



İnek sütü proteini alerjisi olan çocukların periferik kan mononükleer hücrelerinde inflamatuvar sitokin düzeyleri

Levels of inflammatory cytokines from peripheral blood mononuclear cells of children with cow's milk protein allergy

Maria D'Apolito¹, Angelo Campanozzi¹, Ida Giardino², Massimo Pettoello-Mantovani^{1,3,4}

¹Foggia Üniversitesi, Tıbbi ve Cerrahi Bilimler Anabilim Dalı, Pediatrik Araştırma Merkezi, Foggia, İtalya

²Foggia Üniversitesi, Klinik ve Deneysel Tıp Anabilim Dalı, Foggia, İtalya

³Foggia Üniversitesi, "Casa Sollievo della Sofferenza" Bilim Enstitüsü, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Foggia, İtalya

⁴Avrupa Pediatri Derneği /Ulusal Pediatri Dernekleri ve Toplulukları Birliği (EPA/UNEPSA), Berlin, Almanya

Cite this article as: D'Apolito F, Campanozzi A, Giardino I, Pettoello-Mantovani M. Levels of inflammatory cytokines from peripheral blood mononuclear cells of children with cow's milk protein allergy. Turk Pediatri Ars 2017; 52: 208-12.

Öz

Amaç: Çalışmanın amacı, inek sütü proteini alerjisi olan hastaların inek sütü proteini ile uyarılmış periferik mononükleer hücrelerinin kültürlerinde sitokin düzeylerini incelemektir.

Gereç ve Yöntemler: İnek sütü proteini alerjisi olan 11 çocuk ve alerjisi olmayan 11 kontrol incelendi. Bu çocukların periferik kan mononükleer hücreleri tek başına ve inek sütü α -laktalbumin; β -laktoglobulin; α S 1, α S 2, β ve κ -kazein fraksiyonu karışımları ve tam süttten elde edilen bir inek sütü protein karışımı varlığında kültüre edildi. Kültür süzüntülerinde, sitokinlerin (tümör nekroz faktörü- α , interlökin-10 ve interlökin-12) düzeyleri belirlendi.

Bulgular: İnek sütü proteini alerjisi olan çocukların inek sütü proteini ile uyarılmış periferik kan mononükleer hücre kültürlerinde; tümör nekroz faktörü- α , interlökin-10 ve interlökin-12 düzeyleri, alerjisi olmayan kontrollere göre anlamlı derecede daha yüksekti ($p<0,05$). İnek sütü proteini alerjisi olan çocuklar ve olmayan kontroller arasında uyarılmamış periferik kan mononükleer hücre kültürlerinde sitokin üretimi açısından fark saptanmadı.

Çıkarımlar: Bu ön çalışmanın bulguları, çocukların inek sütü proteini ile uyarılmış periferik kan mononükleer hücre kültürlerinde tümör nekroz faktörü- α , interlökin-10 ve interlökin-12'nin araştırıldığı dizindeki çalışmalar ile uyumludur ve sitokinlerin inek sütü proteini alerjisini öngörmedeki rolü araştırılırken göz önünde bulundurulabilir. Bu nedenle, bu konuyu kapsamlı bir şekilde araştırmak için daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

Anahtar Sözcükler: Besin yüklemeye, immünoglobulin, inek sütü, interlökin, sitokinler, tümör nekroz faktörü

Abstract

Aim: The aim of the study was to investigate the level of cytokines in cultures of cow's milk protein-stimulated peripheral blood mononuclear cells of patients with cow's milk protein allergy.

Material and Methods: Eleven children with cow's milk protein allergy and 11 non-allergic controls were studied. Their peripheral blood mononuclear cells were cultured alone and in the presence of cow's milk α -lactalbumin; β -lactoglobulin; α S 1, α S 2, β , and κ -casein fraction mixtures; and a cow's protein mixture from whole milk. Production of cytokines, tumor necrosis factor- α , interleukin-10, and interleukin-12 were determined in culture supernatants.

