

ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМНОГО И ФЕКАЛЬНОГО ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ ИЗ ГРУППЫ РИСКА ПО РАЗВИТИЮ ПИЩЕВОЙ АЛЛЕРГИИ

Шуматова Т.А.¹, Приходченко Н.Г.¹, Григорян Л.А.¹, Ни А.Н.¹, Зернова Е.С.¹, Катенкова Э.Ю.¹

¹*Тихоокеанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Владивосток, e-mail: prikhodchenko n@mail.ru*

С целью изучения особенностей системного и фекального гуморального иммунитета у детей из группы риска по развитию пищевой аллергии в зависимости от наличия сочетания полиморфных аллелей генов MTHFR, MTRR, MTR было обследовано 50 детей от 1 до 6 месяцев из группы высокого риска по развитию пищевой аллергии. Изучали состояние гуморального иммунного статуса (иммуноглобулины А, М, G, общего IgE и цитокинов TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-8, IL-13) в сыворотке крови и копрофильtrate. В результате проведенного исследования нами было установлено, что изменение профиля цитокинов в крови и копрофильtrate в различной степени было зафиксировано у носителей всех полиморфных аллелей генов MTHFR, MTRR, MTR и уровень был достоверно выше у носителей нескольких полиморфизмов. Выявленные в нашем исследовании изменения продукции цитокинов, с повышением сывороточного и фекального уровней IL-4, IL-13, снижением IFN- γ у детей из группы риска по формированию пищевой аллергии и наличием двух и более полиморфных аллелей генов фолатного цикла достоверно свидетельствует о запущенных механизмах реализации аллергического ответа.

Ключевые слова: фекальный уровень цитокинов, регуляция Th профиля, пищевая аллергия, обмен фолиевой кислоты, дети.

SYSTEMIC AND FECAL HUMORAL IMMUNE FEATURES IN INFANTS FROM THE RISK OF FOOD ALLERGY

Shumatova T.A.¹, Prihodchenko N.G.¹, Grigoryan L.A.¹, Ni A.N.¹, Zernova E.S.¹, Katenkova E.Yu.¹

¹*Pacific State Medical University, Vladivostok, e-mail: prikhodchenko n@mail.ru*

To study the characteristics of systemic and fecal humoral immunity in children at risk for developing food allergy, depending on the presence of a combination of polymorphism of the folate metabolism genes (MTHFR, MTRR, MTR), it was examined 50 children from 1 to 6 months of the high-risk group for food development allergies. The state of the humoral immune status (immunoglobulins A, M, G, total IgE and cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-8, IL-13) was studied in blood serum and fecal filter. We found that the change in the serum and fecal cytokines profile was recorded to varying degrees in the carriers of all allelic polymorphisms in the MTHFR, MTRR, and MTR genes and was significantly higher in carriers of several polymorphisms. The changes in cytokine production detected in our study, with an increase in serum and fecal levels of IL-4, IL-13, a decrease in IFN- γ in children at risk for food allergy formation and the presence of two or more polymorphic folate cycle alleles, an allergic response.

Keywords: fecal cytokine level, Th profile regulation, food allergy, folate metabolism, children.

В настоящее время рост аллергических заболеваний продолжает оставаться одной из самых актуальных проблем педиатрии и здравоохранения в целом, пищевая аллергия у детей в подавляющем большинстве случаев является стартовой, что обуславливает всевозрастающий интерес к ней, особенно в целях профилактики [1-3]. Отсутствие четких критериев, раннее присоединение нарушений процессов пристеночного и полостного пищеварения приводит к несостоятельности кишечного барьера, формированию полидефицитных состояний, реализации атопического марша [4; 5]. Определению факторов риска развития пищевой аллергии посвящено немало работ [2; 3; 6; 7].

