировали 1500×g в течение 10 мин. для получения плазмы. Аликвоты по 1 мл хранили в эпипендорфах при –24 °C в течение первых 3 месяцев, далее при температуре –70–80 °C в течение 2 лет.

Концентрацию эозинофильного нейротоксина в моче определяли методом иммуноферментного анализа согласно инструкции изготовителя ИФА-наборов

(Cloud-Clone Corp., США) с использованием автоматического ИФА-анализатора SUNRISE TECAN (Австрия). Поскольку объем выделенной мочи был неизвестен, результаты содержания ЭоН в моче представлены с пересчетом на креатинин (мкг/ммоль Cr). Содержание креатинина в моче определяли кинетическим методом, основанным на реакции Яффе, согласно инструкции к используемым тест-системам (Diasens, Республика Беларусь), измерение проводили на автоматическом анализаторе Mindray BS 330.

IgE и цитокины (ИЛ-4, ИЛ-5, TSLP, ИЛ-6, ИЛ-10, TGF β 1) в грудном молоке и пуповинной крови определяли методом ИФА согласно рекомендациям в инструкции к используемым ИФА-наборам (Fine test, Китай) на автоматическом анализаторе SUNRISE TECAN (Австрия).

Статистический анализ выполнен с использованием программы Statistica 10.0, лицензионный номер AXXAR207F394425FA-Q. Учитывая, что распределение большинства изученных признаков было отличным от нормального, применяли методы непараметрической статистики. Количественные переменные представлены в виде медианы и нижнего и верхнего квартилей (Me [Q₁; Q₃]). Качественные переменные описывали абсолютными значениями и относительными частотами. Межгрупповые различия оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни и ANOVA Краскела – Уоллиса. Проводился непараметрический корреляционный анализ по Спирмену. Нулевая гипотеза отвергалась при $p \leq 0,05$, для промежуточных значений $0,05 < p \leq 0,10$ обсуждали тенденцию к достоверности.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В проспективное когортное исследование было включено 102 пары мама – ребенок. Характеристика обследуемых представлена в табл. 1.

Уровни эозинофильного нейротоксина в моче у младенцев в возрасте 1 месяц и 3 месяца представлены в табл. 2. Содержание эозинофильного нейротоксина в моче у детей в указанные возрастные периоды статистически значимо не различалось ($p > 0,05$).

Такие факторы, как пол ребенка, вид родоразрешения, курение родителей, а также аллергологический анамнез матери и отца, не оказывали значимого влияния на содержание ЭоН в моче младенцев ($p > 0,05$).

В рамках динамического клинического наблюдения особое внимание уделяли состоянию кожных покровов и жалобам со стороны желудочно-кишечного тракта у детей, поскольку в первые месяцы жизни наиболее частыми проявлениями аллергии являются атопический дерматит и/или пищевая аллергия с характерными кожными либо желудочно-кишечными симптомами (срыгивания, запоры, изменения характера стула) [17–19].

В возрасте 1 месяц только у 9 детей (9/102) кожные покровы были сухими (ксероз кожи) и у 2 (2/102) изменения в состоянии кожных покровов были похожи на дебют атопического дерматита или пищевой аллергии с кожными проявлениями, однако для верификации этих диагнозов требовались время и дополнительные исследования. Детей с токсической эритемой в анамнезе не было. К 3-месячному возрасту диагноз «атопический дерматит» выставлен 4 детям (4/102 детей), сухие кожные покровы отмечались у 27 обследуемых (27/102) и у 10 детей (10/102) состояние кожных покровов было похожим на дебют атопического дерматита. Срыгивания у детей группы

Таблица 1
Характеристика группы обследуемых
Table 1
Characteristics of the study group

Количество детей	n	%
	102	100
Пол		
Девочки	39	38,2
Мальчики	63	61,8
Вид вскармливания на 1-м месяце жизни		
Естественное	58	56,9
Смешанное	26	25,5
Искусственное	18	17,6
Вид вскармливания на 3-м месяце жизни		
Естественное	57	55,9
Смешанное	11	10,8
Искусственное	34	33,3
Вид родоразрешения		
Вагинальные роды	51	50,0
Кесарево сечение	51	50,0
Аллергическое заболевание		
У матери	45	44,1
У отца	21	20,5
Курение родителей	46	45,1
Прием профилактических доз витамина D		
На 1-м месяце жизни	42	41,2
На 3-м месяце жизни	76	74,5

