

Received: 06.08.2017  
Accepted: 30.01.2018  
Published: 05.05.2018

## Reakcje alergiczne na mleko krowie: patomechanizm, strategie diagnostyczne i terapeutyczne, możliwości indukcji tolerancji pokarmowej

Allergic reactions to cow's milk: pathomechanism,  
diagnostic and therapeutic strategies, possibilities of food  
tolerance induction

Magdalena Wąsik, Katarzyna Nazimek, Krzysztof Bryniarski

Katedra Immunologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

### Streszczenie

Mleko krowie jest jedną z najczęstszych przyczyn występowania reakcji alergicznych u dzieci. W artykule zebrano wiadomości o patomechanizmach, diagnostyce i możliwościach terapeutycznych w tym typie odpowiedzi alergicznej. Reakcja nadwrażliwości na składniki mleka może mieć charakter odpowiedzi humoralnej, komórkowej lub tzw. reakcji pośredniej, w którą są zaangażowane zarówno komórki, jak i przeciwciała IgE. Patomechanizmu opóźnionej reakcji nadwrażliwości na mleko krowie jeszcze dokładnie nie wyjaśniono, jednak prawdopodobnie udział w niej biorą limfocyty Th1 oraz makrofagi. W zależności od mechanizmów odpowiedzialnych za objawy alergii, obserwowane są różne postaci kliniczne nadwrażliwości na mleko krowie. Rutynowa diagnostyka wiąże się najczęściej z oznaczaniem swoistych przeciwciał IgE w surowicy krwi pacjenta, jednak w razie podejrzenia alergii pokarmowej warto przeprowadzić również testy umożliwiające wykluczenie alergii IgE-niezależnej. Szybka, prawidłowa diagnoza pozwala uniknąć poważnych powikłań żołądkowo-jelitowych, których następstwem mogą być problemy rozwojowe dziecka, a także osłabienie nabłonka jelitowego. Nieszczelna bariera jelitowa stwarza ryzyko przedostawania się nowych alergenów pokarmowych do krwiobiegu, gdzie mogą zapoczątkować reakcję immunologiczną. Zalecane postępowanie w przypadku zdiagnozowania alergii polega na całkowitej eliminacji z diety dziecka produktów zawierających składniki mleka krowiego. Obecnie możliwe jest zidentyfikowanie konkretnych białek odpowiedzialnych za reakcję nadwrażliwości, co może być szczególnie istotne, gdy jednym z nich jest albumina surowicy bydlęcej, ponieważ należy wtedy rozważyć usunięcie z diety również wołowiny. Jednocześnie prowadzone są badania nad skutecznością i bezpieczeństwem alternatywnych immunoterapii. Zdecydowana większość dzieci nabywa tolerancję na mleko krowie przed ukończeniem 5 roku życia.

### Słowa kluczowe:

mleko krowie • alergia pokarmowa • diagnostyka • patomechanizm • leczenie • tolerancja immunologiczna

### Summary

Cow's milk is one of the most common causes of allergic reactions in children. Present review summarizes the current knowledge on the pathogenesis, diagnostics and possible therapeutic strategies in this type of allergic immune response. Hypersensitivity reaction to milk com-

ponents can be mediated by humoral or cell mediated response. There are also mixed types of reactions, in which both, cells and IgE antibodies are involved. The pathomechanism of delayed-type hypersensitivity to cow's milk is still not clear, but possibly it involves Th1 lymphocytes and macrophages. Clinical manifestations of allergy to cow's milk may be different, depending on the underlying mechanism. Routine diagnostic methods are based on specific IgE-antibodies detection in patients serum, but, if food allergy is suspected, it's necessary to also conduct other tests for eventual exclusion of non-IgE-mediated allergy. Immediate and accurate diagnosis allows to avoid serious gastro-intestinal complications, which may lead to children developmental disabilities and also weakening of the intestinal epithelium. Other potential food allergens may penetrate through impaired intestinal barrier to bloodstream, where they can induce allergic reaction. Recommended therapeutic strategy consists of elimination of offending food from child diet. Currently, it's possible to identify the specific protein responsible for hypersensitivity reaction. It could be especially important if one of them is bovine serum albumin, because it may be necessary to also exclude beef from diet. Safety and effectiveness of alternative immunotherapies are still being investigated. The majority of children acquire tolerance to cow's milk by the age of 5.

**Keywords:** cow's milk • food allergy • diagnostic • pathomechanism • treatment • immune tolerance

**GICID:** 01.3001.0011.8254  
**DOI:** 10.5604/01.3001.0011.8254  
**Word count:** 7494  
**Tables:** –  
**Figures:** –  
**References:** 80

**Adres autora:** dr hab n med. Krzysztof Bryniarski, Prof. UJ; Katedra Immunologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Czysa 18, 31-121 Kraków; e-mail: mmbrynia@cyf-kr.edu.pl

**Wykaz skrótów:** **AAF** – odżywki aminokwasowe (amino acid formulas); **AEE** – alergiczne eozynofilowe zapalenie przełyku (allergic eosinophilic esophagitis); **ATP** – atopowy test płatkowy (atopy patch test); **CCD** – determinanty węglowodanowe, mogące wchodzić w reakcje krzyżowe (cross-reactive carbohydrate determinants); **DBPCFC** – podwójnie zaślepiona doustna próba prowokacji (double-blind placebo-controlled food challenge); **eHCF** – odżywka z intensywnie hydrolizowaną kazeiną (extensively hydrolyzed casein formula); **eHCF+LGG** – odżywka z intensywnie hydrolizowaną kazeiną i dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus GG* (extensively hydrolyzed casein formula with *Lactobacillus rhamnosus GG*); **FPE** – enteropatia indukowana przez białka pokarmowe (food protein-induced enteropathy); **FPIAP** – alergiczne zapalenie prostnicy i okrężnicy (food protein-induced allergic proctocolitis); **FPIES** – zapalenie jelita grubego indukowane przez białka pokarmowe (food protein-induced enterocolitis syndrome); **EPIT** – immunoterapia przezskórna (epicutaneous immunotherapy); **GATA-3** – główny czynnik regulujący transkrypcję limfocytów Th2 (GATA binding protein 3); **miRNA** – mikroRNA (microRNA); **OFC** – doustna próba prowokacji (oral food challenge); **OIT** – doustna immunoterapia (oral immunotherapy); **SLIT** – immunoterapia podjęzykowa (sublingual immunotherapy); **SPT** – punktowy test skórny (skin prick test); **T-bet** – główny czynnik regulujący transkrypcję limfocytów Th1 (T-box expressed in T cells).

## WSTĘP

Alergia pokarmowa jest definiowana jako zbiór niekorzystnych objawów zdrowotnych powstałych w wyniku swoistej reakcji immunologicznej w odpowiedzi na ekspozycję na dany alergen. Alergeny pokarmowe to swiste składniki pożywienia, najczęściej białka, które mogą zostać rozpoznane przez komórki układu odporności i zapoczątkować reakcję immunologiczną, powodującą wystąpienie charakterystycznych objawów alergii. Nietolerancja pokarmowa to stan o nieimmunologicznym

podłożu, którego patomechanizm może być m.in. związany z zaburzeniami metabolizmu czy reakcją na leczenie farmakologiczne lub toksyny [7, 65].

Mleko krowie oraz produkty mleczne stanowią nieodłączną część podstawowej diety człowieka oraz bogate źródło białka i wapnia dla rosnących dzieci. Niestety, coraz częściej obserwuje się występowanie alergii pokarmowych na mleko i jego składniki. Na podstawie zgromadzonych danych epidemiologicznych, Sicherer i Sampson wnioskuje, że chorobowość alergii pokarmowych wśród

dorosłych wynosić może około 5%, natomiast wśród dzieci około 8% [65]. W europejskim badaniu kwestionariuszowym dotyczącym objawów alergii pokarmowych u dzieci, przeprowadzonym z udziałem ponad 40 tysięcy rodziców, częstość występowania nadwrażliwości na składniki pokarmowe oszacowano na 4,7%. Wśród badanych populacji najniższy wynik odnotowano w Austrii (1,7%), a najwyższy w Finlandii (11,7%). Jako przyczynę objawów alergii najczęściej wskazywano mleko [70]. W zależności od wieku, deklarowana chorobowość nadwrażliwości na mleko krowie wynosi 1-17,5% wśród dzieci w wieku przedszkolnym, 1-13,5% u dzieci wieku 5-16 lat oraz 1-4% u osób dorosłych [18]. Dean i wsp. w badaniu kohortowym oceniali nadwrażliwość na mleko krowie za pomocą punktowego testu skórniego (skin prick test, SPT) u 543 dzieci w wieku 1, 2 i 3 lat. Pozytywny wynik uzyskało 0,37% niemowląt, 0,92% dwulatków oraz 0,55% trzylatków [12]. W wielośrodkowym badaniu kohortowym prowadzonym w Niemczech oceniano częstość występowania alergii na mleko krowie na podstawie poziomu swoistych przeciwciał IgE w surowicy dzieci. Wśród dwulatków chorobowość wynosiła 4% i spadała do < 1% u dziesięcioletków [42]. Warto wskazać, że chorobowość alergii na mleko krowie uzyskana w badaniach kwestionariuszowych, opartych jedynie na opinii pacjenta lub respondenta na temat jego zdrowia własnego lub zdrowia jego dzieci, jest znacznie wyższa od wyników uzyskanych w badaniach diagnostycznych. Związane jest to zapewne z podobieństwem objawów alergii do tych, występujących w innych chorobach, zwłaszcza w nietolerancji pokarmowej, np. na dwucukry (laktoza) obecne w mleku. Natomiast te schorzenia można skutecznie rozróżnić w badaniach laboratoryjnych.