Известно, что в основе аллергических заболеваний лежит наследственная предрасположенность, однако только изменением генов, появлением новых мутаций невозможно объяснить неуклонно увеличивающуюся роль аллергии в мире. Считают, что в большинстве случаев влияние факторов окружающей среды определяет реализацию генетической предрасположенности. Одним из перспективных направлений является поиск факторов, стимулирующих дифференцировку нулевых Th в направлении Th1-типа. Как известно, иммунная реакция развивается в направлении либо Th1, либо Th2-типа и определяет характер заболеваний. Обе эти субпопуляции различаются по набору синтезируемых цитокинов. Эмбриональные лимфоциты человека в перинатальном периоде смещены в сторону Th2-профиля, что обеспечивает благоприятное течение беременности [1; 8; 9]. В постнатальном периоде под активным воздействием внешних антигенов, микробного фактора происходит активное образование Th0, активный синтез T-reg и постепенное переключение Th2 профиля иммунной системы на Th1 профиль, что в свою очередь препятствует развитию аллергии у детей [10; 11]. Факторы, блокирующие данный процесс, в настоящее время окончательно не установлены. Известно, что дифференцировка развивающейся Th-клетки во многом зависит от метилирования ДНК и модификации гистонов [12]. В связи с этим особый интерес вызывает изучение процессов гипо- и гиперметилирования генома и нарушения обмена метионина. Изменения функционирования фолатного цикла приводят к нарушениям метаболизма метионина, синтеза нуклеотидов, репарации и метилирования ДНК, вызывают дестабилизацию генома и нарушение хромосомной сегрегации [11; 13]. Исследования прошлых лет установили ассоциацию полиморфизма генов фолатного цикла с увеличением риска развития пищевой гиперчувствительности у детей [2; 3]. При анализе литературы мы не нашли исследований, посвященных изучению особенностей гуморального иммунитета у детей из группы риска пищевой аллергии в зависимости от наличия и сочетания полиморфных аллелей генов фолатного обмена.

Цель исследования - изучить особенности системного и местного гуморального иммунитета у детей - носителей полиморфных аллелей генов фолатного обмена (MTHFR, MTRR, MTR).

Материал и методы исследования. Обследовано 50 детей от 1 до 6 месяцев жизни из группы высокого риска по развитию пищевой аллергии. На момент обследования данных за аллергическое заболевание в анамнезе не было ни у одного ребенка. Всем детям осуществлено комплексное клиническое, иммунологическое и генетическое обследование. Изучали состояние гуморального иммунного статуса (иммуноглобулины А, М, G, общего иммуноглобулина Е и цитокинов TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-8, IL-13) в сыворотке крови и

копрофильtrate. Генотипы и аллели генов метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR C6777T и A1298C, гена метионинсинтазы-редуктазы MTRR G66A определяли методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК с последующим рестрикционным анализом. В ходе исследования все дети были разделены на 3 группы. 1-ю группу (n=13) составили дети - носители генов MTHFR C6777C и A1298A, MTRR G66G (с отсутствием патологических аллелей), 2-ю группу (n=11) составили дети - носители одного из полиморфных вариантов (аллеля T промоторного полиморфизма MTHFR C6777T, аллеля C промоторного полиморфизма MTHFR A1298C, аллеля A промоторного полиморфизма MTRR G66A), 3-ю группу (n=26) - с сочетанием 2-3 указанных полиморфизмов.

Оценку полученных результатов и комплексный системный анализ данных проводили методом вариационной статистики с вычислением средней относительной величины (P), ошибки средней относительной величины (mp), средней арифметической (M), ошибки средней арифметической (m), достоверность различий проверяли при помощи U-критерия Манна-Уитни при заданном уровне значимости (p). Результаты статистического анализа принимались как достоверные при $p < 0,05$.

Статистическую обработку материала выполняли с помощью специализированных пакетов прикладных программ для исследований (Excel-2010 и Statistica 10.0 for Windows). Дескриптивные статистики в работе представлены как $M \pm m$, где M - среднее, m - стандартная ошибка средней величины.

Результаты исследования

Мы изучили показатели системного и фекального уровня иммуноглобулинов у детей из группы риска по развитию аллергии. Анализ уровня сывороточного иммуноглобулина M и иммуноглобулина G в сыворотке крови не показал достоверных отличий в группах наблюдаемых больных ($p > 0,05$, табл. 1). Обращало на себя внимание, что у детей с наличием одного или сочетанием нескольких полиморфных аллелей были снижены показатели сывороточного иммуноглобулина A ($p < 0,05$). Содержание иммуноглобулина E в сыворотке крови у пациентов 3-й группы не выходило за пределы референсных значений, но было достоверно выше (табл. 1), чем в 1-й и 2-й группах ($p < 0,001$).