Таблица 2
Содержание эозинофильного нейротоксина (мкг/ммоль Cr) в моче младенцев в возрасте 1 месяца (ЭоН 1) и 3 месяца (ЭоН 2)
Table 2
Urine eosinophil-derived neurotoxin concentration (µg/mmol Cr) in 1 month old infants (EDN1) and in 3 months old infants (EDN2)

	n	Me	Q ₁ ; Q ₃	P10	P90	Min-Max
ЭоН 1	102	19,7	14,1; 32,2	8,2	50,5	4,2–189,7
ЭоН 2	91	18,7	10,5; 30,9	8,1	41,9	0,4–90,7

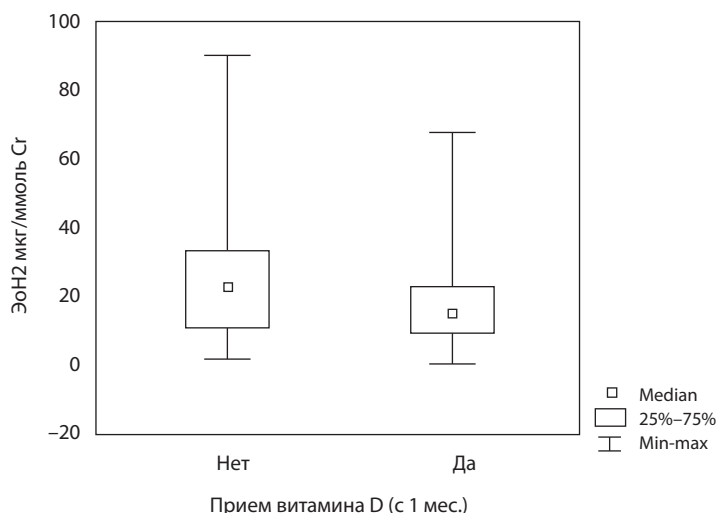
обследования не носили патологического характера. Количество детей с жалобами их матерей на плотный замазкообразный стул или запоры в возрасте 1 месяц было 9 (9/102), в возрасте 3 месяцев таких детей было 13 (13/102). Статистический анализ не выявил связи концентрации ЭоН в представленные возрастные периоды с состоянием кожных покровов и жалобами со стороны желудочно-кишечного тракта, что может быть обусловлено небольшим количеством детей в возрасте 1 месяц с указанными состояниями, а появление описываемых симптомов на третьем месяце жизни, по-видимому, требует времени для реализации эффекта.

Роль витамина D как одного из основных регуляторов фосфорно-кальциевого обмена хорошо известна. Согласно рекомендациям по профилактике рахита, начинать прием профилактических доз витамина D необходимо с первого месяца жизни всем детям вне зависимости от вида вскармливания и сезона года. Еще одним свойством

витамина D, которое не менее активно обсуждается в контексте профилактики иммуноопосредованных заболеваний, является его иммунорегуляторная активность. Считается, что витамин D может активировать Treg-клетки, которые в свою очередь, подавляют активацию аллерген-специфических Т-клеток, что впоследствии снижает выработку sIgE В-лимфоцитами [20, 21]. В научных исследованиях неоднократно отмечалась связь недостатка витамина D с сенсibilизацией, пищевой аллергией, экземой и астмой [22, 23]. Однако публикации о роли витамина D в отношении первичной профилактики развития аллергических заболеваний не всегда однозначны [24, 25].