Reakcje nadwrażliwości na mleko krowie podzielono na trzy grupy w zależności od czasu, jaki upływa od narażenia na alergen do wystąpienia objawów. Grupę pierwszą tworzyli pacjenci, u których reakcja alergiczna ma charakter natychmiastowy, zależny od przeciwciał IgE. W ciągu 45 min od spożycia mleka mogą wystąpić wymioty, pokrzywka lub reakcja anafilaksji. W grupie drugiej znaleźli się pacjenci z pośrednim typem reakcji. Objawy pojawiają się od 45 min do 20 godzin od narażenia na alergen. Mogą to być wymioty, biegunki czy objawy skórne. Natomiast w grupie trzeciej objawy nadwrażliwości obserwowano powyżej 20 godzin od spożycia mleka [23]. Tak zwane reakcje opóźnione zazwyczaj nie wiążą się z obecnością swoistych przeciwciał IgE w surowicy, dlatego w ich patomechanizmie podejrzewa się udział reakcji o typie nadwrażliwości opóźnionej mediowanej przez limfocyty T [22].

### **MECHANIZM ODPOWIEDZI ALERGICZNEJ NA MLEKO KROWIE**

Jak wspomniano wyżej, u dużej grupy pacjentów alergii na antygeny mleka krowiego jest mediowana przez reakcję alergiczną typu I, tzw. anafilaktyczną, zależną od obecności swoistych przeciwciał klasy IgE. U osób z tzw. reakcją pośrednią obserwuje się zwykle udział zarówno mechanizmów alergicznej odpowiedzi humoralnej,

jak i komórkowej, podczas gdy alergiczna odpowiedź komórkowa dominuje u alergików, u których objawy reakcji mają charakter opóźniony. Niekiedy u pacjentów występuje jednoczesna aktywacja mechanizmów reakcji natychmiastowej i opóźnionej [72]. O ile odpowiedź alergiczna IgE-zależna jest dobrze poznana, mechanizmy alergicznej odporności komórkowej indukowanej przez antygeny pokarmowe, w tym mleka, nie są jednoznacznie wyjaśnione i dlatego stały się przedmiotem zainteresowań badawczych.

U osób niewykazujących podatności do rozwoju reakcji alergicznych, alergeny, w tym antygeny pokarmowe, są tolerowane w mechanizmach zależnych od dawki immunogenu. Natomiast upośledzenie trawienia białek i funkcji ochronnej bariery śluzówkowej jelit, przełamanie mechanizmów tolerancji lub brak ich nabycia (np. u niemowląt) często powodują aktywację odpowiedzi alergicznej na alergeny pokarmowe [72]. U noworodków i niemowląt proces trawienia nie przebiega tak wydajnie, jak u starszych dzieci lub dorosłych, a bariera śluzówkowa jelit i jej szczelność nie są w pełni wykształcone. Te cechy uważa się za czynniki predysponujące do rozwoju alergii na antygeny pokarmowe, a znacznie częstsze jej występowanie u niemowląt zdaje się potwierdzać ich istotny udział w aktywacji reakcji nadwrażliwości na składniki pokarmu.

W alergii indukowanej antygenami mleka krowiego, u osób z objawami reakcji natychmiastowej, w pełni immunogenne alergeny mleka mogą przedostawać się przez barierę śluzówkową jelit i być pochłaniane przez komórki prezentujące antygen, którymi zazwyczaj są limfocyty B, w tkankach limfatycznych lub we krwi. Po przygotowaniu, determinanty alergenów prezentowane są przez limfocyty B naiwnym limfocytom T, które wówczas podlegają aktywacji i – z udziałem cytokin i sygnałów kostymulacji – różnicują w limfocyty Th2 wydzielające IL-4 oraz IL-13. Te cytokiny zwrótnie aktywują limfocyty B prezentujące alergen do dojrzewania i różnicowania w komórki B pamięci oraz efektorowe komórki plazmatyczne, zdolne do wydajnej syntezy i wydzielania swoistych alergenowo przeciwciał klasy IgE. Swoiste IgE wiążą się z receptorami fragmentu Fc immunoglobulin w błonie komórkowej bazofilów i mastocytów. Wraz z powstaniem komórek B pamięci oraz swoistych przeciwciał IgE kończy się faza uczulenia w odpowiedzi alergicznej. Od tego czasu u pacjenta, mającego ponownie kontakt z tym samym alergenem, mogą wystąpić objawy kliniczne reakcji alergicznej z powodu aktywacji fazy efektorowej. Związanie alergenu przez swoiste IgE opłaszczające bazofile i mastocyty, uwalnia przez te komórki mediatory reakcji zapalnej, przede wszystkim histaminę prowokującą objawy kliniczne.

Długotrwała stymulacja alergenem u osoby uczulonej może także upośledzać funkcję limfocytów T regulatorowych, wywołać przewlekłą aktywację zapalną eozynofików, a niekiedy również neutrofilów i limfocytów Th2,

które prawdopodobnie są odpowiedzialne za indukcję objawów alergicznych u pacjentów z tzw. reakcją pośrednią.

Natomiast aktywacja limfocytów Th1 w mechanizmie nadwrażliwości typu późnego, podobnym do odpowiedzi obserwowanej w celiakii, wydaje się odpowiedzialna za występowanie reakcji opóźnionej na antygeny mleka krowiego. Wydzielane przez swoiste alergenowo limfocyty Th1 cytokiny prozapalne, w tym interferon gamma, stymulują reakcję cytotoksyczną makrofagów, czemu może także towarzyszyć aktywacja limfocytów T CD8+ cytotoksycznych i komórek NK. Jednak dokładny przebieg tych mechanizmów pozostaje nie w pełni wyjaśniony. Wstępne wyniki naszych badań eksperymentalnych w nowo opracowanym modelu nadwrażliwości typu późnego na kazeinę u myszy potwierdziły dominujący udział limfocytów Th1 i makrofagów w indukcji objawów alergicznej reakcji zapalnej [75].

Wśród dzieci z alergią na mleko krowie obserwuje się znaczny wzrost ekspresji IL-4, co świadczy o występowaniu przesunięcia równowagi Th1/Th2 w kierunku limfocytów CD4+ Th2 oraz o roli IL-4 w przełączaniu klas aktywowanych limfocytów B w kierunku IgE [35, 66]. GATA-3 (GATA binding protein 3) jest głównym czynnikiem regulującym transkrypcję limfocytów Th2, podczas gdy dla limfocytów Th1 jest to T-bet (T-box expressed in T cells) [19]. Shierer i wsp. oceniali poziom ekspresji tych czynników *in vitro* w komórkach efektorowych pobranych od dzieci z alergią na mleko krowie i podniesionym poziomem IL-4. Badacze nie zaobserwowali różnic w ekspresji GATA-3 oraz stosunku GATA-3/T-bet w porównaniu ze zdrowymi dziećmi. Wynik ten mógłby wskazywać, iż w zwiększone wytwarzanie IL-4 w alergii na mleko krowie są zaangażowane inne komórki niż limfocyty T. Shierer i wsp. skupili się szczególnie na komórkach CD25+, cząsteczka ta może ulegać konstytutywnej ekspresji również na bazofilach [1, 21] i komórkach NKT [66]. Według Min i wsp. mysie bazofile są zdolne do wytwarzania IL-4 przy jednoczesnym braku wykrywalnej ekspresji GATA-3 [44]. Bazofile mogą być zaangażowane w mechanizm nadwrażliwości niezależnie od limfocytów T oraz mastocytów, pełniąc istotną rolę w zapoczątkowaniu oraz podtrzymywaniu odpowiedzi limfocytów Th2 pamięci [47]. Rola komórek NKT w alergiach pokarmowych wydaje się wątpliwa, chociaż są doniesienia, iż komórki te, odpowiednio stymulowane, mogą nasilać odpowiedź limfocytów Th2 oraz wytwarzanie przeciwciał IgE [31]. Mleko jest jednym z najbogatszych białkowych źródeł sfingomieliny, która może być ligandem aktywującym komórki NKT [28]. W przeciwieństwie do limfocytów T, komórki NKT rozpoznają sfingolipidy prezentowane przez cząsteczkę CD1d za pomocą receptora TCR o łańcuchu niezmiennym V $\alpha$ 24-V $\beta$ 11 [2]. Stymulacja komórek NKT dzieci bez alergii z wykorzystaniem sfingomieliny pochodzącej z mleka, zwiększała proliferację limfocytów Th2 oraz wzrost wytwarzania ich cytokin. U dzieci z alergią na mleko krowie odpowiedź ta była znamienne bardziej nasiloną, co może wskazywać na

potencjalny udział komórek NKT w patogenezie alergii na mleko. W badanej grupie dzieci zaobserwowano również znacznie obniżony odsetek komórek NKT w porównaniu z grupą kontrolną. Jak oceniono za pomocą stymulacji  $\alpha$ -galaktozylceramidem funkcja tych komórek pozostała niezmienną [28].

