

Е.И. Кондратьева<sup>1</sup>, Д.Э. Хапачева<sup>1, 2</sup>, А.И. Тлиф<sup>1, 2</sup>, Л.А. Подпорина<sup>3</sup>, С.В. Сторожук<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Российская Федерация

<sup>2</sup> Детская краевая клиническая больница Министерства здравоохранения Краснодарского края, Российская Федерация

<sup>3</sup> Детская поликлиника № 3 Управления здравоохранения муниципального образования, Краснодар, Российская Федерация

## Иммуногенные факторы грудного молока при его длительном хранении в условиях низких температур

### Contacts:

*Khachapayeva Darina Eduardovna*, full-time postgraduate student, Chair of Pediatrics with Chair of Neonatology, Faculty of Postgraduate Education and Professional Preparation of Doctors, State Budget Educational Institution of high Professional Education Kuban State Medical University, Ministry of Health, Russian Federation

**Address:** 350063, Krasnodar, Sedina str. 4. **Tel.:** (861) 262-73-75; **e-mail:** darina\_hapacheva@mail.ru

**Article received:** 17.12.2012, **Accepted for publication:** 01.02.2013

В статье представлены сведения о влиянии длительного воздействия низких температур ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) на иммуногенные факторы грудного молока. Анализируются полученные в работе новые данные о стабильности уровня секреторного иммуноглобулина А в грудном молоке под воздействием низких температур. Изучено влияние низких температур на содержание отдельных цитокинов (фактора некроза опухолей  $\alpha$ , интерлейкинов 8, 10, 18) в грудном молоке при хранении в холодильнике в течение 3 и 6 мес. Впервые определено содержание интерлейкинов 8 и 18 в грудном молоке. Установлен факт снижения содержания фактора некроза опухолей  $\alpha$  при длительном хранении. Полученные результаты свидетельствуют о сохранении защитных факторов грудного молока при низких температурах в домашних условиях, что позволяет рекомендовать дальнейшее развитие технологий хранения грудного молока в домашних условиях и открывает перспективы для развития банков грудного молока.

**Ключевые слова:** банк грудного молока, низкие температурные режимы, цитокины, иммуноглобулин.

(Вопросы современной педиатрии. 2013; 12 (1): 172–176)

### ВВЕДЕНИЕ

Донорство грудного молока имеет долгую историю. До XXI в. женщина, кормящая грудным молоком не собственного ребенка, называлась кормилицей. Всемирная организация здравоохранения и ЮНИСЕФ (Международный чрезвычайный детский фонд ООН)

выступили с совместным заявлением в 1980 г.: «В случаях, когда биологическая мать не может кормить ребенка грудью, первым вариантом в организации питания является использование донорского молока, в т. ч. из банков грудного молока». Первой причиной потери интереса к человеческому молоку было активное продвижение

E.I. Kondrat'eva<sup>1</sup>, D.E. Khapacheva<sup>1, 2</sup>, A.I. Tlif<sup>1, 2</sup>, L.A. Podporina<sup>3</sup>, S.V. Storozhuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

<sup>2</sup> Pediatric Territorial Clinical Hospital of the Ministry of Health Care of the Krasnodar Territory, Russian Federation

<sup>3</sup> Pediatric polyclinic № 3 of the Governance of the Health Care of the Municipal Organization, Krasnodar, Russian Federation

## Immunogenic factors of the breast milk during its prolonged storage under low temperatures

The data on the influence of the prolonged low temperatures effect ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) on the immunogenic factors of the breast milk is shown in the article. The received during the study new data on the stability of the secretory immunoglobulin A in the breast milk under the low temperatures are analyzed. The influence of the low temperatures on the breast milk concentration of the certain cytokines (tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukins 8, 10, 18) when storing in the refrigerator for 3 and 6 months was studied. The breast milk concentration of the interleukins 8 and 18 was determined for the first time. The fact of the tumor necrosis factor  $\alpha$  decrease during prolonged storage was established. The received results suggest that protective factors of the breast milk are preserved under low temperatures in domestic conditions, which allows to recommend the further development of breast milk storage techniques in domestic conditions and opens the prospects for the breast milk banks.

