

Arg353Gln Polymorphism Reduces the Level of Coagulation Factor VII. In Vivo and in Vitro Studies. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997; 17: 2825-2829.

12. Heywood D., Mansfield M., Grant P. Factor VII gene polymorphisms, factor vii: C levels and features of insulin resistance in non-

insulindependent diabetes mellitus. *Thrombosis and Haemostasis* 1996; 75: 401-406.

13. Pushkov A.A. Number of polymorphic markers of hemostasis genes and genetic susceptibility to the adverse flow of coronary artery disease in patients with acute coronary syndrome. *Avtoreferat of dissertation for*

*the degree of PhD of Biology, Moscow* 2011, 22 p.

14. Medical-biological sciences: achievements and perspectives. *Sbornik materialov 1-y Vseros. nauch. konf. s mezhdunar. uchastiem*. Ed. by prof. MD S. I. Karas. *Tovsk, Nov. 10-11. 2011. Novosib, State Univers., 2011.* 136 p.

Надійшла 15.10.2013

УДК 612.398.132:637.14:613.287]-097.3-053.2

О. С. Прилуцький, В. Г. Воробйова, Д. О. Лесніченко, К. Є. Ткаченко

## ВИЗНАЧЕННЯ РІВНІВ СПЕЦИФІЧНИХ IgE ДО НЕЗБИРАНОГО МОЛОКА І МОЛЕКУЛ КАЗЕЇНУ СЕРЕД ДІТЕЙ РІЗНОГО ВІКУ

Донецький національний медичний університет ім. М. Горького, Донецьк, Україна

УДК 612.398.132:637.14:613.287]-097.3-053.2

А. С. Прилуцкий, В. Г. Воробьева, Д. А. Лесниченко, К. Е. Ткаченко

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЕЙ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgE К ЦЕЛЬНОМУ МОЛОКУ И МОЛЕКУЛАМ КАЗЕИНА У ДЕТЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

*Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Донецк, Украина*

Данная работа посвящена определению уровней специфических IgE-антител к цельному коровьему молоку и казеину у детей в возрасте от 5 мес. до 15 лет, страдающих atopическим дерматитом. Для диагностики использовали первые отечественные иммуноферментные тест-системы четвертого поколения производства ООО «Укрмед-Дон».

**Ключевые слова:** специфический IgE, молоко коровье, казеин.

UDC 612.398.132:637.14:613.287]-097.3-053.2

O. S. Prilutsky, V. G. Vorobyova, D. O. Lesnichenko, K. Ye. Tkachenko

### DETERMINATION OF THE LEVELS OF SPECIFIC IgE TO WHOLE MILK AND CASEIN MOLECULE IN CHILDREN OF DIFFERENT AGE

*The Donetsk National University named after M. Gorkiy, Donetsk, Ukraine*

One of the leading roles in the structure of allergic diseases belongs to food allergies. One of the most common and affordable food in our society is a cow's milk. One of the major allergens that contribute to the development of IgE-dependent allergy to milk is casein.

**The purpose** of this paper is to describe the frequency of sensitization both to cow's milk and one of its major antigens — casein, depending on the age, and carried out by the first national ELISA test systems for the determination of IgE-antibodies to the above-mentioned allergens.

**Materials and methods.** We investigated the serum of 78 children between 5 months and 15 years old with allergic dermatitis. Determination of the levels of total IgE, specific IgE both to cow's milk and casein in the serums was done by the first national ELISA test systems of fourth generation. We studied the age-distribution of the levels of specific IgE, calculated Kendall's rank correlation coefficients.

**Results.** Diagnostically significant levels of IgE both to cow's milk and casein were revealed in (23.1±4.8)% of patients. And the dynamics of their concentration as a function of age was almost identical. It was noted the decrease of the frequency of sensitization after 10 years. Direct ( $p<0.05$ ) strong significant correlation link between the levels of specific IgE-antibodies to cow's milk and casein was estimated ( $\tau=0.763$ ).

**Conclusions.** It is appropriate and promising to use the first national ELISA test systems of the fourth generation for the diagnosis of specific sensitization to cow's milk and casein.

**Key words:** specific IgE, cow's milk, casein.

Поширеність алергічних захворювань, у тому числі аліментарного генезу, стрімко зростає в усьому світі. Тому сьогодні розробка нових вискоєфективних молекулярних методів

діагностики та лікування алергії є, як ніколи, актуальною та затребуваною.