## DIAGNOSTYKA ALERGIJ NA MLEKO KROWIE

W 2010 r. WAO (World Allergy Organization) opublikowało szczegółowe wytyczne dla diagnostyki alergii na mleko krowie [16]. Za „złoty standard” w badaniach diagnostycznych alergii pokarmowych uznano podwójnie zaślepiąną doustną próbę prowokacji (double-blind placebo-controlled food challenge, DBPCFC). Ze względu na ryzyko wystąpienia silnych reakcji alergicznych u pacjenta, niewiele placówek jest w pełni przystosowanych do przeprowadzenia tego testu. W prawidłowych warunkach badanie odbywa się pod ścisłą kontrolą przeszkolonego personelu, a alergen podawany jest w niewielkiej, wystandaryzowanej dawce [64]. W razie pojawienia się pierwszych objawów reakcji nadwrażliwości test jest przerywany, a pacjentowi udzielana jest pomoc medyczna. DBPCFC jest typem doustnej próby prowokacji (oral food challenge, OFC), w którym pacjentowi podaje się potencjalny alergen lub podobną do niego, immunologicznie obojętną substancję – placebo. Zarówno osoba badana, jak i lekarz nie wiedzą, co zostało podane w teście [24]. Badanie pozwala niemal wyeliminować występowanie fałszywych wyników spowodowanych nadmiernym stresem pacjenta, umożliwia uzyskanie precyzyjnej diagnozy oraz ocenę minimalnej dawki alergenu wywołującej objawy kliniczne. Do wad DBPCFC należy zaliczyć długi czas wykonania, stosunkowo wysoki koszt oraz konieczność stałego nadzoru medycznego z powodu ryzyka wystąpienia reakcji anafilaktycznej. W diagnostyce alergii na mleko krowie konieczne jest wcześniejsze wyeliminowanie go z diety pacjenta [54].

W surowicy krwi żyłnej pacjenta można oznaczać stężenie swoistych antygenowo (alergenowo) przeciwciał klasy IgE, zwykle metodami immunochemicznymi z użyciem odpowiednich przeciwciał monoklonalnych. W celu przeprowadzenia oznaczenia próbka badana zostaje nałożona na podłoże stałe ze związanym wcześniej alergenem. Detekcję przeciwciał surowicznych pacjenta ewentualnie związanych z alergenem w kompleksach immunologicznych umożliwia dodanie znakowanych radioizotopowo lub enzymatycznie przeciwciał drugorzędowych skierowanych przeciwko fragmentowi Fc ludzkich IgE. Tego typu testy charakteryzuje wysoka czułość. Niekiedy wykrywana jest obecność nawet śladowych ilości swoistych alergenowo IgE, które u danej osoby, w związku z jej historią choroby, nie mają znaczenia klinicznego, czyli nie mają związku z występowaniem objawów. Wówczas wyniki uważa się za fałszywie dodatnie. Test ma zastosowanie tylko u pacjentów z alergią na mleko krowie mediowaną przez przeciwciała IgE. W przypadku reakcji niezależnej od IgE konieczne jest wykonanie OFC [3, 24].

Szybką ocenę obecności przeciwciał IgE przeciwko badanemu alergenowi, bez konieczności pobierania krwi od pacjenta, umożliwia punktowy test skórny, SPT. W badaniu wykorzystuje się ekstrakt z mleka krowiego lub jego poszczególne składniki. Wystandaryzowany roztwór alergenu nakłada się na niezmienną skórę przedramienia i wykonuje nakłucie. Następnie ocenia się wielkość zmiany zapalnej w porównaniu z kontrolą negatywną w miejscu podania soli fizjologicznej [24]. Jednak test charakteryzuje się relatywnie niewielką swoistością (około 68%) w porównaniu do innych stosowanych testów diagnostycznych [69]. Dlatego nie powinien być jedynym badaniem przeprowadzonym w celu potwierdzenia diagnozowanej alergii [24].

Przeprowadzenie opisanych wyżej testów diagnostycznych charakteryzuje ryzyko uzyskania wyników fałszywie ujemnych, gdy klinicznie istotne przeciwciała IgE są związane receptorowo na powierzchni bazylofilów. Wówczas przydatnym diagnostycznie jest test aktywacji bazylofilów. Próbkę krwi pacjenta inkubowana jest z badanym alergenem. Następnie w cytometrii przepływowej analizowana jest obecność powierzchniowych markerów aktywacji bazylofilów (cząsteczki CD63 lub CD203c). Ponadto metodami immunoenzymatycznymi lub radioimmunologicznymi można wykrywać obecność oraz stężenie histaminy lub leukotrienu C4 – mediatorów uwalnianych przez opłaszczone przeciwciałami IgE bazylofile po aktywacji. Badanie to pozwala również ocenić ryzyko wystąpienia reakcji anafilaksji przed wykonaniem OFC [33, 62].

U pacjentów z nadwrażliwością typu późnego, z atopowym zapaleniem skóry lub z objawami żołądkowo-jelitowymi niezwiązanymi z obecnością przeciwciał IgE można wykonywać tzw. atopowe testy płatkowe (atopy patch test, ATP) [14]. Wykonuje się je aplikując roztwór alergenu oraz roztwór kontrolny na niezmienną skórę pleców, chroniąc następnie skórę w miejscach podania substancji szczelnym opatrunkiem. Wyniki są oceniane po 48 godzinach i następnie po kolejnych 24–48 godzinach. Metodyka wykonania testu oraz oceny wyników nie została jeszcze wystandaryzowana. Dlatego przy analizie testu ATP zaleca się jednoczesne wykonanie innych badań diagnostycznych [63].

W przypadku niestwierdzenia obecności swoistych alergenów przeciwciał klasy IgE, można również metodą immunoenzymatyczną zmierzyć stężenie swoistych przeciwciał IgG<sub>1-4</sub> oraz IgA. Jednak ich przydatność w diagnostyce alergii lub w określaniu tolerancji immunologicznej na dany alergen nie została jeszcze jednoznacznie potwierdzona [24].

W większości testów diagnostycznych używane są nieoczyszczone roztwory alergenów, w których może potencjalnie brakować składnika immunogennego dla danego pacjenta lub które mogą zawierać zanieczyszczenia w postaci innych immunogennych białek, co może dać błędną diagnozę. Natomiast, dzięki dokład-

nej charakterystyce i identyfikacji istotnych klinicznie składników alergizujących mleka krowiego, możliwe jest wydajne wytwarzanie rekombinowanych alergenów [6]. Roztwory rekombinowanych alergenów wytwarzanych w komórkach bakteryjnych są pozbawione endotoksyn, a także węglowodanów, które mogłyby reagować krzyżowo z przeciwciałami IgE anty-CCD (cross-reactive carbohydrate determinants), prowadząc do otrzymania fałszywie pozytywnego wyniku testu. Uzyskiwane są w ten sposób roztwory alergenów białkowych o bardzo dobrej jakości i znanym stężeniu, a ich zastosowanie w testach diagnostycznych umożliwia identyfikację odpowiedzialnego za wystąpienie alergii składnika mleka, który może być obecny również w innych pokarmach [11, 24].

### BIĄLKOWE SKŁADNIKI MLEKA

Mleko krowie zawiera prawie 30 różnych białek, z czego największą grupę (około 80%) tworzą kazeiny. Ponadto w mleku występują białka serwatkowe (ok. 20%), wśród których największą immunogennością charakteryzują się  $\beta$ -laktoglobulina oraz  $\alpha$ -laktoalbumina [79].