Таблица 1

Сывороточный уровень иммуноглобулинов у детей из группы риска по развитию аллергии,

$M \pm m$

Показатели	Группы		
	I группа (n=11)	II группа (n=13)	III группа (n=26)
Ig A, г/л	0,41±0,02	0,26±0,02 ^Δ	0,21±0,02**

Ig M, г/л	0,39±0,08	0,53±0,05	0,57±0,04
Ig G, г/л	4,96±0,41	6,12±0,62	8,33±0,84
Ig E, КЕ/л	1,28±0,14	1,41±0,18	16,14±1,05*.*.*

Примечания:

Δ - достоверность различий между показателями I и II группы, p<0,05;

* - достоверность различий с показателями II и III группы, p<0,05;

.. - достоверность различий с показателями I и III группы, p<0,05.

Было выявлено статистически значимое повышение фекального уровня иммуноглобулина М и иммуноглобулина G у детей с наличием нескольких патологических полиморфных аллелей (группа 3, таблица 2).

Таблица 2

Фекальный уровень иммуноглобулинов у детей из группы риска по развитию аллергии,

M±m

Показатели	Группы		
	I группа (n=11)	II группа (n=13)	III группа (n=26)
IgG, г/л	8,084±0,032	9,994±0,412	12,766±0,498*.*.*
Ig M, г/л	4,915±0,211	5,506±0,211	8,946±0,541*.*.*
sIgA, г/л	0,531±0,031	0,401±0,006	0,188±0,076*.*.*
IgE, г/л	1,561±0,211	2,112±0,091 Δ	3,312±0,521*.*

Примечания:

Δ - достоверность различий между показателями I и II группы, p<0,05;

* - достоверность различий с показателями II и III группы, p<0,05;

.. - достоверность различий с показателями I и III группы, p<0,05.

Обращало на себя внимание выраженное снижение секреторного иммуноглобулина А в копрофильтратах детей III группы более чем в 3 раза (p<0,01, табл. 2). Фекальный уровень иммуноглобулина Е имел статистически значимые различия во всех группах, более выраженные изменения были обнаружены нами при сочетании полиморфных аллелей МТНFR и МTRR, значимых различий между пациентами 2-й и 3-й групп выявлено не было.

Содержание цитокинов фактора некроза опухоли α, интерферона γ, интерлейкина 4, интерлейкина 8 и интерлейкина 13 в сыворотке крови в зависимости от наличия полиморфных аллелей генов фолатного обмена приведено в таблице 3.

Наше исследование показало достоверное уменьшение продукции сывороточного уровня интерферона-γ у пациентов II и III групп. При этом в группе детей с сочетанием полиморфных аллелей МТНFR и МTRR (III группа) регистрировали наиболее выраженное снижение (в 4 раза) содержания IFN γ в сыворотке (p<0,05). Содержание интерлейкина 4 в

крови у пациентов III группы составило $29,18 \pm 1,49$ пкг/мл, что было достоверно выше показателей I группы (в 8,3 раза, $p < 0,001$) и в 5,7 раза выше показателей II группы ($p < 0,05$). Исследование показало, что у детей III группы также была увеличена продукция фактора некроза опухоли α ($p < 0,001$) и интерлейкина 13 ($p < 0,05$).

Таблица 3

Сывороточный уровень цитокинов у детей из группы риска по развитию аллергии,
M \pm m

Показатели	Группы		
	I группа (n=11)	II группа (n=13)	III группа (n=26)
TNF- α , пкг/мл	2,21 \pm 0,19	3,04 \pm 0,28	14,05 \pm 0,91*.*.*
IFN- γ , пкг/мл	36,64 \pm 2,15	27,33 \pm 1,79 Δ	8,94 \pm 0,83*.*.*
IL -4, пкг/мл	3,51 \pm 0,17	5,09 \pm 0,41	29,18 \pm 1,49*.*.*
IL -8, пкг/мл	15,64 \pm 1,09	25,01 \pm 2,06 Δ	20,11 \pm 1,51
IL-13, пкг/мл	10,66 \pm 0,85	12,99 \pm 0,62	47,94 \pm 2,98*.*.*

Примечания:

Δ - достоверность различий между показателями I и II группы, $p < 0,05$;

* - достоверность различий с показателями II и III группы, $p < 0,05$;

..*- достоверность различий с показателями I и III группы, $p < 0,05$.