Не викликає сумніву той факт, що однією з провідних причин алергічних захворю-

вань є харчова алергія. Один із найбільш поширених і доступних продуктів харчування в нашому суспільстві — це молоко коров'яче. Аналіз даних публікацій останніх років пока-



зує, що цей продукт є одним із найперших у розвитку харчової алергії. Частота виникнення алергії до молока коров'ячого коливається і становить 0,5–7,5 % у дітей різного віку [1; 2]. Клінічні прояви різноманітні та можуть бути представлені у вигляді atopічного дерматиту, коліту, гастроезофагального рефлюксу та ін. [1]. В основі даних реакцій, насамперед, лежать патологічні імунно-алергічні механізми, що реалізуються за допомогою специфічних IgE і IgG. Проте, незважаючи на чисельність робіт, присвячених вивченню алергії на даний продукт, праці, що поглиблено досліджують вікові особливості цих реакцій у дітей, є лише в обмеженій кількості, як і ті, що одночасно описують частоту сенсibilізації до загального комплексу алергенів коров'ячого молока і до казеїну (головного термостабільного протеїну молока коров'ячого) [3; 4].

**Метою** цієї роботи є дослідження частоти сенсibilізації до комплексу алергенів коров'ячого молока та казеїну залежно від віку, встановленої за допомогою перших вітчизняних імунферментних тест-систем для визначення специфічних IgE-антитіл.

#### Матеріали та методи дослідження

Нами досліджено сироватки крові 78 дітей віком від 5 міс. до 15 років, що звернулися на прийом до центру клінічної імунології та алергології при Донецькому національному медичному університеті ім. М. Горького, які страждають на алергічний дерматит.

Слід наголосити що визначення рівнів загального імунoglobуліну E і специфічних IgE до комплексу алергенів коров'ячого молока і молекул казеїну в сироватці крові пацієнтів здійснювалося за допомогою перших вітчизняних імунферментних тест-систем четвертого покоління ТОВ «Укрмед-Дон»

(Донецьк). До безсумнівних переваг цих систем належать можливість індивідуального підбору досліджуваних алергенів у кожного конкретного хворого, широкий діапазон вимірів від 0 до 100 МО/мл, висока чутливість, що сягає 0,1 МО/мл, та коефіцієнт варіації не більше 5 %. Важливо відмітити, що дані тест-системи за своїми технічними характеристиками відповідають усім європейським вимогам до подібних систем. Детальна характеристика використаних імунферментних тест-систем наведена в табл. 1.

Досліджували вікову частоту зустрічальності різних рівнів вищевказаних специфічних IgE ( $M \pm m$  визначалися за допомогою програми Biostat, достовірності відмінностей розраховували за допомогою критерію  $\chi^2$  та кутового перетворення Фішера з поправкою Йетса).

Також було розраховано коефіцієнти кореляції (метод Кендалла) між значеннями загального IgE і специфічними IgE до молока коров'ячого, загальним IgE і специфічним IgE до казеїну, рівнями специфічного IgE до молока коров'ячого та специфічних IgE-антитіл до казеїну.

#### Результати дослідження та їх обговорення

Оскільки молоко коров'яче є полікомпонентним продуктом,

нині все більше авторів приділяють увагу виявленню алергії не тільки до комплексу алергенів незбираного молока, а й дослідженню сенсibilізації до окремих його фракцій. У нашому дослідженні вивчення рівнів специфічних антитіл класу E до молока коров'ячого і до казеїну молока серед 78 дітей з алергічним дерматитом продемонструвало наявність діагностично значущих рівнів даних антитіл у 18 пацієнтів в обох випадках. Відповідно цьому кількість сенсibilізованих осіб до загального комплексу алергенів молока та до казеїну становила (23,1±4,8)%.

Згідно з даними вікового розподілу рівнів специфічних IgE до молока коров'ячого і казеїну, динаміка їх концентрації залежно від віку була практично ідентичною (табл. 2 і 3).

Аналіз зустрічальності рівнів сенсibilізації серед різних вікових груп до комплексу алергенів молока коров'ячого дав змогу виявити достовірні відмінності між даними показниками у групах дітей віком до та після 10 років ( $p=0,006$ ) та у групах від 2 до 5 років і після 10 років ( $p<0,05$ ). Цікаво відзначити, що аналогічне дослідження, присвячене сенсibilізації до казеїну, продемонструвало наявність достовірних відмінностей лише між показниками у дітей до та після 10 років ( $p=0,006$ ). При цьому слід відмітити, що у дітей піс-