$\alpha$ -Laktoalbumina to białko złożone z 123 aminokwasów, których sekwencja jest w 74% homologiczna do  $\alpha$ -laktoalbuminy ludzkiej. Sekwencja aminokwasowa oraz struktura  $\alpha$ -laktoalbuminy jest analogiczna do lizozymu obecnego w białku jaja kurzego [74].  $\alpha$ -Laktoalbumina ulega denaturacji pod wpływem temperatury (w 60°C), natomiast po oziębieniu następuje jej częściowa renaturacja. W jej cząsteczce znajduje się miejsce wiązania jonów wapnia o wysokim powinowactwie, których usunięcie ze struktury białka zmniejsza jego termostabilność oraz zdolność do renaturacji [79].

$\beta$ -Laktoglobulina składa się z 162 aminokwasów, a jej masa cząsteczkowa wynosi około 18,4 kD. Nie stwierdzono istnienia chemicznego homologu tego białka w mleku kobiecym, jednak może być w nim czasowo obecne, jeśli matka spożywa mleko krowie lub jego przetwory. Proteoliza  $\beta$ -laktoglobuliny w przewodzie pokarmowym postępuje wolno, co zwiększa ryzyko przedostania się jej antygenów przez błonę śluzową jelita i ich interakcji z komórkami układu odporności [74, 79].

Najliczniejszą grupę białek mleka krowiego tworzą kazeiny, białka złożone charakteryzujące się dużą stabilnością podczas obróbki termicznej. Zagotowanie mleka najczęściej nie powoduje denaturacji kazeiny w przeciwieństwie do białek serwatkowych [78]. Również w procesie hydrolizy enzymatycznej, pod wpływem działania alkalazy i papainy, dochodzi jedynie do zmniejszenia, ale nie do całkowitego zniesienia immunogenności kazeiny [80]. Powyższe cechy znacznie utrudniają proces technologiczny w produkcji odpowiednich odżywek zastępczych dla dzieci z alergią pokarmową na tę grupę białek. Pod względem właściwości alergicznych najlepiej poznano dwie frakcje

kazeiny:  $\alpha$ -s<sub>1</sub>-kazeinę i  $\beta$ -kazeinę. Kazeina- $\alpha$ -s<sub>1</sub> jest fosfoproteiną o masie cząsteczkowej około 23 kD. W mleku kobiecym nie stwierdzono obecności chemicznego homologu kazeiny- $\alpha$ -s<sub>1</sub> o podobnej budowie i funkcji, co może być główną przyczyną jej immunogenności u człowieka. Natomiast w mleku kobiecym występuje homolog  $\beta$ -kazeiny – fosfoproteiny o masie cząsteczkowej 24 kD. Cząsteczki białek obu frakcji kazeiny charakteryzuje obecność co najmniej 6 determinant antygenowych [79].

Zgodnie z badaniami populacyjnymi, większość pacjentów z alergią na mleko krowie podlega uczuleniu na kilka różnych białek, a powyżej wymienione należą do najczęstszych alergenów. Jednak występujące w mleku w mniejszych ilościach immunoglobuliny, laktoferyna czy albumina surowicy bydłowej, również są potencjalnymi alergenami. Często u jednego pacjenta stwierdza się jednocześnie nadwrażliwość na antygeny kazeiny,  $\alpha$ -laktoalbuminy oraz  $\beta$ -laktoglobuliny, podczas gdy nadwrażliwość na albuminę surowicy bydłowej może występować niezależnie [73].

## OBJAWY KLINICZNE

Postaci kliniczne alergii na mleko krowie charakteryzuje występowanie objawów skórnych, oddechowych lub żołądkowo-jelitowych. Objawy te mogą mieć charakter IgE-zależnej reakcji natychmiastowej lub reakcji opóźnionej, mediowanej przez komórki. Reakcja anafilaktyczna na mleko krowie rozwija się od kilku min do 2 godzin od kontaktu z antygenem i może doprowadzić do wstrząsu anafilaktycznego, bezpośrednio zagrażającego życiu pacjenta [18]. Wstrząs anafilaktyczny po spożyciu mleka krowiego jest jednym z najczęstszych powodów stosowania epinefryny, dlatego zarówno w Europie, jak i w Stanach Zjednoczonych wprowadzono obowiązek oznaczania na etykietach, czy dany produkt zawiera mleko lub jego składniki [17, 37].

W krótkim czasie po spożyciu alergenu może się pojawić nasilona pokrzywka i obrzęk naczynioruchowy, mogą wystąpić wymioty oraz biegunki. Częstym objawem jest katar, kaszel oraz problemy z oddychaniem, które mogą się pojawić zarówno w następstwie spożycia, jak i samej inhalacji oparów mleka [18, 61]. Przewlekła alergologia oddechowa wywołana przez przeciwciała IgE może również doprowadzić do rozwoju astmy, co jest dodatkowym czynnikiem ryzyka w przypadku wystąpienia reakcji anafilaktycznej [16].

Objawy niezależnej od przeciwciał IgE alergii na mleko krowie wynikają przede wszystkim z upośledzenia funkcji układu pokarmowego. Do zaburzeń z nią związanych należy zapalenie jelita grubego indukowane przez białka pokarmowe (food protein-induced enterocolitis syndrome, FPIES), z klinicznie nieswoistymi, powtarzającymi się objawami, takimi jak wymioty, błądź, osłabienie i zmęczenie. Przewlekły, nieleczone FPIES może zaburzać prawidłowy rozwój dziecka [55].

Nadwrażliwość na mleko krowie może się także objawiać jako alergiczne zapalenie proctocolitis i okrężnicy (food protein-induced allergic proctocolitis, FPIAP). Szacuje się, że FPIAP jest przyczyną prawie 60% przypadków występowania krwi w kale niemowląt w pierwszych 6 miesiącach życia [15]. Innym zespołem związanym z nadwrażliwością na mleko krowie jest enteropatia indukowana przez białka pokarmowe (food protein-induced enteropathy, FPE), która objawia się bezkrwawą biegunką, hipoalbuminemią, zaburzeniami wchłaniania i również może zakłócić prawidłowy rozwój dziecka [55]. Alergia na mleko krowie jest także jedną z najczęstszych przyczyn wystąpienia alergicznego eozynofilowego zapalenia przełyku (allergic eosinophilic esophagitis, AEE), którego objawy są podobne do refluksu żołądkowo-przełykowego, jednak nie ustają w wyniku rutynowego leczenia [30].

W układzie oddechowym alergologia na mleko krowie może się ujawniać w postaci zespołu Heintera – rzadkiej postaci hemosyderozy płucnej. Do jego objawów należy przewlekły kaszel, świszczący oddech, nawracające zapalenie ucha środkowego, anoreksja, biegunki, wymioty i nawracająca gorączka. Objawy ustępują po zastosowaniu diety eliminacyjnej [45]. Zarówno w przypadku nadwrażliwości zależnej jak i niezależnej od przeciwciał IgE obserwuje się atopowe zapalenie skóry indukowane przez spożycie lub kontakt z alergenem [18].

## MOŻLIWOŚCI TERAPEUTYCZNE W NADWRAŻLIWOŚCI NA MLEKO KROWIE

W leczeniu dziecka z nadwrażliwością na mleko krowie stosuje się bezwzględne wykluczenie białka mleka z jego diety, a gdy jest karmione piersią, również z diety matki. Dla dzieci karmionych odżywkami zaleca się specjalne hipoalergiczne formuły [34]. W wielośrodkowym badaniu prowadzonym we Włoszech porównano skuteczność stosowania różnych rodzajów odżywek przez 12 miesięcy. W tym czasie tolerancja na mleko krowie rozwinęła się prawie u 80% dzieci stosujących odżywkę z intensywnie hydrolizowaną kazeiną i dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* GG (extensively hydrolyzed casein formula with *Lactobacillus rhamnosus* GG, eHCF+LGG), około 44% dzieci stosujących odżywkę kazeinową bez bakterii probiotycznych (extensively hydrolyzed casein formula, eHCF) około 33% dzieci stosujących hydrolizowane odżywkę ryżowe, ponad 23% dzieci otrzymujących odżywkę sojową oraz około 18% dzieci stosujących odżywkę aminokwasową (amino acid formulas, AAF) [5]. Bakterie *Lactobacillus rhamnosus* GG mają pozytywny wpływ na zmiany w składzie mikroflory jelitowej, poprawiają strukturę i funkcję błony śluzowej jelit oraz wpływają na lokalną i systemową odpowiedź immunologiczną [4]. Udowodniono także, że peptydoglikany bakterii probiotycznych wykazują silne właściwości immunomodulujące, m.in. w reakcjach alergicznych [48]. Ich korzystny wpływ na przewod pokarmowy może potencjalnie poprawiać efektywność diety dzieci z nadwrażliwością na mleko krowie [4]. Według analizy Guest

i wsp. dieta oparta na odżywkach eHCF+LGG nie tylko przyspiesza tolerancję, ale również pozwala na znaczne obniżenie kosztów leczenia dzieci z alergią na mleko krowie w porównaniu z kosztami związanymi ze spożywaniem konwencjonalnych odżywek eHCF lub AAF. Po 18 miesiącach stosowania każdej z badanych odżywek zaobserwowano również większe prawdopodobieństwo rozwinięcia tolerancji na białko mleka krowiego u dzieci z alergią niezależną od przeciwciał IgE, w porównaniu z dziećmi z nadwrażliwością mediowaną przez przeciwciała IgE [20].