Мы изучили показатели фекального уровня цитокинов детей из группы риска по развитию пищевой аллергии. Анализ полученных данных выявил достоверное ($p < 0,05$) изменение изучаемых маркеров в копрофильтратах у пациентов с наличием одного или сочетанием нескольких полиморфных аллелей (табл. 4), наиболее выраженные изменения были зарегистрированы у детей с наличием 2 и более полиморфизмов.

Таблица 4

Фекальный уровень цитокинов у детей из группы риска по развитию аллергии,
M \pm m

Показатели	Группы		
	I группа (n=11)	II группа (n=13)	III группа (n=26)
TNF- α , пкг/мл	154,365 \pm 18,654	176,803 \pm 18,276	310,412 \pm 25,762*.*.*
IFN- γ , пкг/мл	2,336 \pm 0,224	1,853 \pm 0,761 Δ	1,583 \pm 0,468**
IL -4, пкг/мл	12,774 \pm 3,225	19, 264 \pm 4,412 Δ	71,294 \pm 3,789*.*.*
IL -8, пкг/мл	124,336 \pm 9,321	134,383 \pm 18,761	153,813 \pm 22,621*.*.*
IL-13, пкг/мл	108,374 \pm 12,815	116,816 \pm 20,662	328,121 \pm 24,698*.*.*

Примечания:

Δ - достоверность различий между показателями I и II группы, $p < 0,05$;

* - достоверность различий с показателями II и III группы, $p < 0,05$;

** - достоверность различий с показателями I и III группы, $p < 0,05$.

Обсуждение полученных результатов

Исследования последних лет убедительно доказали, что на развитие аллергических заболеваний у детей существенное влияние оказывает наследственность. При этом наряду с генетическими заболеваниями, для которых проявление мутации как этиологического фактора не зависит от влияния среды, подавляющее большинство заболеваний человека носит мультифакторный характер. Главной особенностью мультифакториальной патологии является то, что заболевание развивается только после контакта с определенным фактором, реализующим запуск заболевания, и это вызывает особенный интерес из-за возможности предотвратить или отодвинуть начало заболевания при исключении или уменьшении силы воздействия данного фактора. Гипо- и гиперметилирование генома, происходящее при нарушениях обмена метионина, вызвано изменением работы ферментов фолатного цикла и может вносить значительный вклад в формирование многих заболеваний, и пищевой аллергии в том числе [14]. Мутации в генах метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR и метионинсинтазы редуктазы MTRR способствуют формированию дефицита метаболитически активных форм фолиевой кислоты, блокируют превращение гомоцистеина в метионин, вызывают накопление в организме гомоцистеина. Все это сопровождается выраженным нарушением процесса метилирования ДНК, который считается одним из универсальных механизмов регуляции функции генов, необходим для нормального синтеза ДНК, РНК и других белков, важных для пролиферации клеток, обеспечения процессов нормального функционирования органов и тканей. Для переключения Th2-клеточного ответа на Th1-иммунный ответ необходима адекватная деметилизация Th1/Treg, что невозможно при нарушениях обмена метионина. Выявленные в нашем исследовании изменения продукции цитокинов, повышение сывороточного и фекального уровней интерлейкина 4 и интерлейкина 13, снижение интерферона γ у детей из группы риска по формированию ПА, без клинических признаков развившегося аллергического заболевания, достоверно свидетельствует о нарушении дифференцировки Treg, Th2- и Th1-лимфоцитов с преобладанием Th2-иммунного ответа, активации продукции интерлейкина 4, интерлейкина 5, интерлейкина 13 и недостаточностью Th1-иммунного ответа, проявляемого снижением продукции интерферона γ [1; 13]. Происходящее в последующем при контакте с антигеном выделение тучными клетками и базофилами различных биологически активных веществ и медиаторов, привлечение в аллергический процесс эозинофилов и экскреция Th2-клетками провоспалительных цитокинов (IL-3, IL-5, IL-8, TNF- α), воздействие на клетки кишечника

указанных медиаторов и вызывает развитие аллергического воспаления и манифестацию проявлений пищевой аллергии [1; 15].