Нами было проанализировано содержание эозинофильного нейротоксина в моче у детей в зависимости от времени начала приема профилактических доз витамина D (см. рисунок). Так, у детей, принимающих витамин D с первого месяца жизни, медиана концентрации ЭоН в возрасте 3 месяцев была значительно ($p=0,037$) ниже, чем у младенцев, которые начали прием витамина D позже, и составила 14,1 мкг/ммоль Cr [9,2; 22,7] и 22,4 мкг/ммоль Cr [10,6; 33,7] соответственно. В данном контексте следует отметить, что уровень ЭоН в моче не зависел от сезона, в который ребенок родился, а также от вида вскармливания.

С точки зрения иммунного программирования интересным было проанализировать цитокиновый профиль пуповинной крови и грудного молока, а также связь этих показателей с уровнем ЭоН в моче младенцев. Предполагается, что T1-ассоциированные (ИЛ-6), иммунорегуляторные (ИЛ-10, TGF- β 1) и T2-ассоциированные (ИЛ-4, ИЛ-5, TSLP) цитокины, а также иммуноглобулин IgE, попадая в организм ребенка с пуповинной кровью, а после рождения с грудным молоком, оказывают влияние на процессы становления его иммунной системы, установление T1/T2



Содержание ЭоН в моче (мкг/ммоль Cr) у младенцев в возрасте 3 месяцев в зависимости от того, принимал ребенок витамин D с первого месяца жизни или нет
Urine eosinophil-derived neurotoxin concentration (mcg/mmol Cr) in infants aged 3 months, depending on whether the child took vitamin D from the first month of life or not

баланса и формирование оральной толерантности. Сдвиг равновесия в сторону Т2-доминирования у детей первых месяцев жизни может сопровождаться активацией эозинофилов, но отсутствием пока четких клинических симптомов в связи с низкой активностью эозинофильного воспаления.

У части пар мама – ребенок получены образцы грудного молока и пуповинной крови, в которых определяли цитокины и IgE. В табл. 3 и 4 приведены данные описательной статистики (медиана, межквартильный размах, минимальные и максимальные значения) концентрации иммунных факторов в пуповинной крови и грудном молоке. Содержание в пуповинной крови ИЛ-4 ($r=0,6$; $p=0,0002$), ИЛ-5 ($r=0,5$; $p=0,003$), ИЛ-6 ($r=0,3$; $p=0,03$), ИЛ-10 ($r=0,7$; $p=0,0000$) и TSLP ($r=0,3$; $p=0,03$) положительно коррелировало с содержанием этих же цитокинов в грудном молоке.

Концентрации цитокинов в грудном молоке и пуповинной крови у женщин с разным аллергоанамнезом статистически значимо не различались ($p>0,05$). Мы предполагаем, что это может быть обусловлено тем, что аллергическое заболевание у женщин подгруппы исследования во время беременности и родов было либо в ремиссии, либо хорошо контролировалось медикаментозно. Анализ в зависимости от вида аллергического заболевания и тяжести его течения нами не проводился.

В табл. 5 приведены оценки связи изучаемых иммунных факторов с концентрацией эозинофильного нейротоксина в моче у детей. Как видно из табл. 5, концентрация

Таблица 3
Содержание цитокинов (пг/мл) и IgE (нг/мл) в пуповинной крови
Table 3
Cord blood cytokines concentration (pg/ml) and cord blood IgE level (ng/ml)

	n	Me	Q ₁ ; Q ₃	Min-Max
ИЛ-4	34	56,4	31,8; 75,7	16,4–3620,4
ИЛ-5	34	24,7	16,3; 66,6	НЛД–1805,1
TSLP	49	67,9	34,9; 140,2	9,7–4440,0
ИЛ-6	34	6,0	5,0; 7,2	2,9–63,1
ИЛ-10	34	8,5	3,9; 24,7	0,9–553,0
TGFβ ₁	34	2253,2	2078,8; 2474,8	1764,2–3613,8
IgE	34	27,9	23,8; 38,7	10,3–112,0

Примечание: в этой и следующей таблице НЛД – ниже лимита детекции.