Results: In cow's milk protein-stimulated peripheral blood mononuclear cell cultures of children with cow's milk protein allergy, tumor necrosis factor- α , interleukin-10, and interleukin-12 production was significantly higher than in non-allergic controls ($p<0.05$). No difference in cytokine production was found between cultures obtained from unstimulated peripheral blood mononuclear cell cultures of both cow's milk protein allergy and non-allergic controls.

Conclusions: The findings of this preliminary study align with data from the literature suggesting that the investigation of tumor necrosis factor- α , interleukin-10, and interleukin-12 in cow's milk protein-stimulated peripheral blood mononuclear cell cultures of children may be taken in further consideration to explore whether they might have a predictive role for cow's milk protein allergy. Further studies are therefore needed to extensively investigate this issue.

Keywords: Challenge, cow milk, cytokines, immunoglobulin, interleukin, tumor necrosis factor

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Massimo Pettoello-Mantovani E-posta / E-mail: mpm@unifg.it

Geliş Tarihi / Received: 02.10.2017 **Kabul Tarihi / Accepted:** 03.11.2017

©Telif Hakkı 2017 Türk Pediatri Kurumu Derneği - Makale metnine www.turkpediatriarsivi.com web adresinden ulaşılabilir.

©Copyright 2017 by Turkish Pediatric Association - Available online at www.turkpediatriarsivi.com

DOI: 10.5152/TurkPediatriArs.2017.6290

Giriş

İnek sütü proteini alerjisi (İSPA) inek sütü proteinlerine karşı oluşan ve istenmeyen bir bağışıklık sistemi yanıtıdır (1). Özellikle dört kazein fraksiyonu (α S 1, α S 2, β ve κ -kazein) ve iki whey proteini (α -laktalbumin ve β -laktoglobulin) inek sütü içinde bulunan en önemli alerjen proteinler olarak kabul edilir (2). İnek sütü proteini alerjisi ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde 24 ayın altındaki bebeklerde besin alerjisinin en sık görülen şekillerinden birisidir (3) ve bu yaş grubunda yaygınlığın %2-7,5 olduğu hesaplanmıştır (4, 5). Buna karşılık, bebeklerin %5-15'i inek sütü bileşenlerine (İSB) karşı istenmeyen tepkiyi düşündüren belirtiler gösterirler. İnek sütü proteini alerjisi olan çocuklarda eleme diyetlerinin gereksiz yere başlatılmasını önlemek önemlidir (4). Aslında, İSPA için tek etkin tedavi inek sütünden tamamen kaçınmaktır. İnek sütü yerine soya mamaları ya da yoğun olarak hidrolize edilen kazein ve whey mamaları ya da diğer memelilerin sütleri (keçi sütü gibi) (7) gibi besinler konmalıdır (6). Keçi sütü sık olarak kullanılır, ancak bazı çalışmalarda özellikle çocuklarda tolerans ve güvenlik açısından endişeler ortaya çıkmıştır (3, 8, 9).

İnek sütü proteinlerine karşı bağışıklık tepki, immunoglobulin (Ig)-E aracılığı ile ya da IgE-bağımlı olmaksızın gerçekleşebilir (10). Günümüzde, tanıda iki IgE testi kullanılır (Cilt "prick" testi ve inek sütüne karşı serum-spesifik IgE antikör düzeyleri) (1). Ancak, çift-kör, plasebo kontrollü besin yükleme testi, tanıda hala altın standart yöntemdir (11).