**Key words:** breast milk bank, low temperature regimens, cytokines, immunoglobulin.

(Voprosy sovremennoi pediatrii — Current Pediatrics. 2013; 12 (1): 172–176)

детского искусственного питания, включая формулы, специально предназначенные для недоношенных детей. Позже появился страх заражения вирусами, включая ВИЧ, и другими инфекциями.

Однако с развитием современных технологий выхаживания недоношенных детей и знаний о защитных факторах грудного молока интерес к банкам хранения молока вернулся. В 1988 г. 72% молока всех банков в США было предписано для новорожденных в отделениях интенсивной терапии, 23% — для детей, проходивших лечение в амбулаторных условиях, и 2% было использовано для педиатрических стационаров. Ассоциация банков человеческого молока Северной Америки (HMBANA) разработала «Основные принципы создания и деятельности банков человеческого молока». Существуют аналогичные руководства в Великобритании. Обе эти страны рекомендуют проводить каждые 2–6 мес серологическое обследование доноров на ВИЧ 1 и 2, Т-лимфотропный вирус человека типов 1 и 2 (HTLV 1 и 2), гепатит В и С, сифилис.

Получили распространение технологии сохранения собственного молока женщин для нужд ребенка на первом году жизни в домашних условиях, т. е. создание банка молока. Домашний банк молока — это сцеженное молоко, которое сохраняется при низких температурах и предназначено для кормления ребенка. Для создания подобного банка необходимы молокоотсос (предпочтительно электрический) и пакеты/контейнеры для сбора молока. Выбор молокоотсосов в современных условиях достаточно обширен, но эталонными признаны молокоотсосы швейцарской компании «Medela» [1]. По данным опроса, проведенного авторами статьи, из 256 кормящих женщин разных регионов страны (Томск, Краснодар; 2012) только 4% используют возможность хранения собственного молока при низких температурах в домашних условиях. С развитием производственной сферы, обслуживающей кормящую женщину и ее ребенка, а также работающую молодую мать, появились предметы для сбора и хранения (пакеты для сбора и хранения молока «Pump&Save»), размораживания молока (подогреватель «B-Well») и стерилизации (паровой стерилизатор «B-Well», компания «Medela») в домашних условиях.

Создание банков грудного молока и возможность самостоятельного хранения при низких температурах диктуют необходимость изучения влияния низких температур на содержание защитных факторов в молоке.

Известно, что наряду с уникальным и динамичным составом пищевых веществ грудное молоко содержит широкий спектр биологически активных и защитных факторов [2]. После рождения ребенка иммуномодулирующие факторы грудного молока в сочетании с воздействием патогенов окружающей среды обеспечивают развитие его иммунной системы и формирование механизмов активного и пассивного иммунитета [3, 4].

Механизм, лежащий в основе действия иммуногенных компонентов грудного молока, определяется многими факторами. Известно, по крайней мере, о двух различных и частично перекрывающихся процессах. Во-первых, иммуногенные факторы грудного молока участвуют в формировании состава микробиоты новорож-

денных, косвенно влияя на развитие иммунной системы. Во-вторых, грудное молоко непосредственно «заставляет» иммунную систему реагировать соответствующими механизмами врожденного или адаптивного иммунного ответа на антигенные воздействия.