Таблиця 1

#### Характеристика імунферментного аналізу тест-системи виробництва ТОВ «Укрмед-Дон» для визначення вмісту специфічного IgE до алергенів молока коров'ячого та казеїну

| Параметри                                     | Характеристика    |
|---|-------------------|
| Принцип методу                                | Твердофазний, ІФА |
| Загальний час аналізу, год                    | 3,5               |
| Діапазон вимірів, МО/мл                       | 0–100             |
| Оптична щільність діапазону                   | 0,04–3,50         |
| Чутливість, МО/мл                             | 0,1               |
| Коефіцієнт варіації, %                        | не більше 5       |
| Об'єм сироватки для дослідження у дублях, мкл | 100               |



## Частота виявлення IgE-антитіл до молока коров'ячого у дітей різних вікових груп

| Група          | Питома вага дітей з різними рівнями IgE-антитіл, M±m |             |                |            |                 |            |                |          |                        |             |
|----------------|--|-------------|----------------|------------|-----------------|------------|----------------|----------|------------------------|-------------|
|                | Відсутність  |             | Низький рівень |            | Середній рівень |            | Високий рівень |          | Усього сенсibilізовано |             |
|                | n  | %           | n              | %          | n               | %          | n              | %        | n                      | %           |
| До 2 років     | 11   | 73,3±11,4   | 3              | 20,0±10,3  | 1               | 6,7±6,5    | 0              | 0,0      | 4                      | 26,7±11,4   |
| 2–5 років      | 12   | 57,1±10,8** | 5              | 23,8±9,3** | 3               | 14,3±7,6** | 1              | 4,8±4,7  | 9                      | 42,9±10,8** |
| 5–10 років     | 8  | 72,7±13,4   | 0              | 0,0        | 3               | 27,3±13,4  | 0              | 0,0      | 3                      | 27,3±13,4   |
| До 10 років    | 31   | 66,0±6,9*   | 8              | 17,0±5,5*  | 7               | 14,9±5,2   | 1              | 2,1±2,1* | 16                     | 34,0±6,9*   |
| Після 10 років | 29   | 93,6±4,4    | 1              | 3,2±3,2    | 1               | 3,2±3,2    | 0              | 0,0      | 2                      | 6,4±4,4***  |
| Разом          | 60   | 76,9±4,8    | 9              | 11,5±3,6   | 8               | 10,3±3,4   | 1              | 1,3±1,3  | 18                     | 23,1±4,8    |

Примітка. \* — достовірно ( $p=0,006$ ) відрізняється від показників у групі після 10 років; \*\* — достовірно ( $p<0,05$ ) відрізняється від показників у групі після 10 років; \*\*\* — достовірно ( $p<0,04$ ) нижче, ніж серед усіх обстежених.

## Частота виявлення IgE-антитіл до казеїну у дітей різних вікових груп

| Група          | Питома вага дітей з різними рівнями IgE-антитіл, M±m |           |                |           |                 |           |                |          |                        |           |
|----------------|--|-----------|----------------|-----------|-----------------|-----------|----------------|----------|------------------------|-----------|
|                | Відсутність  |           | Низький рівень |           | Середній рівень |           | Високий рівень |          | Усього сенсibilізовано |           |
|                | n  | %         | n              | %         | n               | %         | n              | %        | n                      | %         |
| До 2 років     | 11   | 73,4±11,4 | 2              | 13,3±8,8  | 2               | 13,3±8,8  | 0              | 0,0      | 4                      | 26,6±11,4 |
| 2–5 років      | 13   | 61,9±10,6 | 5              | 23,8±9,3  | 3               | 14,3±7,6  | 0              | 0,0      | 8                      | 28,1±10,6 |
| 5–10 років     | 7  | 63,6±14,5 | 2              | 18,2±11,6 | 1               | 9,1±8,7   | 1              | 9,1±8,7  | 4                      | 36,4±14,5 |
| До 10 років    | 31   | 66,0±6,9* | 9              | 19,1±5,7* | 6               | 12,8±4,9* | 1              | 2,1±2,1* | 16                     | 34,0±6,9* |
| Після 10 років | 29   | 93,8±4,3  | 1              | 3,1±3,1   | 1               | 3,1±3,1   | 0              | 0,0      | 2                      | 6,2±4,3** |
| Разом          | 60   | 76,9±4,8  | 10             | 12,8±3,9  | 7               | 9,0±3,2   | 1              | 1,3±1,2  | 18                     | 23,1±4,8  |

Примітка. \* — достовірно ( $p=0,006$ ) відрізняється від показників у групі після 10 років; \*\* — достовірно ( $p<0,04$ ) нижче, ніж серед усіх обстежених.