İnek sütü proteini alerjisinde bağışıklık sisteminin yanıtındaki ilk adım T-hücre bağımlı bir tepkimedir (12). Bu adımda, periferik kan mononükleer hücrelerinden (PKMH) doğal ve uyarlanabilir immün araçlar ve sitokinler salınır (13, 14) ve inek sütü proteinlerine karşı gecikmiş sindirim sistemi tepkilerinde de bunların önemli bir rol oynadığı kabul edilir (15, 16). Besin alerjisi olan hastalardan elde edilen periferik kan lenfositlerinin, alerjik olmayan kişilere göre daha yüksek bir çoğalma kapasitesi sergiledikleri gösterilmiştir (17). Periferik kan mononükleer hücreleri ile daha önce yapılan çalışmalarda sitokin üretimi ölçülmüştür (18). Özellikle, interlekin (IL)-2'nin, alerjen ile karşılaşmanın bir sonucu olarak uygunsuz IgE sentezini ve alerjik enflamasyonu baskılamada önemli bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (19). Ayrıca, daha güncel çalışmalarda inek sütüne karşı, erken tip ve geç tip istenmeyen tepkileri olan hastalarda, inek sütü alerjisini belirlemek için, inek sütü ile uyarılmış PKMH'nin kültür süzüntülerinde sitokin-

lerin [tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve IL-10 gibi] miktarının ölçülmesinin, tanısal ya da öngörülse bir test olarak kullanılabileceği (2, 20, 21) ve küçük çocuklarda besin alerjen yüklemesi gereksinimini azaltmaya yardımcı olabileceği ileri sürülmüştür (22).

Bu ön çalışmada, İSPA olan çocuklarda inek sütü proteini ile uyarılmış PKMH'nin kültür süzüntülerinde düzenleyici sitokinlerin (TNF- α , IL-10 ve IL-12) düzeylerini araştırdık.

Gereç ve Yöntemler

Çalışma, İtalya'da Foggia Üniversitesi, Pediatri ve Pediatrik Araştırma Merkezi Üniversite Birimi tarafından gerçekleştirildi. İnek sütü proteini alerjisi olan on bir hasta (altı erkek ve beş kız; ortalama yaş: 10,7 ay, aralık: 3-36 ay) ve 11 alerjik olmayan kontrol olgu (altı erkek ve beş kız; ortalama yaş: 10,3 ay, aralık: 4-39 ay) çalışmaya ardışık olarak alındı. İnek sütü proteini alerjisi olan bütün olgularda, İSPA'yı düşündüren sindirim sistemi, cilt ve solunum sistemi belirtileri vardı. Bu olgularda, İSPA tanısı, çift-kör, plasebo kontrollü besin yükleme testi ile koyuldu. Metabolik bozukluk, anatomik bozukluk, çölyak hastalığı ve diğer enteropatiler, pankreatik yetmezlik, besine karşı immün olmayan istenmeyen tepkiler, diğer besin alerjenlerine ya da diğer maddelere karşı alerjik reaksiyonlar, malinensi, enfeksiyon ve sepsis bulunan hastalar çalışmaya alınmadı.

Hasta ve kontrol grubunun ebeveynlerinden çalışmaya katılım için bilgilendirilmiş onam alındı. Çalışma, Uluslararası İyi Klinik Uygulamalar Uyumlaştırma Konferansı'nın koşullarına ve Helsinki Deklarasyonu'nun belirlediği İnsan Denekleri İçeren Tıbbi Araştırma için Etik İlkeleri'ne uygundu ve Foggia Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Çalışmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştı (Prot.no.2-2.06/2010).

İnek sütü proteini ile uyarılmış periferik kan mononükleer hücre kültürlerinde sitokin belirlenmesi

İnek sütü proteini alerjisi olan hastaların ve kontrollerin inek sütü proteini ile uyarılmış PKMH'de, alerjik hastalıkların ana düzenleyicileri olarak bilinen sitokinler olan TNF- α , IL-10 ve IL-12 çalışıldı (23-25). İnek sütü proteini alerjisi olan çocuklardan ve kontrollerden eleme diyeti ve süt ile yükleme testi öncesinde venöz kan örnekleri alındı (26). Ficoll-Hypaque (Sigma) gradyan santrifüj yöntemi kullanılarak, heparinize kan örneklerinden (3-5 mL) PKMH ayrıldı (27). Periferik kan mononükleer hücreleri, glutamin, sodyum pirüvat,