Особенно богато защитными факторами молозиво и грудное молоко 1-го мес лактации. В настоящее время появились свидетельства того, что защитный эффект грудного молока выходит за рамки неонатального периода и может влиять на развитие заболеваний в более старшем возрасте [5–7]. В последние годы интерес исследователей связан с изучением роли цитокинов грудного молока в формировании здоровья детей. Цитокины осуществляют взаимосвязь между компонентами врожденного специфического иммунитета [8]. Установлено, что цитокины участвуют в процессах межклеточных взаимодействий в иммунной и кроветворной системе организма, модулируют функциональную активность нервной и эндокринной системы [9, 10]. В молоке, как правило, присутствуют и воспалительные, и противовоспалительные цитокины. Предполагают, что противовоспалительные цитокины и другие факторы защищают организм ребенка [11, 12], а воспалительные цитокины, например, интерлейкин 8, могут быть более важны для защиты молочной железы от инфекции [13]. Были продемонстрированы различия в содержании цитокинов в молоке женщин с разным состоянием здоровья [4].

**Цель исследования:** изучить влияние длительного воздействия низких температур ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) на иммуногенные факторы грудного молока при длительном хранении в холодильнике.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Участники исследования

В качестве образцов было взято молоко 33 кормящих матерей в срок лактации 1 мес. Молоко хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 6 мес. Содержание цитокинов и секреторного иммуноглобулина А (sIgA) проводили до замораживания, через 3 и 6 мес хранения в холодильнике.

Исследование проводили в 3 этапа. Первый этап заключался в сборе грудного молока у здоровых женщин и исследовании защитных факторов.

### Критерии включения:

- рождение ребенка в срок (38–42-я нед);
- неосложненное течение беременности;
- отсутствие внутриутробных инфекций;
- наличие информированного согласия кормящей матери.

### Критерии исключения:

- рождение ребенка на сроке беременности менее 38 или более 42 нед;
- отсутствие информированного согласия кормящей матери;
- инфекционная патология у детей и матерей.

На 2-м и 3-м этапах был изучен иммуногенный состав грудного молока после замораживания через 3 и 6 мес, соответственно. Сравнительный анализ проводили

на основании оценки иммунологических показателей молока до замораживания и через 3 и 6 мес хранения при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Методы исследования

- Анамнестический (изучение историй болезней, обменных карт, карт развития детей грудного возраста).
- Иммунологический: определение содержания фактора некроза опухолей  $\alpha$  (ФНО  $\alpha$ ), интерлейкина (ИЛ) 1 $\beta$ , ИЛ 8, ИЛ 10, ИЛ 18 и секреторного иммуноглобулина А (sIgA) проводили методом иммуноферментного анализа на анализаторе «ASCENT» (Финляндия) с использованием диагностических тест-систем (моноклональных антител к ФНО  $\alpha$ , ИЛ 1 $\beta$ , 8, 10, 18 и к sIgA) ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск) в отделе клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ГБОУ ВПО КубГМУ МЗ РФ.

#### Статистическая обработка данных

Статистический анализ результатов выполняли на основе методов вариационной статистики с определением медианы (Me) и интерквартильного размаха в программах Microsoft Office Excel 2007 и Statistica 6.0.

Достоверность различий определяли по критерию Вилкоксона для зависимых выборок. Различия между иммунологическими показателями грудного молока до замораживания и в разные сроки хранения считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты сравнения иммуногенных факторов грудного молока исследуемых образцов до и после хранения при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  представлены в табл.

ИЛ 10 относится к противовоспалительным цитокинам. Он вырабатывается Т-хелперами 2-го типа (Th<sub>2</sub>), а также моноцитами и цитотоксическими Т-лимфоцитами

[10]. Путем подавления пролиферации Th<sub>1</sub> ИЛ 10 ингибирует синтез ИЛ 2 и интерферона  $\gamma$  (ИФН  $\gamma$ ), он также является фактором активации В-лимфоцитов. Показано отсутствие изменения содержания ИЛ 10 в течение 6 мес его хранения при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , т.е. цитокин сохраняет свои противовоспалительные свойства на протяжении данного отрезка времени (см. табл.) и может влиять на активность воспалительных процессов, в первую очередь в кишечнике, подавляя их.