Таблица 4
Содержание цитокинов (пг/мл) и Ig (нг/мл) в грудном молоке, полученном через 1 месяц после рождения ребенка
Table 4
Breast milk (1 mo after giving birth) cytokines concentration (pg/ml) and breast milk IgE level (ng/ml)

	n	Me	Q ₁ ; Q ₃	Min-Max
ИЛ-4	34	53,3	45,1; 122,2	7,2–5806,0
ИЛ-5	30	10,7	5,9; 126,7	НЛД–3170,0
TSLP	35	41,0	14,9; 97,0	НЛД–6247,0
ИЛ-6	34	7,9	6,7; 8,9	5,2–15,1
ИЛ-10	34	9,3	2,5; 110,7	0,3–623,0
TGFβ ₁	24	102,5	89,3; 118,8	65,0–375,0
IgE	34	24,2	15,3; 35,9	5,7–117,0

основных Т2-ассоциированных цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-5 в пуповинной крови положительно коррелирует с содержанием эозинофильного нейротоксина в моче младенцев в возрасте 1 месяц; концентрации TSLP как в пуповинной крови, так и грудном молоке в 1 месяц после рождения ребенка достоверно положительно связаны с содержанием эозинофильного нейротоксина в моче младенцев в возрасте 3 месяца.

Материнский IgE, как принято считать, не проникает через плаценту, соответственно, весь иммуноглобулин E, определяемый в пуповинной крови, фетального происхождения. В недавних исследованиях было показано, что IgE определяется в пуповинной крови уже с 11-й недели внутриутробного развития, и, как обсуждают ученые, потенциально это возможно, поскольку уже с 9 недель у плода появляются зрелые В-лимфоциты [26, 27]. Дискуссии об источнике этого иммуноглобулина в пуповинной крови продолжаются – в некоторых публикациях речь идет о возможном материнско-фетальном трансфере [28]. Тем не менее, возможность использовать содержание IgE в пуповинной крови в качестве предиктора развития аллергического заболевания в будущем у ребенка уже была показана в ряде работ и продолжает обсуждаться в настоящее время. Согласно полученным нами данным, уровень IgE в пуповинной крови и в грудном молоке статистически значимо положительно связан с концентрацией ЭоН в моче младенцев в возрасте 1 и 3 месяца соответственно.

Недавний систематический обзор EAACI показал, что грудное вскармливание не снижает риск пищевой аллергии [29]. Это перекликается с рекомендациями Американской академии педиатрии (AAP), консенсусного заявления AAAAI/ACAAI/CSACI 2020, указывающими на то, что, согласно имеющимся научным данным, нельзя сделать однозначных выводов о роли грудного вскармливания в предотвращении или отсрочке развития пищевой аллергии. Что касается экземы, AAP пришло к выводу, что исключительно грудное вскармливание в течение 3–4 месяцев после рождения снижает развитие экземы в первые 2 года жизни. Тем не менее, грудное вскармливание однозначно рекомендуется всеми перечисленными организациями с точки

Таблица 5

Корреляционный анализ связи концентрации эозинофильного нейротоксина в моче младенцев в возрасте 1 (ЭоН 1) и 3 месяца (ЭоН 2) с содержанием иммунных факторов в пуповинной крови (ПК) и грудном молоке (ГМ) женщин, полученном через 1 месяц после рождения ребенка

Table 5

Spearman correlation analysis of urine eosinophil-derived neurotoxin concentration ($\mu\text{g}/\text{mmol Cr}$) in 1 month old infants (EDN1) and in 3 months old infants (EDN2) with cord blood cytokines concentration (pg/ml) and cord blood IgE level (ng/ml) as well as breast milk (1 mo after giving birth) cytokines concentration (pg/ml) and breast milk IgE level (ng/ml)

	Цитокины – биоматериал	n	Spearman-R	p
ЭоН 1	IgE – ПК	34	0,35	0,045
	ИЛ-4 – ПК	34	0,36	0,034
	ИЛ-5 – ПК	34	0,34	0,053
ЭоН 2	IgE – ПК	29	0,35	0,060
	IgE – ГМ	29	0,46	0,012
	ИЛ-4 – ПК	29	0,35	0,065
	ИЛ-5 – ПК	29	0,35	0,062
	TSLP – ПК	43	0,30	0,050
	TSLP – ГМ	30	0,41	0,024

зрения преимуществ в становлении здоровой микробиоты у младенцев, играющей определяющую роль в формировании иммунной толерантности, что в свою очередь может быть связано с уменьшением риска развития иммуноопосредованных заболеваний и аллергии в том числе. В данной работе мы также не обсуждаем роль регуляторных и Т1-ассоциированных цитокинов, содержащихся в грудном молоке и пуповинной крови, которые вносят дополнительный вклад в формирование здоровой иммунной системы у ребенка.