esansiyel olmayan amino asitler, HEPES tampon, penisilin/streptomisin ve %10 FCS (Fetus dana serumu) (Sigma) ile desteklenmiş Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1 640 kültür besiyerinde bekletildi. İnek sütü proteini alerjisi olan deneklerin ve kontrollerin PKMH'si (0,2 mL), düz tabanlı 96 çukurlu mikro titre plakalara çukur başına $1,5 \times 10^5$ hücrelik bir yoğunlukta dağıtıldı ve bir CO₂ inkübatörde 37°'de beş gün süre ile aşağıdaki inek sütü alerjen proteinlerinin varlığında üretildi: α -laktalbümin; β -laktoglobülin; α S 1, α S 2, β ve κ -kazein fraksiyonu karışımları ve Foggia Üniversitesi Ziraat Fakültesi PrIME Araştırma Merkezi'nden elde edilen tam süttten hazırlanan bir inek sütü protein karışımı (2).

Süt proteinleri uyarı için 100 μ g/mL'lik yoğunlukta kullanıldı. Bütün kültür koşulları üç kopyalı olarak düzenlendi. Fitohemaglutinin (10 μ g/mL) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca, inek sütü proteini alerjisi olan hastalar ve kontrollerin PKMH'si RPMI besiyerinde inek sütü proteinleri eklenmeden de üretildi.

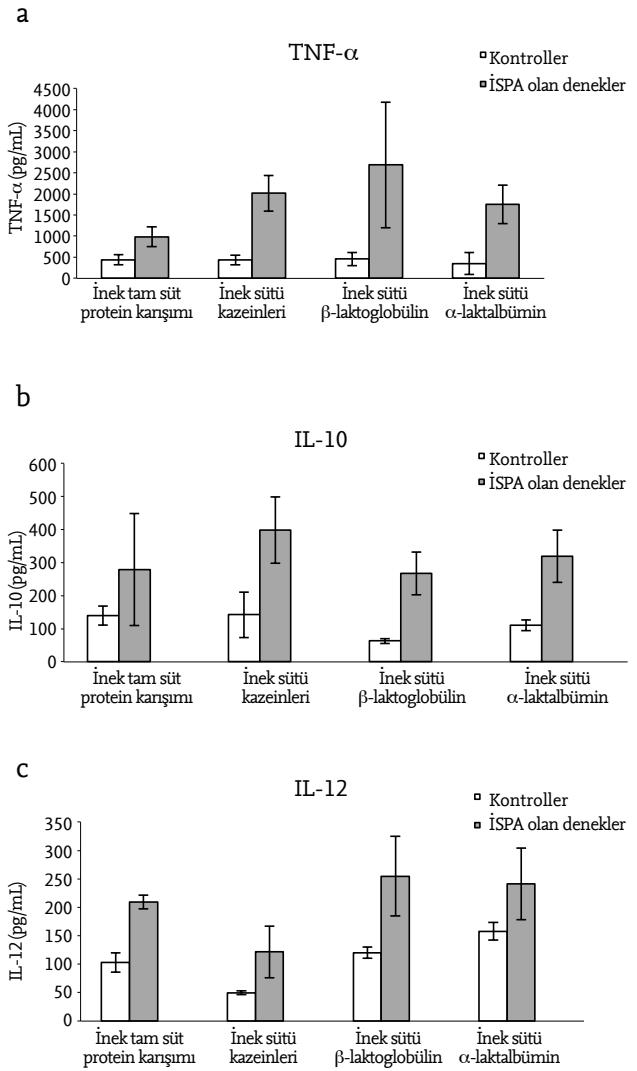
İnkübasyon döneminin sonunda, kültür süzüntüleri toplandı ve sitokin testlerinde kullanılabilecek kadar -20°C'de saklandı. İnterlökin-10, IL-12 ve TNF- α düzeyleri, ticari ELISA kitleri ile (R&D Systems, Minneapolis, MN) üreticinin yönergeleri doğrultusunda ölçüldü; sonuçlar pg/mL ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi.