Szacuje się, iż około 20% populacji deklaruje występowanie alergii na jeden ze składników pokarmowych, co nie znajduje następnie potwierdzenia w badaniach diagnostycznych. Niepotrzebnie stosuje się wtedy diety eliminacyjne, co jest szczególnie niepożądanym zjawiskiem u niemowląt, które są bezpodstawnie pozbawiane składników pokarmowych koniecznych do prawidłowego rozwoju [3]. Słuszność stosowania diety eliminacyjnej u matek karmiących piersią jest obecnie dyskutowana. Niewielkie całkowite stężenie przeciwciał IgA oraz niskie stężenie swoistych przeciwciał IgA w mleku matki może wręcz predysponować do rozwoju alergii na mleko krowie u dziecka [26]. W badaniu kohortowym Järvinen i wsp. wykazali, że stężenie przeciwciał IgA swoistych dla kazeiny i  $\beta$ -laktoglobuliny w mleku kobiet stosujących dietę eliminacyjną było znacznie obniżone w porównaniu do kobiet niestosujących diety. Sugeruje się, że wysokie stężenie swoistych przeciwciał IgA w mleku matki odpowiada za uszczelnianie nabłonka jelitowego niemowląt i zapobiega przedostawaniu się białek mleka do krwi, gdzie mogą wywołać reakcję nadwrażliwości [27].

Często w celu zastąpienia mleka krowiego proponowane jest mleko innych ssaków. Badania wykazują, że białka mleka koziego, bawolego czy owczego wykazują wysoką homologię w stosunku do alergenów zawartych w mleku krowim, dlatego nie powinny być stosowane jako substytut. Natomiast, dzięki znacznym różnicom w składzie białkowym, stosowanie mleka pochodzącego od klaczy, wielbłądów czy osłów wydaje się bezpieczniejszym rozwiązaniem [60].

Dzieci z alergią na mleko krowie powinny unikać nie tylko samego mleka, ale też przetworów mlecznych, tj. sera, masła, śmietany, jogurtów i innych [24]. Ponadto, jeśli jednym z alergenów wywołujących reakcję nadwrażliwości jest albumina surowicy bydłowej, należy również zachować ostrożność przy spożywaniu mięsa. Reakcję krzyżową obserwowano w przypadku surowej lub niedogotowanej wołowiny, jagnięciny, wieprzowiny, a także mięsa jelenia [71]; 13-20% dzieci z alergią na mleko krowie jest jednocześnie uczulone na wołowinę [39].

Leczenie doraźne po przypadkowym spożyciu alergenów mleka obejmuje leki przeciwhistaminowe przy łagodnych objawach, np. skórnych czy pokarmowych oraz zastrzyki z epinefryną przy objawach z układu

oddechowego lub reakcji uogólnionego wstrząsu [76]. Inną nieswoistą postacią leczenia może być wykorzystanie monoklonalnych przeciwciał anti-IgE, które mają za zadanie związanie wolnych przeciwciał IgE we krwi pacjenta, ograniczając aktywację bazofilów oraz znacznie podnosząc próg dawki alergenu niezbędnej do wywołania reakcji [56].

Obecnie intensywnym badaniom poddano efektywność oraz bezpieczeństwo zastosowania doustnej immunoterapii (oral immunotherapy, OIT). Polega na przyjmowaniu wzrastających dawek pokarmu zawierającego alergen wywołujący reakcję nadwrażliwości w celu ograniczenia objawów wynikających z naturalnego narażenia. Skutkiem OIT powinno być tzw. odczulenie pacjenta oraz nabycie trwałego braku odpowiedzi na alergen (rozwój mechanizmów tolerancji immunologicznej na alergen) [40]. Ta strategia terapeutyczna wydaje się skuteczna u większości pacjentów z IgE-zależną alergią na mleko krowie, przy czym większą skuteczność można uzyskać, rozpoczynając leczenie we wczesnym wieku. Wciąż brakuje jednak jednoznacznych wyników, które potwierdzałyby osiągnięcie długoterminowej tolerancji [38, 41]. Natomiast podczas przyjmowania pokarmu w trakcie OIT u 91,5% leczonych stwierdzono objawy alergiczne, najczęściej w postaci łagodnego swędzenia ust i warg, pokrzywki lub rumienia, objawów z układu pokarmowego, zapalenia śluzówki nosa oraz łagodnego skurczu krtani i oskrzeli [43, 57]. Mechanizmów tolerancji immunologicznej aktywowanych przez OIT wciąż dokładnie nie wyjaśniono. Opisano dotychczas aktywację swoistych limfocytów T regulatorowych i wzrost miana swoistych tolerogennych przeciwciał IgG<sub>4</sub>. Ponadto sugeruje się możliwość hamowania reakcji mediowanych przez limfocyty Th2 oraz aktywacji mastocytów i bazofili, a także zmniejszenia liczby mediatorów z nich uwalnianych. Do rozpoczęcia OIT kwalifikowani są pacjenci z IgE-zależną alergią na mleko krowie, utrzymującą się powyżej drugiego roku życia, potwierdzoną w teście OFC [40].

Ponadto coraz częściej jest rozważana możliwość zastosowania immunoterapii podjęzykowej (sublingual immunotherapy, SLIT) mlekiem we wzrastających dawkach. Terapia może trwać od kilku tygodni do kilku miesięcy. Wyniki stosowania terapii w alergii pokarmowych wydają się obiecujące, jednak wykorzystanie SLIT pozostaje nadal ograniczone do badań klinicznych [58].

Jednocześnie badana jest skuteczność immunoterapii przezskórnej (epicutaneous immunotherapy, EPIT), która ma na celu odczulanie pacjentów z alergią pokarmową przy mniejszym ryzyku wystąpienia reakcji niepożądanych, niż w terapii doustnych czy podawania zastrzyków. W EPIT wykorzystuje się plastry zawierające odtłuszczone mleko w proszku, naklejane na 48 godzin jeden raz w tygodniu przez okres trwania terapii. Wśród skutków niepożądanych zaobserwowano głównie objawy miejscowe, takie jak świąd, wyprysk czy zaczerwienienie [13, 46].

## TOLERANCJA POKARMOWA

Populacja limfocytów T regulacyjnych, komórki śluzówkowego układu limfatycznego oraz ich interakcje z naturalnym mikrobiomem jelit oraz z bakteriami probiotycznymi są uważane za najważniejsze mediatory rozwoju tolerancji na antygeny pokarmowe [72]. Ponadto, jak wspomniano wcześniej, utrzymanie prawidłowej funkcji bariery błony śluzowej jelit oraz procesu trawienia pokarmu istotnie wspomaga utrzymanie stanu tolerancji pokarmowej. Zaburzenie jednego z tych elementów upośledza mechanizmy tolerancji immunologicznej i predysponuje do aktywacji mechanizmów fazy uczulenia, a następnie fazy efektorowej z wystąpieniem objawów klinicznych alergii. Gdy alergią jest IgE-zależna, mechanizmy immunotolerancji najczęściej obejmują przełączanie klas swoistych alergenowo przeciwciał z IgE na tolerogenne IgG<sub>4</sub>.

U większości dzieci podlegających uczuleniu na składniki mleka krowiego wraz z rozwojem osobniczym obserwowane jest złagodzenie przebiegu alergii, często z eliminacją objawów, co jest związane z nabyciem tolerancji immunologicznej na alergeny mleka. Szansa na uzyskanie związanej z tym remisji alergii u dzieci w pierwszym roku życia wynosi 45-50%, natomiast u dzieci dwuletnich i trzyletnich odpowiednio 60-75% oraz 85-90% [25]. W badaniu kohortowym Wood i wsp. zaobserwowali ustąpienie objawów alergii na mleko krowie u 52,6% dzieci w wieku 5 lat [77]. Skuteczny rozwój tolerancji stwierdzano, gdy u badanego, po spożyciu produktów zawierających niegotowane składniki mleka, nie wystąpiły objawy kliniczne alergii. Możliwości ustąpienia objawów alergii u dzieci w danym wieku szacowano w tym badaniu, analizując następujące parametry: stężenie swoistych przeciwciał IgE, natężenie reakcji zapalnej w teście SPT oraz nasilenie atopowego zapalenia skóry [77]. Skripak i wsp. w badaniu retrospektywnym uwzględnili jedynie dzieci z alergią na mleko krowie mediowaną przez przeciwciała IgE. Przy określeniu tolerancji zwracano uwagę na brak objawów nadwrażliwości po włączeniu do diety produktów mlecznych, a także na stężenie swoistych przeciwciał IgE oraz występowanie objawów reakcji na mleko krowie 12 miesięcy przed badaniem [67]. W tym badaniu odnotowano remisję tylko u 19% dzieci w wieku do 4 lat. U dzieci do lat 8, 12 i 16 objawy ustąpiły kolejno u 42, 64 i 79% badanych. Zaobserwowano, iż dzieci z przewlekłą alergią na mleko krowie charakteryzowały się wyższym stężeniem swoistych przeciwciał IgE w porównaniu z badanymi, u których rozwinęła się tolerancja wcześniej. Różnica ta utrzymywała się u nich do 18 roku życia [67].