ИЛ 18 — один из основных иммунорегуляторных цитокинов, известный как ИФН  $\gamma$ -индуцирующий фактор, — первично был охарактеризован как потенциальный индуктор синтеза ИФН  $\gamma$  Т-клетками и естественными киллерами. Независимо от ИЛ 12 и 18, влияя на секрецию ИФН  $\gamma$ , он быстро активирует клетки моноцитарно-макрофагальной системы, что ведет к активации множества антибактериальных, противовоспалительных и противовирусных ответных реакций. Синтез ИЛ 18 связан со стрессовыми сигналами (нейрогенными или бактериального происхождения), индуцирующими продукцию ИФН  $\gamma$ , что обуславливает его значение как фактора противоинфекционной и противоопухолевой защиты [14]. Динамики содержания данного цитокина при воздействии низких температур в течение 6 мес нами установлено не было.

В отношении провоспалительного ФНО  $\alpha$  было отмечено снижение его содержания в размороженном молоке через 3 и 6 мес хранения (см. табл.): данный факт может оказаться важным, т.к. цитокин вызывает активацию макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов и эндотелиальных клеток, что способствует развитию воспаления в организме.

ИЛ 8 является низкомолекулярным цитокином воспаления. Принадлежит к семейству хемокинов. Продуцируется под воздействием бактериальных эндотоксинов и цитокинов, главным образом ФНО и ИЛ 1. Он

**Таблица.** Характеристика иммунологического состава грудного молока до и после хранения при низких температурах

Наименование	До замораживания (1)	Через 3 мес после замораживания (2)	Через 6 мес после замораживания (3)	$p$
ФНО $\alpha$	$\frac{1,31}{1,10-1,89}$	$\frac{1,09}{1,03-1,20}$	$\frac{1,12}{1,03-1,24}$	$p_{1-2} = 0,037$ $p_{1-3} = 0,037$ $p_{2-3} = 0,139$
sIgA	$\frac{43,97}{34,025-92,13}$	$\frac{57,8}{54,37-62,51}$	$\frac{56,48}{52-66,4}$	$p_{1-2} = 0,878$ $p_{1-3} = 0,878$ $p_{2-3} = 0,799$
ИЛ 8	$\frac{3,32}{3,13-3,60}$	$\frac{3,16}{3,15-3,31}$	$\frac{3,46}{3,26-3,57}$	$p_{1-2} = 0,307$ $p_{1-3} = 0,754$ $p_{2-3} = 0,060$
ИЛ 10	$\frac{7,23}{5,55-9,96}$	$\frac{7,06}{6,55-7,52}$	$\frac{6,81}{6,12-7,86}$	$p_{1-2} = 0,754$ $p_{1-3} = 0,754$ $p_{2-3} = 0,610$
ИЛ 18	$\frac{30,89}{28,80-32,51}$	$\frac{32,09}{27,95-43,05}$	$\frac{33,46}{29,64-40,02}$	$p_{1-2} = 0,117$ $p_{1-3} = 0,096$ $p_{2-3} = 0,110$

*Примечание.*  $p_{1-2}$  — достоверность различий между показателями до и через 3 мес после замораживания;  $p_{1-3}$  — достоверность различий между показателями до и через 6 мес замораживания;  $p_{2-3}$  — достоверность различий между показателями через 3 и 6 мес хранения. Значения представлены в виде медианы и интерквартильного размаха — Me (Q1–QIII). ФНО  $\alpha$  — фактор некроза опухолей альфа, sIgA — секреторный иммуноглобулин А, ИЛ — интерлейкин. Значение  $p$  определяли по критерию Вилкоксона для зависимых выборок;  $p = 0,05$ .