İstatistiksel Çözümleme

İstatistiksel çözümler, Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi V17 yazılım programı (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapıldı. Normal dağılım göstermeyen değerleri karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi kullanıldı. P değeri <0,05 olan farklar anlamlı kabul edildi.

Bulgular

İnek sütü proteini alerjisi olan hastaların PKMH kültür süzüntülerinde (inek sütü α -laktalbümin, β -laktoglobülin, kazeinler ve tam süttten hazırlanan bir protein karışımı varlığında üretilen), TNF- α , IL-10 ve IL-12 düzeyleri (pg/mL), kontrol deneklerin kültürleri ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha yüksekti ($p < 0,05$) (Şekiller 1a, b, c). İnek sütü proteini alerjisi olan hastalarda ya da kontrollerde inek sütü proteinleri ile uyarılmamış PKMH'den elde edilen kültür süzüntüleri arasında sitokin üretimi açısından fark saptanmadı.



Şekil 1. a-c. α -laktalbümin; β -laktoglobülin; α S 1, α S 2, β ve κ -kazein fraksiyonu karışımları ve tam süttten elde edilen bir protein karışımı ile uyarılmış inek sütü protein alerjisi olan çocukların ve alerjisi olmayan kontrollerin periferik kan mononükleer hücre kültürlerinin süzüntülerinde tümör nekroz faktörü- α , interlökin-10 ve interlökin-12 düzeyleri (pg/mL). (a) Tümör nekroz faktörü- α konsantrasyonu ($p < 0,05$), (b) interlökin-10 konsantrasyonu ($p < 0,05$), (c) interlökin-12 konsantrasyonu ($p < 0,05$)

Tartışma

Sindirim sistemi bulguları ile birlikte olan besin alerjisinin tanısında altın standart halen sorun yaratan etkenin beslenmeden çıkarılması ve yeniden beslenmeye eklenmesi ile belirtilerin yeniden başlaması ilkesine dayanmaktadır ve günümüzde inek sütü proteinlerine karşı istenmeyen bağışıklık sistemi yanıtını ortaya koyacak yaygın olarak kabul edilmiş tek bir tanısal laboratuvar testi yoktur (3). T lenfositleri, bağışıklık sistemi içinde

biyolojik etkilerin çoğundan sorumlu olan hormonal taşıyıcılar olan sitokinler için önemli bir kaynaktır (17). T-helper (Th) 1 hücreler, interferon (IFN)- γ , IL-2, TNF- α , IL-12 ve IL-15 salgılama yeteneğine sahipken, Th2 hücreler IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 salgırlar (28). Tümör nekroz faktörü- α , IL-10 ve IL-12'ye alerjik hastalıkların temel düzenleyicileri olarak özellikle önem verilmiştir (24, 26). Interlökin-12 ve TNF- α , Th1 yanıtları ve hücrel bağışıklığı düzenlerken, IL-10 TH1 etkinliğini baskılar ve Th2 ve humoral bağışıklık yanıtlarını uyarır. İnek sütü proteini alerjisi ile ilgili alerjik hastalıklardan sorumlu özgün proteinleri belirlemek için bir dizi laboratuvar çalışması önerilmiştir (15, 16, 22, 29, 30). Çeşitli çalışmalarda, çocukların antijenle potansiyel olarak tehlikeli bir şekilde yeniden karşılaşmamasının önemi göz önünde bulundurularak İSPA tanısı için laboratuvar öngörü testlerinde TNF- α , IL-10 ve IL-12'nin kullanılabilceği öne sürülmüştür (3, 22). Bu bağlamda yapılan bazı çalışmalarda, İSPA olan hastaların PKMH'den salgılanan TNF- α IL-10 ve IL-12 sitokinlerinin yüksek bulunması, İSPA tanısında PKMH'nin kültüründe sitokinlerin ölçümünün yararlı olabileceği ileri sürülmüştür (22, 31).