Spożywanie mleka w postaci produktów pieczonych może korzystnie wpływać na rozwój tolerancji na mleko krowie. Zgodnie z wynikami badań Kima i wsp. włączenie do diety wyrobów piekarskich zawierających mleko zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju tolerancji szesnastokrotnie. W tym samym badaniu wykazano, że dzieci z alergią na mleko krowie, które od początku tole-

rowały mleko w pieczonych produktach, miały niemal trzydziestokrotnie większą szansę, aby doszło u nich do rozwoju tolerancji immunologicznej [32].

Obecnie do ustalenia, czy dziecko może spożywać produkty pieczone w diecie, stosowany jest kosztowny test OFC, charakteryzujący się znacznym ryzykiem wystąpienia reakcji anafilaksji [10]. U dzieci tolerujących spożywanie mleka w postaci produktów pieczonych zaobserwowano znacznie obniżone stężenie przeciwciał IgE swoistych dla kazeiny oraz  $\beta$ -laktoglobuliny, a także wyższe średnie stężenie swoistych względem kazeiny przeciwciał IgG<sub>4</sub>, w porównaniu z dziećmi unikającymi spożywania mleka w każdej postaci [32]. Według Caubet i wsp. obniżenie stężenia przeciwciał IgE specyficznych dla kazeiny powinno zostać rozważone jako potencjalny marker reaktywności na mleko w produktach pieczonych. W dwóch przytoczonych przez nich badaniach kohortowych, u dzieci z nadwrażliwością na mleko krowie, reagujących wystąpieniem objawów klinicznych po spożyciu produktów pieczonych, stwierdzono znacznie wyższe stężenie swoistych kazeinowo przeciwciał IgE niż u dzieci tolerujących mleko w produktach pieczonych [10].

Możliwość włączenia do diety dziecka produktów piekarskich zawierających mleko jest pozytywnie odbierana przez rodziców. W badaniu prowadzonym przez Lee i wsp., ankietowano rodziców dzieci, które pozytywnie przeszły test prowokacji produktami mlecznymi w postaci pieczonej. Zgodnie z wynikami kwestionariusza, zdecydowana większość rodziców przyznaje, że przeprowadzenie tego testu znacznie zmniejszyło ich niepokój związany z alergią dziecka (82%), a wprowadzenie produktów mlecznych w postaci pieczonej do żywienia dziecka pomogło w utrzymaniu diety (77%) [36].

Populacją komórek odpowiedzialną za hamowanie nadwrażliwości na mleko krowie mogą być limfocyty T regulatorowe CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. Karlsson i wsp. zaobserwowali, że dzieci, u których udało się rozwinąć tolerancję na mleko, miały istotnie wyższy odsetek tych komórek w krwi obwodowej i ich jednojądrzaste komórki krwi wykazywały obniżoną proliferację w odpowiedzi na stymulację antygenem  $\beta$ -laktoglobuliny w porównaniu do dzieci z aktywną alergią. Usunięcie z hodowli komórek jednojądrzastych, izolowanych z krwi dzieci tolerujących mleko, limfocytów CD25<sup>+</sup> spowodowało pięciokrotny wzrost proliferacji w odpowiedzi na antygen  $\beta$ -laktoglobuliny, podczas gdy w grupie dzieci z alergią zaobserwowano dwukrotny wzrost proliferacji komórek. Warto wspomnieć, iż wszyscy pacjenci włączeni do tego badania wykazywali alergię na mleko krowie w mechanizmie IgE-niezależnym [29].

Sletten i wsp. porównali w jaki sposób usunięcie z hodowli komórkowej limfocytów T regulatorowych CD45RA<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> wpłynie na proliferację komórek jednojądrzastych w odpowiedzi na stymulację  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -kazeiną lub  $\beta$ -laktoglobuliną. W grupie pacjentów z alergią na



mleko krowie mediowaną przez przeciwciała IgE zaobserwowano zwiększoną proliferację mononuklearów w odpowiedzi na każde z badanych białek. Nie wykazano natomiast podobnej odpowiedzi w grupie pacjentów z nadwrażliwością na mleko niezależną od przeciwciał [68].

Naszym zdaniem nie opracowano jeszcze modelu badawczego nadwrażliwości na alergeny mleka krowiego mediowanej przez mechanizmy odporności komórkowej. Obecne badania naszego zespołu dotyczą możliwości indukcji alergicznej odpowiedzi komórkowej u myszy laboratoryjnych przez podanie śródskórne rozpuszczalnego antygeny kazeiny. Wstępne wyniki wskazują, że rozpuszczalny antygen kazeiny mleka krowiego, po podaniu śródskórnym, aktywuje reakcję nadwrażliwości typu późnego mediowaną przez limfocyty Th1 CD4+ i makrofagi. Opracowanie tego modelu badawczego umożliwi dogłębne zbadanie mechanizmów odpowiedzi immunologicznej odpowiedzialnych za rozwój IgE-niezależnej alergii na antygeny mleka krowiego, co powinno przyspieszyć badania nad skutecznymi i swoistymi metodami immunoterapii oraz ułatwić zbadanie możliwości nabycia tolerancji na antygeny mleka. Wyniki naszych badań sugerują, że reakcja nadwrażliwości typu późnego na antygen kazeiny może podlegać kontroli przez subpopulację limfocytów T supresyjnych, wydzielających immunoregulacyjną cząsteczkę miRNA-150 transportowaną w egzosomach [8, 9, 51]. W mysim modelu nadwrażliwości kontaktowej na hapteny [8, 9] oraz nadwrażliwości typu późnego indukowanej owoalbuminą [49], stwierdzono, iż egzosomy transportujące miRNA-150 są pochłaniane przez komórki prezentujące

antygen, które następnie hamują aktywację limfocytów T efektorowych [52, 53]. W badaniach nad alergią pokarmową podjęto próby modyfikacji komórek prezentujących antygen, aby promowały rozwój tolerancji immunologicznej [72]. Zatem sugerowana przez nas możliwość indukcji funkcji immunosupresyjnej komórek prezentujących antygen z udziałem egzosomalnego miRNA-150 ma duże znaczenie kliniczne w opracowywaniu strategii aktywacji tolerancji pokarmowej i łagodzeniu reakcji alergicznych u pacjentów [49, 50, 59].