ля 10 років сенсibilізація реєструвалася значно рідше ( $p<0,04$ ) як до комплексу алергенів молока — у (6,4±4,2) %, так і окремо до казеїну — у (6,2±4,3) % порівняно з аналогічним показником у всіх обстежених осіб — (23,1±4,8) %. Також важливо наголосити, що у даній віковій категорії реєструвалися лише низькі та середні рівні сенсibilізації. Отриманні результати підтверджують дані літератури щодо зменшення частоти виявлення алергії до досліджуваного нами харчового продукту та його антигенів з віком [5].

Розрахунок коефіцієнтів кореляції при  $p<0,05$  дозволив визначити наявність достовірної прямої слабкої кореляційної залежності між значеннями загального IgE і рівнями IgE-

антитіл до молока коров'ячого ( $\tau = 0,224$ ). Також було визначено наявність достовірної прямої слабкої кореляційної залежності між значеннями загального IgE і рівнями IgE-антитіл до казеїну ( $\tau = 0,178$ ). Особливо слід відзначити наявність сильної прямої кореляційної залежності між рівнями IgE-антитіл до молока коров'ячого та казеїну ( $\tau = 0,763$ ). Отримані дані кореляційного аналізу незаперечно підтверджують важливу роль цієї фракції в патогенезі розвитку алергії до молока. Недарма деякі автори приділяють особливу увагу визначенню рівнів специфічних IgE саме до молекул казеїну як до одних з головних термостабільних алергізуючих факторів [6; 7]. Згідно з даними останніх років, казеїн є од-

ним з основних алергенів, що зумовлює розвиток IgE-залежної алергії до молока у дітей [5–7].

Крім казеїну, до головних алергенів молока коров'ячого також належать сироваткові протеїни альфа-лактоглобулін, бета-лактоглобулін і коров'ячий сироватковий альбумін [8; 9]. Потребує вивчення роль цих фракцій у розвитку алергічних реакцій на досліджуваний харчовий продукт. Сьогодні вже відомо, що казеїн складається з різних протеїнів з кількома послідовностями: альфа (під-розділяється на дві фракції альфа s1 і альфа s2), бета, каппа- і гамма-казеїнів. Аналіз амінокислотних послідовностей чотирьох фракцій казеїнів у різних видів жуйних тварин продемонстрував високу їх го-



мологічність, що варіює від 80 до 90 % і вище. Така ідентичність, у свою чергу, зумовлює розвиток перехресних алергічних реакцій між казеїном молока у різних ссавців [6]. Отже, подальші наукові розробки у даному напрямі відкривають нові перспективи у розвитку діагностики та лікування алергічних реакцій, зумовлених дією алергенів коров'ячого молока, а також виявленні алергенів, що характеризуються перехресною з ними алергічною активністю, зумовленою, насамперед, наявністю казеїну.

### Висновки

1. Виявлена сенсibilізація різного ступеня до комплексу алергенів коров'ячого молока і молекул казеїну у дітей з алергічним дерматитом з частотою (23,1±4,8) %.

2. Встановлено пряму сильну достовірну кореляційну залежність ( $\tau = 0,763$ ;  $p < 0,05$ ) між рівнями специфічних IgE-антитіл до молока коров'ячого та казеїну, а також наявність достовірних прямих слабких кореляційних залежностей між показниками загального IgE і рівнями IgE-антитіл до молока коров'ячого ( $\tau = 0,224$ ;  $p < 0,05$ ) і загального IgE та рівнями IgE-антитіл до казеїну ( $\tau = 0,178$ ;  $p < 0,05$ ).

3. Виявлено достовірні відмінності щодо зустрічальності різних рівнів сенсibilізації до комплексу алергенів молока коров'ячого у групах дітей до та після 10 років ( $p = 0,006$ ) і від 2 до 5 років та після 10 років ( $p < 0,05$ ), а також достовірні відмінності щодо зустрічальності різних рівнів сенсibilізації до казеїну у групах до та після 10 років ( $p = 0,006$ ).

4. Відзначено достовірне ( $p < 0,04$ ) зниження частоти сенсibilізації до молока коров'ячого та до казеїну молока у дітей після 10 років порівняно з аналогічним показником у всіх обстежених осіб.

5. Отримані дані можна використовувати у практичній ме-

дицині та в науково-дослідницькій діяльності. Результати дослідження демонструють доцільність і перспективність використання для діагностики специфічної сенсibilізації до молока коров'ячого та казеїну перших вітчизняних тест-систем четвертого покоління.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Denis M. Cow's milk protein allergy through human milk / M. Denis, I. Loras-Duclaux, A. Lachaux // *Arch Pediatr*. – 2012. – Vol. 19. – P. 305–312.

2. Contribution of IgE and immunoglobulin free light chain in the allergic reaction to cow's milk proteins / B. Schouten, B. C. van Esch, A. O. van Thuijl [et al.] // *Allergy Clin Immunol*. – 2010. – Vol. 125. – P. 1308–1314.