Bizim verilerimiz, İSPA olan hastalarda, inek sütü proteinleri ile uyarılan PKMH kültüründe; aynı proteinler ile uyarılan alerjik olmayan kontrollerin PKMH kültürlerine göre anlamlı derecede daha yüksek TNF- α , IL-10 ve IL-12 düzeyleri oluştuğunu göstermiştir. Daha önceki çalışmalar, TNF- α , IL-10 ve IL-12 gibi çeşitli sitokinlerin etkinliklerini ayrı ayrı araştırmıştır ve bunların İSPA'yı açığa çıkarmadaki olası rolüne işaret etmiştir (2, 20, 21). Ancak, var olan tanısall testlerin hiçbirisi, bir çocukta İSPA olup olmadığını kesin olarak kanıtlayamaz ya da dışlayamaz (3). Alerjen eleme diyetleri ve alerjen yükleme yöntemleri, çocuklarda İSPA tanısı için halen altın standarttır (3, 11). Bu çalışmada değerlendirilen İSPA'lı olgu sayısı ve sağlıklı kontrol sayısı sınırlı idi. Ancak bulgularımız, PKMH kültürlerinde TNF- α , IL-10 ve IL-12 ölçümünün İSPA için öngörüselle bir rolü olabileceğini öne süren dizin verileri ile uyumludur (2, 20, 21). Bu bulgu, benzer modeller kullanan ve düşük TNF- α ve interferon düzeyleri saptayan diğere bir çalışma ile çelişmektedir (32). Bu nedenle, bu konuyu geniş kapsamlı bir şekilde araştırmak için daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir. Ayrıca, bu sitokinlerin üretimini İSPA'yı düşündüren klinik belirtileri olan olgularda, İSPA'yı ortaya koymak için yeterince özgün olup olmadığını anlamak da önemlidir.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma için etik kurul onayı Foggia Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (No: 2-2.06/2010).

Hasta Onamı: Hasta onamı bu çalışmaya katılan hastaların ebeveynlerinden alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - M.P.M., M.D'A. ; Tasarım - M.P.M.; Denetleme - M.P.M.; Kaynaklar - M.P.M.; Malzemeler - I.G., A.C.; Veri Toplanması ya/ya da İşlemesi - I.G., M.D'A.; Analiz ya/ya da Yorum - M.D'A.; Dizin Taraması- M.P.M.; Yazıyı Yazan - M.P.M.; Eleştirel İnceleme - I.G.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Mali Destek: Yazarlar bu çalışma için mali destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Foggia University School of Medicine (No: 2-2.06/2010).

Informed Consent: Informed consent was obtained from patients who participated in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - M.P.M., M.D'A.; Design - M.P.M.; Supervision - M.P.M.; Funding - M.P.M.; Materials - I.G., A.C.; Data Collection and/or Processing - I.G., M.D'A.; Analysis and/or Interpretation - M.D'A.; Literature Review - M.P.M.; Writing - M.P.M.; Critical Review - I.G.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Kaynaklar

1. Benhamou AH, Schäppi Tempia MG, Belli DC, Eigenmann PA. An overview of cow's milk allergy in children. *Swiss Med Wkly* 2009; 139: 300-7.
2. Tiemessen MM, Van Ieperen-Van Dijk AG, Bruijnzel-Koomen CAFM, Garssen J, Knol EF, Van Hoffen E. Cow's milk-specific T-cell reactivity of children with and without persistent cow's milk allergy: Key role for IL-10. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 932-9. [\[CrossRef\]](#)
3. Vandenas Y, Koletzko S, Isolauri E, et al. Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch Dis Child* 2007; 92: 902-8. [\[CrossRef\]](#)
4. Hill DJ, Hosking CS. Cow milk allergy in infancy and early childhood. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 243-6. [\[CrossRef\]](#)