## PODSUMOWANIE

Alergia na mleko krowie jest jedną z najczęstszych i najwcześniejszych występujących alergii pokarmowych u dzieci. Objawy nadwrażliwości są dotkliwie, a w przypadku reakcji niezależnej od przeciwciał IgE pojawiają się znaczące problemy diagnostyczne. Późna diagnoza stwarza ryzyko rozwinięcia się poważnych zespołów żołądkowo-jelitowych, które mogą wywołać nie tylko zaburzenia w rozwoju dziecka, ale również doprowadzić do osłabienia nabłonka jelitowego. Przez nieszczelną barierę jelitową nowe antygeny pokarmowe mogą przedostawać się do krwiobiegu i prowadzić do rozwoju reakcji alergicznej. Obecnie przyjętą metodą leczenia alergii na mleko krowie jest stosowanie diety eliminacyjnej, jednak wciąż prowadzone są badania nad skutecznością i bezpieczeństwem alternatywnych immunoterapii. U większość dzieci rozwija się tolerancja na mleko krowie przed ukończeniem 5 roku życia, choć u pewnego odsetka pacjentów objawy alergii nie ustępują i mogą się utrzymywać przez całe życie.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Agis H., Füreder W., Bankl H.C., Kundi M., Sperr W.R., Willheim M., Boltz-Nitulescu G., Butterfield J.H., Kishi K., Lechner K., Valent P.: Comparative immunophenotypic analysis of human mast cells, blood basophils and monocytes. *Immunology*, 1996; 87: 535-543
- [2] Bendelac A., Savage P.B., Teyton L.: The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007; 25: 297-336
- [3] Benhamou A.H., Schäppi Tempia M.G., Belli D.C., Eigenmann P.A.: An overview of cow's milk allergy in children. *Swiss. Med. Wkly.*, 2009; 139: 300-307
- [4] Berni Canani R., Di Costanzo M., Pezzella V., Cosenza L., Granata V., Terrin G., Nocerino R.: The potential therapeutic efficacy of *Lactobacillus GG* in children with food allergies. *Pharmaceuticals*, 2012; 5: 655-664
- [5] Berni Canani R., Nocerino R., Terrin G., Frediani T., Lucarelli S., Cosenza L., Passariello A., Leone L., Granata V., Di Costanzo M., Pezzella V., Troncone R.: Formula selection for management of children with cow's milk allergy influences the rate of acquisition of tolerance: a prospective multicenter study. *J. Pediatr.*, 2013; 163: 771-777
- [6] Bohle B., Vieths S.: Improving diagnostic tests for food allergy with recombinant allergens. *Methods.*, 2004; 32: 292-299
- [7] Boyce J.A., Assa'ad A., Burks A.W., Jones S.M., Sampson H.A., Wood R.A., Plaut M., Cooper S.F., Fenton M.J., Arshad S.H., Bahna S.L., Beck L.A., Byrd-Bredbenner C., Camargo C.A. Jr., Eichenfield L. i wsp.: Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID-sponsored expert panel report. *Nutr. Res.*, 2011; 31: 61-75
- [8] Bryniarski K., Ptak W., Jayakumar A., Püllmann K., Caplan M.J., Chairoungdua A., Lu J., Adams B.D., Sikora E., Nazimek K., Marquez S., Kleinstein S.H., Sangwung P., Iwakiri Y., Delgado E. i wsp.: Antigen-specific, antibody-coated, exosome-like nanovesicles deliver suppressor T-cell microRNA-150 to effector T cells to inhibit contact sensitivity. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 2013; 132: 170-181
- [9] Bryniarski K., Ptak W., Martin E., Nazimek K., Szczepanik M., Sanak M., Askenase P.W.: Free extracellular miRNA functionally targets cells by transferring exosomes from their companion cells. *PLoS One*, 2015; 10: e0122991
- [10] Caubet J.C., Nowak-Węgrzyn A., Moshier E., Godbold J., Wang J., Sampson H.A.: Utility of casein-specific IgE levels in predicting reactivity to baked milk. *Allergy. Clin. Immunol.*, 2013; 131: 222-224
- [11] Chapman M.D., Smith A.M., Vailes L.D., Arruda L.K., Dhanaraj V., Pomés A.: Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 2000; 106: 409-418
- [12] Dean T., Venter C., Pereira B., Arshad S.H., Grundy J., Clayton C.B., Higgins B.: Patterns of sensitization to food and aeroallergens in the first 3 years of life. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 2007; 120: 1166-1171
- [13] Dupont C., Kalach N., Soulaines P., Legoué-Morillon S., Piloquet H., Benhamou P.H.: Cow's milk epicutaneous immunotherapy in children: a pilot trial of safety, acceptability, and impact on allergic reactivity. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 2010; 125: 1165-1167

- [14] Eigenmann P.A.: The spectrum of cow's milk allergy. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2007; 18: 265-271
- [15] Elizur A., Cohen M., Goldberg M.R., Rajuan N., Cohen A., Leshno M., Katz Y.: Cow's milk associated rectal bleeding: a population based prospective study. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2012; 23: 766-770
- [16] Fiocchi A., Brozek J., Schünemann H., Bahna S.L., von Berg A., Beyer K., Bozzola M., Bradsher J., Compalati E., Ebisawa M., Guzmán M.A., Li H., Heine R.G., Keith P., Lack G. i wsp.: World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2010; 21: 1-125
- [17] Fiocchi A., Martelli A.: Dietary management of food allergy. *Pediatr. Ann.*, 2006; 35: 755-756
- [18] Fiocchi A., Schünemann H.J., Brozek J., Restani P., Beyer K., Troncone R., Martelli A., Terracciano L., Bahna S.L., Rancé F., Ebisawa M., Heine R.G., Assa'ad A., Sampson H., Verduci E. i wsp.: Diagnosis and Rationale for Action Against Cow's Milk Allergy (DRACMA): a summary report. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010; 126: 1119-1128
- [19] Grogan J.L., Locksley R.M.: T helper cell differentiation: on again, off again. *Curr. Opin. Immunol.*, 2002; 14: 366-372
- [20] Guest J.F., Weidlich D., Kaczmarek M., Jarocka-Cyrta E., Kobelska-Dubiel N., Krauze A., Sakowska-Maliszewska I., Zawadzka-Krajewska A.: Relative cost-effectiveness of using an extensively hydrolyzed casein formula containing the probiotic *Lactobacillus rhamnosus GG* in managing infants with cow's milk allergy in Poland. *Clinicoecon. Outcomes Res.*, 2016; 8: 307-316
- [21] Han X., Jorgensen J.L., Brahmandam A., Schlette E., Huh Y.O., Shi Y., Awagu S., Chen W.: Immunophenotypic study of basophils by multiparameter flow cytometry. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2008; 132: 813-819
- [22] Hill D.J., Ball G., Hosking C.S.: Clinical manifestations of cows' milk allergy in childhood. I. Associations with in-vitro cellular immune responses. *Clin. Exp. Allergy*, 1988; 18: 469-479
- [23] Hill D.J., Firer M.A., Shelton M.J., Hosking C.S.: Manifestations of milk allergy in infancy: clinical and immunologic findings. *J. Pediatr.*, 1986; 109: 270-276
- [24] Hochwallner H., Schulmeister U., Swoboda I., Spitzauer S., Valenta R.: Cow's milk allergy: from allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods*, 2014; 66: 22-33
- [25] Høst A.: Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2002; 89: 33-37
- [26] Järvinen K.M., Laine S.T., Järvenpää A.L., Suomalainen H.K.: Does low IgA in human milk predispose the infant to development of cow's milk allergy? *Pediatr. Res.*, 2000; 48: 457-462
- [27] Järvinen K.M., Westfall J.E., Seppo M.S., James A.K., Tsuang A.J., Feustel P.J., Sampson H.A., Berin C.: Role of maternal elimination diets and human milk IgA in the development of cow's milk allergy in the infants. *Clin. Exp. Allergy*, 2014; 44: 69-78
- [28] Jyonouchi S., Abraham V., Orange J.S., Spergel J.M., Gober L., Dudek E., Saltzman R., Nichols K.E., Cianferoni A.: Invariant natural killer T cells from food allergic versus non-allergic children exhibit differential responsiveness to milk-derived sphingomyelin. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011; 128: 102-109
- [29] Karlsson M.R., Rugtveit J., Brandtzaeg P.: Allergen-responsive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J. Exp. Med.*, 2004; 199: 1679-1688
- [30] Kattan J.D., Cocco R.R., Järvinen K.M.: Milk and soy allergy. *Pediatr. Clin. North. Am.*, 2011; 58: 407-426
- [31] Kim J.O., Kim D.H., Chang W.S., Hong C., Park S.H., Kim S., Kang C.Y.: Asthma is induced by intranasal coadministration of allergen and natural killer T-cell ligand in a mouse model. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004; 114: 1332-1338
- [32] Kim J.S., Nowak-Węgrzyn A., Sicherer S.H., Noone S., Moshier E.L., Sampson H.A.: Dietary baked milk accelerates the resolution of cow's milk allergy in children. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011; 128: 125-131
- [33] Kleine-Tebbe J., Erdmann S., Knol E.F., MacGlashan D.W. Jr., Polusen L.K., Gibbs B.F.: Diagnostic tests based on human basophils: potentials, pitfalls and perspectives. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2006; 141: 79-90
- [34] Kneepkens C.M., Meijer Y.: Clinical practice. Diagnosis and treatment of cow's milk allergy. *Eur. J. Pediatr.*, 2009; 168: 891-896
- [35] Lebman D.A., Coffman R.L.: Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *J. Exp. Med.*, 1988; 168: 853-862
- [36] Lee E., Mehr S., Turner P.J., Joshi P., Campbell D.E.: Adherence to extensively heated egg and cow's milk after successful oral food challenge. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2015; 3: 125-127
- [37] Levy Y., Segal N., Garty B., Danon Y.L.: Lessons from the clinical course of IgE mediated cow milk allergy in Israel. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2007; 18: 589-593
- [38] Longo G., Barbi E., Berti I., Meneghetti R., Pittalis A., Ronfani L., Ventura A.: Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008; 121: 343-347
- [39] Martelli A., De Chiara A., Corvo M., Restani P., Fiocchi A.: Beef allergy in children with cow's milk allergy; cow's milk allergy in children with beef allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2002; 89: 38-43
- [40] Martorell A., Alonso E., Echeverría L., Escudero C., García-Rodríguez R., Blasco C., Bone J., Borja-Segade J., Bracamonte T., Claver A., Corzo J.L., De la Hoz B., Del Olmo R., Dominguez O., Fuentes-Aparicio V. i wsp.: Oral immunotherapy for food allergy: a spanish guideline. Egg and Milk Immunotherapy Spanish Guide (ITEMS guide). Part I. Cow milk and egg oral immunotherapy: introduction, methodology, rationale, current state, indications, contraindications, and oral immunotherapy build-up phase. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2017; 27: 225-237
- [41] Martorell-Calatayud C., Muriel Garcia A., Martorell Aragonés A., De La Hoz Caballer B.: Safety and efficacy profile and immunological changes associated with oral immunotherapy for IgE-mediated cow's milk allergy in children: systematic review and meta-analysis. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2014; 24: 298-307
- [42] Matricardi P.M., Bockelbrink A., Beyer K., Keil T., Niggemann B., Grüber C., Wahn U., Lau S.: Primary versus secondary immunoglobulin E sensitization to soy and wheat in the Multi-Centre Allergy Study cohort. *Clin. Exp. Allergy*, 2008; 38: 493-500
- [43] Mikkelsen A., Mehlig K., Borres M.P., Oxelmark L., Björkelund C., Lissner L.: Monitoring the impact of cow's milk allergy on children and their families with the FLIP questionnaire – a six-month follow-up study. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2015; 26: 409-415
- [44] Min B., Prout M., Hu-Li J., Zhu J., Jankovic D., Morgan E.S., Urban J.F. Jr., Dvorak A.M., Finkelman F.D., LeGros G., Paul W.E.: Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J. Exp. Med.* 2004; 200: 507-517
- [45] Moissidis I., Chaidaroon D., Vichyanond P., Bahna S.L.: Milk-induced pulmonary disease in infants (Heiner syndrome). *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2005; 16: 545-552
- [46] Mondoulet L., Dioszeghy V., Thébault C., Benhamou P.H., Dupont C.: Epicutaneous immunotherapy for food allergy as a novel pathway for oral tolerance induction. *Immunotherapy*, 2015; 7: 1293-1305
- [47] Mukai K., Matsuoka K., Taya C., Suzuki H., Yokozeki H., Nishioaka K., Hirokawa K., Etori M., Yamashita M., Kubota T., Minegishi Y., Yonekawa H., Karasuyama H.: Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity*, 2005; 23: 191-202