известен как NAP1 (активирующий нейтрофилы пептид 1), NAF (фактор активации нейтрофилов), GCF (хемотактильный фактор гранулоцитов) и NCF (хемотактильный фактор нейтрофилов). Активирует нейтрофилы, в меньшей мере — другие гранулярные лейкоциты, вызывает их хемотаксис в очаг воспаления. Сходный эффект оказывает ИЛ 8 на моноциты. Повышенная концентрация ИЛ 8 ассоциируется с хроническими и острыми воспалительными состояниями. Оценка его содержания в грудном молоке при замораживании и длительном хранении не показала достоверных изменений (см. табл.).

Доминирующим классом иммуноглобулинов в грудном молоке является sIgA (его содержание достигает 80–90%). Концентрация в норме варьирует от 12 (в молозиве) до 1 г/л (в зрелом молоке). Ребенок, находящийся полностью на грудном вскармливании, потребляет примерно 125 мг/кг sIgA в день в возрасте 1 мес и около 75 мг/кг в день к 4 мес [2]. Уникальным свойством sIgA является его устойчивость к действию протеолитических ферментов, обусловленная особой структурой — наличием секреторного компонента. В связи с этим в пищеварительном тракте только этот иммуноглобулин работает на слизистых оболочках, защищая их от проникновения вирусов и бактерий, тогда как другие (минорные иммуноглобулины G и M) разрушаются под действием протеаз. Результаты исследования показали, что содержание sIgA не меняется под влиянием низких температур на протяжении 6 мес хранения (см. табл.).

Известно, что sIgA молока предотвращает прикрепление микробов к клеткам эпителия, которое является первым шагом к началу инфекционного процесса. Лимфоциты из кишечника матери мигрируют в молочные железы, где вырабатывают антитела молока. Это объясняет, почему молоко содержит sIgA к микробам материнской кишечной флоры. Вырабатываемые эпителиальными клетками молочной железы матери муцин и IgA к иммуногенам, презентуемым микрофлорой кишечника матери, создают в кишечнике младенца защитную биопленку от штаммов лакто- и бифидобактерий, которые становятся резидентной микрофлорой в кишечнике ребенка. Напротив, вырабатываемые в организме матери IgA к иммуногенам, презентуемым *Escherichia coli* и другими грамотрицательными микроорганизмами, подавляют их адгезию к слизистой оболочке кишечника младенца [15].

Таким образом, концентрация sIgA остается неизменной при длительном хранении молока и обеспечивает защиту ребенка. Это имеет значение для понимания необходимости сохранения для ребенка молозива и переходного молока, как источника IgA.

Наибольшее количество защитных факторов обнаруживают в первые дни и недели лактации. Многочисленные исследования подтверждают факт, что защитные и иммуномодулирующие факторы грудного молока значительно снижают риск развития у детей инфекций желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей [16]. Появились результаты исследований, доказывающих влияние иммунологических факторов грудного молока на здоровье детей. Так, отмечено, что в грудном молоке матерей, чьи дети страдают тяжелыми формами атопического дерматита, достоверно повышено содержание IgE, а концентрация трансформирующего фактора роста  $\beta$  и его продукция лейкоцитами грудного молока была ниже [17]. В исследовании Е. И. Кондратьевой и соавт. [4] было продемонстрировано увеличение содержания антагониста рецептора ИЛ 1 в молоке женщин с очагами хронической инфекции к 3-му мес лактации, повышение спонтанной секреции ИЛ 10 макрофагами грудного молока на 6-м мес лактации, а после стимуляции липополисахаридным комплексом — ее снижение. Данные изменения косвенно указывали на истощение резервных возможностей клеток и сопровождалось увеличением частоты острых респираторных заболеваний.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании получены новые данные по стабильности уровня sIgA в грудном молоке при длительном (6 мес) воздействии низких температур. Впервые определено содержание ИЛ 8 и 18 в грудном молоке. Воздействие низких температур ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) не изменяет содержания цитокинов (ИЛ 8, 10, 18) в грудном молоке при его хранении в течение 6 мес. Полученные результаты свидетельствуют о сохранении защитных факторов молока при низких температурах в домашних условиях. Это позволяет рекомендовать развитие технологий хранения грудного молока.