3. Maintenance of tolerance to cow's milk in atopic individuals is characterized by high levels of specific immunoglobulin G4 / B. Ruiters, E. F. Knol, R. J. van Neerven [et al.] // *Clin Exp Allergy*. – 2007. – Vol. 37. – P. 1103–1110.

4. The usefulness of casein-specific IgE and IgG4 antibodies in cow's milk allergic children / K. Ito, M. Futamura, R. Movérare [et al.] // *Clin Mol Allergy*. – 2012. – Vol. 10. – P. 1.

5. Cow's milk allergy in adults is rare but severe: both casein and whey proteins are involved / H. Y. Lam, E. van Hoffen, A. Michelsen [et al.] // *Clin Exp Allergy*. – 2008. – Vol. 38. – P. 995–1002.

6. Selective allergy to sheep's and goat's milk proteins / T. Munoz Martin, B. de la Hoz Caballer, F. Marañón Lizana [et al.] // *Allergol et Immunopathol*. – 2004. – Vol. 32. – P. 39–42.

7. Is it just lactose intolerance? / C. E. Olivier, S. L. Lorena, C. R. Pavan [et al.] // *Allergy Asthma Proc*. – 2012. – Vol. 33. – P. 432–436.

8. Cow's milk proteins in human milk / A. Coscia, S. Orrù, P. Di Nicola [et al.] // *J Biol Regul Homeost Agents*. – 2012. – Vol. 26. – P. 39–42.

9. Analysis of  $\alpha$ -lactalbumin-,  $\beta$ -lactoglobulin-, and casein-specific IgE among children with atopic diseases in a tertiary medical center of northern Taiwan / F. M. Chen, J. H. Lee, Y. H. Yang [et al.] // *J Microbiol Immunol Infect*. – 2012. – Vol. 12. – P. 170–173.

### REFERENCES

1. Denis M., Loras-Duclaux I., Lachaux A. Cow's milk protein allergy through human milk. *Arch Pediatr* 2012; 19 (3): 305-312.

2. Schouten B., van Esch B.C., van Thuijl A.O., Blokhuis B.R., Groot Kormelink T., Hofman G.A., Moro G.E., Boehm G., Arslanoglu S., Sprickelman A.B., Willemsen L.E., Knippels L.M., Redegeld F.A., Garssen J. Contribution of IgE and immunoglobulin free light chain in the allergic reaction to cow's milk proteins. *Allergy Clin Immunol* 2010; 125 (6): 1308-1314.

3. Ruiters B., Knol E.F., van Neerven R.J., Garssen J., Brujnzeel-Koomen C.A., Knulst A.C., van Hoffen E. Maintenance of tolerance to cow's milk in atopic individuals is characterized by high levels of specific immunoglobulin G4. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 1103-1110.

4. Ito K., Futamura M., Moverare R., Tanaka A., Kawabe T., Sakamoto T., Borres M. P. The usefulness of casein-specific IgE and IgG4 antibodies in cow's milk allergic children. *Clin Mol Allergy* 2012; 10: 1.

5. Lam H.Y., van Hoffen E., Michelsen A., Guikers K., van der Tas C.H., Brujnzeel-Koomen C.A., Knulst A.C. Cow's milk allergy in adults is rare but severe: both casein and whey proteins are involved. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 995-1002.

6. Munoz Martin T., de la Hoz Caballer B., Marañón Lizana F., Gonzalez Mendiola R., Prieto Montano P., Sanchez Cano M. Selective allergy to sheep's and goat's milk proteins. *Allergol et Immunopathol* 2004; 32: 39-42.

7. Olivier C.E., Lorena S.L., Pavan C.R., dos Santos R.A., dos Santos Lima R.P., Pinto D.G., da Silva M.D., de Lima Zollner R. Is it just lactose intolerance? *Allergy Asthma Proc* 2012; 33: 432-436.

8. Coscia A., Orrù S., Di Nicola P., Giuliani F., Rovelli I., Peila C., Martano C., Chiale F., Bertino E. Cow's milk proteins in human milk. *J Biol Regul Homeost Agents* 2012; 26 (1): 39-42.

9. Chen F.M., Lee J.H., Yang Y.H., Lin Y.T., Wang L.C., Yu H.H., Chiang B.L. Analysis of  $\alpha$ -lactalbumin-,  $\beta$ -lactoglobulin-, and casein-specific IgE among children with atopic diseases in a tertiary medical center of northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2012; 12: 170-173.

Надійшла 30.05.2013