- [48] Nazimek K., Bryniarski K.: The biological activity of macrophages in health and disease. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2012; 66: 507-520
- [49] Nazimek K., Bryniarski K., Askenase P.W.: Functions of exosomes and microbial extracellular vesicles in allergy and contact and delayed-type hypersensitivity. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2016; 171: 1-26
- [50] Nazimek K., Bryniarski K., Santocki M., Ptak W.: Exosomes as mediators of intercellular communication: clinical implications. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2015; 125: 370-380
- [51] Nazimek K., Filipczak-Bryniarska I., Bryniarski K.: The role of medicaments, exosomes and miRNA molecules in modulation of macrophage immune activity. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2015; 69: 1114-1129
- [52] Nazimek K., Nowak B., Marcinkiewicz J., Ptak M., Ptak W., Bryniarski K.: Enhanced generation of reactive oxygen intermediates by suppressor T cell-derived exosome-treated macrophages. *Folia Med. Cracov.*, 2014; 54: 37-52
- [53] Nazimek K., Ptak W., Nowak B., Ptak M., Askenase P.W., Bryniarski K.: Macrophages play an essential role in antigen-specific immune suppression mediated by T CD8<sup>+</sup> cell-derived exosomes. *Immunology*, 2015; 146: 23-32
- [54] Niggemann B.: When is an oral food challenge positive? *Allergy*, 2010; 65: 2-6
- [55] Nowak-Węgrzyn A., Katz Y., Mehr S.S., Koletzko S.: Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015; 135: 1114-1124
- [56] Nowak-Węgrzyn A., Sampson H.A.: Future therapies for food allergies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011; 127: 558-573
- [57] Nurmatov U., Devereux G., Worth A., Healy L., Sheikh A.: Effectiveness and safety of orally administered immunotherapy for food allergies: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Nutr.*, 2014; 111: 12-22
- [58] Passalacqua G., Canonica G.W., Bagnasco D.: Benefit of SLIT and SCIT for allergic rhinitis and asthma. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2016; 16: 88
- [59] Ptak W., Nazimek K., Askenase P.W., Bryniarski K.: From mysterious supernatant entity to miRNA-150 in antigen-specific exosomes: a history of hapten-specific T suppressor factor. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2015; 63: 345-356
- [60] Restani P., Beretta B., Fiocchi A., Ballabio C., Galli C.L.: Cross-reactivity between mammalian proteins. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2002; 89: 11-15
- [61] Roberts G., Patel N., Levi-Schaffer F., Habibi P., Lack G.: Food allergy as a risk factor for life-threatening asthma in childhood: a case-controlled study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; 112: 168-174
- [62] Rubio A., Vivinus-Nébot M., Bourrier T., Saggio B., Albertini M., Bernard A.: Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy*, 2011; 66: 92-100
- [63] Saarinen K.M., Suomalainen H., Savilahti E.: Diagnostic value of skin-prick and patch tests and serum eosinophil cationic protein and cow's milk-specific IgE in infants with cow's milk allergy. *Clin. Exp. Allergy*, 2001; 31: 423-429
- [64] Sackesen C., Assa'ad A., Baena-Cagnani C., Ebisawa M., Fiocchi A., Heine R.G., Von Berg A., Kalayci O.: Cow's milk allergy as a global challenge. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2011; 11: 243-248
- [65] Sicherer S.H., Sampson H.A.: Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014; 133: 291-307
- [66] Sicherer S.H., Wood R.A., Stablein D., Burks A.W., Liu A.H., Jones S.M., Fleischer D.M., Leung D.Y., Grishin A., Mayer L., Shreffler W., Lindblad R., Sampson H.A.: Immunologic features of infants with milk or egg allergy enrolled in an observational study (Consortium of Food Allergy Research) of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010; 125: 1077-1083
- [67] Skripak J.M., Matsui E.C., Mudd K., Wood R.A.: The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007; 120: 1172-1177
- [68] Sletten G.B., Halvorsen R., Egaas E., Halstensen T.S.: Memory T cell proliferation in cow's milk allergy after CD25<sup>+</sup> regulatory T cell removal suggests a role for casein-specific cellular immunity in IgE-mediated but not in non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2007; 142: 190-198
- [69] Soares-Weiser K., Takwoingi Y., Panesar S.S., Muraro A., Werfel T., Hoffmann-Sommergruber K., Roberts G., Halken S., Poulsen L., van Ree R., Vlieg-Boerstra B.J., Sheikh A., EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group.: The diagnosis of food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 2014; 69: 76-86
- [70] Steinke M., Fiocchi A., Kirchlechner V., Ballmer-Weber B., Brockow K., Hischenhuber C., Dutta M., Ring J., Urbanek R., Terracciano L., Wezel R., REDALL study consortium: Perceived food allergy in children in 10 European nations. A randomised telephone survey. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2007; 143: 290-295
- [71] Vicente-Serrano J., Caballero M.L., Rodríguez-Pérez R., Carrettero P., Pérez R., Blanco J.G., Juste S., Moneo I.: Sensitization to serum albumins in children allergic to cow's milk and epithelia. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2007; 18: 503-507
- [72] Vitaliti G., Cimino C., Coco A., Praticò A.D., Lionetti E.: The immunopathogenesis of cow's milk protein allergy (CMPA). *Ital. J. Pediatr.*, 2012; 38: 35
- [73] Wal J.M.: Cow's milk allergens. *Allergy*, 1998; 53: 1013-1022
- [74] Wal J.M.: Structure and function of milk allergens. *Allergy*, 2001; 56: 35-38
- [75] Wąsik M., Nazimek K., Bryniarski K.: Standardizing the animal model of delayed-type hypersensitivity to casein. *Central Eur. J. Immunol.*, 2017; 42: 35
- [76] Wood R.A.: Food allergen immunotherapy: Current status and prospects for the future. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016; 137: 973-982
- [77] Wood R.A., Sicherer S.H., Vickery B.P., Jones S.M., Liu A.H., Fleischer D.M., Henning A.K., Mayer L., Burks A.W., Grishin A., Stablein D., Sampson H.A.: The natural history of milk allergy in an observational cohort. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013; 131: 805-812
- [78] Wróblewska B., Jędrzychowski L.: Detection and determination of  $\alpha$ -lactoglobulin in milk using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1994; 3: 45-53
- [79] Wróblewska B., Jędrzychowski L.: Wpływ modyfikacji technologicznych na zmianę właściwości immunoreaktywnych białek mleka krowiego. *Alerg. Astma Immun.*, 2003; 8: 157-164
- [80] Wróblewska B., Karamać M.: Hydroliza enzymatyczna jako proces wpływający na zmianę właściwości immunoreaktywnych kazeiny sodu. *Biul. Nauk*, 2003; 22: 77-82

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.