Употребление ребенком молока, подвергнутого хранению при низких температурах, не только как питания, но и в качестве иммунологического корректора, является перспективным направлением для повышения уровня здоровья детей.

## REFERENCES

1. Internet site of a company Medela. <http://medela-russia.ru>
2. Ntretienko O.K. Review of new articles and materials on mechanisms of action and a role of probiotics in children (2007–2008). *Pediatrics. Zhurnal imeni G.N. Speranskogo — Pediatrics*. 2009; 87 (2): 130–135.
3. Baranov A.A., Balabolin I.I., Subbotina O.A. Gastrointestinal food allergy in children. *Moscow: Dynasty*. 2002. 38 pp.
4. Kondratyeva Ye.I., Barabash N.A., Protasova N.V., Perevozchikova T.V., Fayt Ye.A., Stankevich S.S. Immunological factors of women's breast milk in lactation dynamics. *Questions of modern dietology*. 2010; 8 (2): 37–42.
5. Yakushenko Ye.V., Lopatnikova Yu.A., Sennikov S.V. Interleukin 18 and its role in immune response. *Medical immunology*. 2005; 7 (4): 355–364.
6. Rudnicka A.R., Owen C.G., Strachan D.P. The effect of breastfeeding on cardiorespiratory risk factors in adult life. *Pediatrics*. 2007; 119: 1107–1115.
7. Vohr B.R., Poindexter B.B., Dusick A.M., McKinley L.T., Higgins R.D., Langer J.C. and Poole W.K. Persistent beneficial effects of breast milk ingested in the neonatal intensive care unit on outcomes of extremely low birth weight infants at 30 months of age. *Pediatrics*. 2007; 120 (4): 953–959.

8. Kozlov V.A. Granulocyte colony-stimulating factor: physiological activity, pathophysiological and therapeutic problems. *Cytokines and inflammation*. 2004; 3 (2): 3–15.
9. Ketlinskiy S.A., Sibirtsev A.S., Vorobyov A.A. Endogenic immunomodulators. *St.-Petersburg*. 1992. 223 pp.
10. Kozhevnikova Ye.N. Nutrition of infants: European quality and modern opportunities. *Questions of practical pediatrics*. 2006; 1 (4): 112–116.
11. Gromova O.A. The role of vitamins and minerals in obstetric practice. Clinical and pharmacological approaches. *Obstetrics and gynecology*. 2005; 6: 49–55.
12. Shakina L.D., Revyakina V.A., Smirnov I.Ye. Pathogenetic aspects of differential diagnostics of lower gastrointestinal tract diseases in infants with food allergy. *Pediatriya. Zhurnal imeni G.N. Speranskogo — Pediatrics*. 2009; 87 (3): 117–121.
13. Yemelyanov T.P. Vitamins and minerals: a full encyclopaedia. *St.-Petersburg*. 2001. 368 pp.
14. Shcheplyagina L.A., Deyneko O.Ya., Legonkova T.I., Vakhlova I.V. Rational nutrition of infants. *Pediatriya. Zhurnal imeni G.N. Speranskogo — Pediatrics*. 2006; 6: 46–52.
15. Timoshina Ye.L. Hormonal-immunological peculiarities of breast milk in mothers of different newborns groups. *Author's abstract of a doctoral thesis. Perm*. 1990.
16. Bottcher M.F., Jenmalm M.C., Bjorksten B. Cytokine, chemokine and secretory IgA levels in human milk in relation to atopic disease and IgA production in infants. *Pediatr. Allergy Immunol*. 2003; 14: 35–41.
17. Vohr B.R., Poindexter B.B., Dusick A.M., McKinley L.T., Wright L.L., Langer J.C., Poole W.K. Beneficial effects of breast milk in the neonatal intensive care unit on the developmental outcome of extremely low birth weight infants at 18 months of age. *Pediatrics*. 2006; 118: 115–123.