Одним из ограничений представленного исследования является небольшой объем выборки пуповинной крови и грудного молока, что могло ограничить статистическую мощность исследования, и поэтому на данном этапе нет возможности сделать однозначные выводы об отсутствии влияния со стороны некоторых представленных факторов.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С точки зрения иммунного программирования, начинающегося внутриутробно и продолжающегося после рождения ребенка, ряд внешних факторов, воздействующих на младенца в эти периоды, несомненно, играет определенную роль в сдвиге Th1/Th2 равновесия в сторону Th2 доминирования и активации эозинофилов уже в первые месяцы жизни. Согласно представленным данным, концентрация эозинофильного нейротоксина в первые месяцы жизни выше у младенцев, которые подверглись экспозиции более высоких концентраций IgE и Th2-ассоциированных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5, TSLP) внутриутробно через пуповинную кровь и с грудным молоком, а также у детей, не принимавших профилактические дозы витамина D с первого месяца жизни. Продолжение исследований в этом направлении необходимо для оценки возможности использовать эозинофильный нейротоксин в качестве биомаркера нарушения формирования оральной толерантности.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Yaghoubi M., Adibi A., Safari A. The projected economic and health burden of uncontrolled asthma in the United States. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(9):1102–1112. doi: 10.1164/rccm.201901-0016OC.
2. Asher M.I., Rutter C.E., Chiang C.Y. Worldwide trends in the burden of asthma symptoms in school-aged children: Global Asthma Network Phase I cross-sectional study. *Lancet*. 2021;398(10311):1569–1580. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01450-1.
3. Park J.E., Jardine L., Gottgens B. Prenatal development of human immunity. *Science*. 2020;368(6491):600–603. doi: 10.1126/science.aaz9330.
4. Wopereis H., Oozeer R., Knipping K. The first thousand days – intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014;25(5):428–438. doi: 10.1111/pai.12232.
5. Rothers J., Stern D., Lohman I.C. Maternal cytokine profiles during pregnancy predict asthma in children of mothers without asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018;59(5):592–600. doi: 10.1165/rcmb.2017-0410OC.
6. Rio-Aige K., Azagra-Boronat I., Massot-Cladera M. Association of maternal microbiota and diet in cord blood cytokine and immunoglobulin profiles. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22(4):1778. doi: 10.3390/ijms22041778.
7. Gurram R.K., Zhu J. Orchestration between ILC2s and Th2 cells in shaping type 2 immune responses. *Cell Mol Immunol*. 2019;16:225–235. doi: 10.1038/s41423-019-0210-8.
8. Yang L., Fu J., Zhou Y. Research Progress in Atopic March. *Front. Immunol*. 2020;11:1907. doi: 10.3389/fimmu.2020.01907.
9. Dorosoz A., Grosicki M., Dybas J. Eosinophils and neutrophils – molecular differences revealed by spontaneous Raman, CARS and fluorescence microscopy. *Cells*. 2020;9(9):2041. doi: 10.3390/cells9092041.
10. An J., Lee J.H., Sim J.S. Serum eosinophil-derived neurotoxin better reflect asthma control status than blood eosinophil counts. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(8):2681–2688. doi: 10.1016/j.jaip.2020.03.035.
11. Malinovsky A., Rydell N. Clinical potential of eosinophil-derived neurotoxin in asthma management. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2023;11(3):750–761. doi: 10.1016/j.jaip.2022.11.046.
12. Kim H., Kwon G.E., Kim Y.H. Comparison of serum eosinophil-derived neurotoxin levels between wheezing and non-wheezing groups in children with respiratory tract infection. *J Asthma*. 2020;57(11):1211–1215. doi: 10.1080/02770903.2019.1642349.
13. Rydell N., Nagao M., Ekoff H. Development of an automated ImmunoCAP research assay for eosinophil derived neurotoxin and its use in asthma diagnosis in children. *Pract Lab Med*. 2019;17:e00138. doi: 10.1016/j.plabm.2019.e00138.