Таким образом, в результате проведенного исследования нами было установлено, что изменение продукции иммуноглобулинов и цитокинов в сторону преобладания Th2-иммунного ответа было зафиксировано у детей - носителей аллельных полиморфизмов в генах MTHFR, MTRR в различной степени и уровень был достоверно выше у носителей нескольких полиморфизмов, что указывает на формирование у этих детей аллергического фенотипа и предрасположенность к аллергическим реакциям. Полученные данные предполагают необходимость дальнейших исследований для разработки патогенетически обоснованных методов дифференцированной профилактики пищевой аллергии, поиска методов коррекции фолатного обмена и метаболизма метионина, что особенно важно на первом году жизни ребенка, в период формирования иммунологической толерантности к пище. Все это может способствовать в свою очередь снижению аллергической заболеваемости в целом.

Список литературы

1. Балаболкин И.И. Пищевая аллергия у детей: современные аспекты патогенеза и подходы к терапии и профилактике // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2013. - № 3. - С. 36-46.
2. Прогнозирование пищевой непереносимости у детей: пат. RU 2501020 RU МПК G01N33/53 / Приходченко Н.Г., Шуматова Т.А.; патентообладатель Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Владивостокский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (ГБОУ ВПО «ВГМУ» Минздравсоцразвития России); заявл. 28.06.2012 г., опубл. 10.12.2013 г.
3. Украинцев С.Е. Профилактика аллергии: от иммунологии беременности до вскармливания детей первых месяцев жизни // Вопросы современной педиатрии. - 2016. - Т. 15, № 6. - С. 604-610.
4. Matsui E.C. Higher Serum Folate Levels are Associated with a Lower Risk of Atopy and Wheeze // J Allergy Clin Immunol., 2009, vol. 123 (6), pp. 1253–1259.
5. Scurlock A.M., Vickery B.P., Hourihane J.O., Burks A.W. Pediatric food allergy and mucosal tolerance // Mucosal Immunol., 2010, vol. 3 (4), pp. 345-354.
6. Лусс Л.В. Пищевые аллергены и пищевые добавки: роль в формировании пищевой аллергии и пищевой непереносимости // Эффективная фармакотерапия. - 2014. - Т. 33. -

C. 12-19.

7. Waterland R.A., Michels K.B. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis // *Annu. Rev. Nutr.*, 2007, vol. 27, pp. 363–388.
8. Зайцева С.В. Патогенетические возможности профилактики аллергии // *Трудный пациент*. - 2013. - Т. 11, № 8-9. - С. 48-54.
9. Пампура А.Н. Пищевая аллергия у детей раннего возраста // *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. - 2016. - Т. 95, № 3. - С. 152–157.
10. Haberg S., London S., Stigum H. et al. Folic acid supplements in pregnancy and early childhood respiratory health // *Arch. Dis. Child.*, 2009, vol. 94 (3), pp. 180–184.
11. Husemoen L., Toft U., Fenger M. The association between atopy and factors influencing folate metabolism: is low folate status causally related to the development of atopy? // *International Journal of Epidemiology*, 2006, vol. 35, pp. 954–961.
12. Steele L., Mayer L., Berin M.C. Mucosal immunology of tolerance and allergy in the gastrointestinal tract // *Immunol Res.*, 2012, vol. 54 (1), pp. 75-82.
13. Sanders V.M. Epigenetic regulation of Th1 and Th2 cell development // *Brain Behav. Immun.*, 2006, vol. 20 (4), pp. 317-324.
14. Berin M.C., Sampson H.A. Mucosal immunology of food allergy // *Curr. Biol.*, 2013, vol. 6 (23), pp. 389-400.
15. Роль метилирования ДНК и состояния фолатного обмена в развитии патологических процессов в организме человека / Т.А. Шуматова, Н.Г. Приходченко, Л.А. Оденбах, И.В. Ефремова // *ТМЖ*. - 2013. - Т. 54, № 4. - С. 39-43.