14. Rutten B., Young S., Rhedin M. Eosinophil-derived neurotoxin: A biologically and analytically attractive asthma biomarker. *Plos One*. 2021;16(2):e0246627. doi: 10.1371/journal.pone.0246627.
15. Fainardi V., Santoro A., Caffarelli C. Preschool wheezing: trajectories and long-term treatment. *Frontiers in pediatrics*. 2020;8(8):240. doi: 10.3389/fped.2020.00240.
16. Lee Y., Lee J.H., Yang E.M. Serum Levels of Eosinophil-Derived Neurotoxin: A Biomarker for Asthma Severity in Adult Asthmatics. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2019;11(3):394–405. doi: 10.4168/aa.2019.11.3.394
17. Meyer R., Fox A.T., Chebar Lozinsky A. Non-IgE-mediated gastrointestinal allergies – Do they have a place in a new model of the Allergic March. *Pediatr Allergy Immunol*. 2019;30(2):149–158. doi: 10.1111/pai.13000.
18. Yang L., Fu J., Zhou Y. Research progress in atopic march. *Front Immunol*. 2020;11:1907. doi: 10.3389/fimmu.2020.01907
19. Strugar T.L., Kuo A., Seité S. Connecting the Dots: From Skin Barrier Dysfunction to Allergic Sensitization, and the Role of Moisturizers in Repairing the Skin Barrier. *J Drugs Dermatol*. 2019;18(6):581.
20. Vijayendra Chary A., Hemalatha R., Seshacharyulu M. Vitamin D deficiency in pregnant women impairs regulatory T cell function. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;147:48–55. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.11.020.
21. Brough H.A., Lanser B.J., Sindher S.B. Early intervention and prevention of allergic diseases. *Allergy*. 2022;77(2):416–441. doi: 10.1111/all.15006.
22. Hennessy Á., Hourihane J.O., Malvisi L. Antenatal vitamin D exposure and childhood eczema, food allergy, asthma and allergic rhinitis at 2 and 5 years of age in the atopic disease-specific Cork BASELINE Birth Cohort Study. *Allergy*. 2018;73(11):2182–2191. doi: 10.1111/all.13590.
23. Thorisdottir B., Gunnarsdottir I., Vidarsdottir A.G. Infant feeding, vitamin D and IgE sensitization to food allergens at 6 years in a longitudinal Icelandic cohort. *Nutrients*. 2019;11(7):1690. doi: 10.3390/nu11071690.
24. Yepes-Nuñez J.J., Brożek J.L., Fiocchi A. Vitamin D supplementation in primary allergy prevention: Systematic review of randomized and non-randomized studies. *Allergy*. 2018;73(1):37–49. doi: 10.1111/all.13241.
25. Hawrylowicz C.M., Santos A.F. Vitamin D: can the sun stop the atopic epidemic? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2020;20(2):181–187. doi: 10.1097/ACI.0000000000000613.
26. Hopp R.J., Salazar P., Pasha M.A. Allergic food sensitization and disease manifestation in the fetus and infant: a perspective. *Allergies*. 2021;1(2):115–122. doi: 10.3390/allergies1020009
27. Msallam R., Balla J., Rathore A.P. Fetal mast cells mediate postnatal allergic responses dependent on maternal IgE. *Science*. 2020;370(6519):941–950. doi: 10.1126/science.aba0864.
28. Bønnelykke K., Pipper C.B., Bisgaard H. Transfer of maternal IgE can be a common cause of increased IgE levels in cord blood. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(3):657–663. doi: 10.1016/j.jaci.2010.06.027.
29. Brough H.A., Lanser B.J., Sindher S.B. Early intervention and prevention of allergic diseases. *Allergy*. 2022;7(2):416–441. doi: 10.1111/all.15006.