5. Sicherer SH. Food Allergy. *Lancet* 2002; 360: 701-10. [\[CrossRef\]](#)
6. Giovannini M, Agostoni C, Fiocchi A, Bellu R, Trojan S, Riva E. Antigen-reduced infant formulas vs. human milk: growth and metabolic parameters in the first 6 months of life. *J Am Coll Nutr* 1994; 13: 357-63. [\[CrossRef\]](#)
7. Biggart T. Goat milk for the allergic child. *Paediatr Today (UK)* 1996; 4: 37-9.
8. Belloni-Businco B, Paganelli R, Lucenti P, Giampietro PG, Perborn H, Businco L. Allergenicity of goat's milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 1191-4. [\[CrossRef\]](#)
9. Pessler F, Nejat M. Anaphylactic reaction to goat's milk in a cow's milk-allergic infant. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15: 183-5. [\[CrossRef\]](#)
10. Caffarelli C, Baldi F, Bendandi B, et al. Cow's milk protein allergy. *Ital J Pediatr* 2010; 36: 5. [\[CrossRef\]](#)
11. Berni Canani R, Ruotolo S, Discepolo V, Troncone R. The diagnosis of food allergy in children. *Curr Opin Pediatr* 2008; 20: 584-9. [\[CrossRef\]](#)
12. Eigenmann PA. Mechanisms of food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2009; 20: 5-11. [\[CrossRef\]](#)
13. Klein SC, Boer LH de, Wenger RA, de Gast GC, Bast EJEG. Release of cytokines and soluble cell surface molecules by PBMC after activation with the bispecific antibodies CD3xCD19. *Scand J Immunol* 1997; 46: 452-8. [\[CrossRef\]](#)
14. Crucian B, Dunne P, Friedman H, Ragsdale R, Pross S, Widen R. Alterations in peripheral blood mononuclear cell cytokine production in response to phytoemagglutinin in multiple sclerosis patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 766-9.
15. Hill DJ, Ball G, Hosking CS. Clinical manifestations of cows' milk allergy in childhood: associations with in-vitro cellular immune responses. *Clin Allergy* 1998; 18: 469-79. [\[CrossRef\]](#)
16. Suomalainen H, Soppi E, Isolauri E. Lymphocyte response to cow's milk proteins in patients with cow's milk allergy: relationship to antigen exposure. *Pediatr Allergy Immunol* 1994; 5: 20-6. [\[CrossRef\]](#)
17. Bohle B. T lymphocytes and food allergy. *Mol Nutr Food Res* 2004; 48: 424-33. [\[CrossRef\]](#)
18. Desjeux JF, Heyman M. Milk proteins, cytokines and intestinal epithelial functions in children. *Acta Paediatr Jpn* 1994; 36: 592-6. [\[CrossRef\]](#)
19. Chung F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon- γ . *Mediators Inflamm* 2001; 10: 51-9. [\[CrossRef\]](#)
20. Heyman M, Desjeux JF. Cytokine-induced alteration of the epithelial barrier to food antigens in disease. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 915: 304-11. [\[CrossRef\]](#)
21. Benlounes N, Candalh C, Matarazzo P, Dupont C, Heyman M. The time-course of milk antigen-induced TNF-alpha secretion differs according to the clinical symptoms in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 863-9. [\[CrossRef\]](#)
22. Motrich RD, Gottero C, Rezzonico C, Riera CM, Rivero V. Cow's milk stimulated lymphocyte proliferation and TNFalpha secretion in hypersensitivity to cow's milk protein allergy. *Clin Immunol* 2003; 109: 203-11. [\[CrossRef\]](#)
23. Høst A, Koletzko B, Dreborg S, et al. Dietary products used in infants for treatment and prevention of food allergy. *Arch Dis Child* 1999; 81: 80-4.
24. Hagendorens MM, Didier G, Ebo DG, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Flow cytometrical determination of regulatory cytokines (IL-10, IL-12) and circulating dendritic cell cytokines in allergic asthmatic children. *Cytokine* 2004; 26: 82-8. [\[CrossRef\]](#)
25. Brightling C, Berry M, Amrani Y. Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 5-10. [\[CrossRef\]](#)
26. Krogulska A, Wasowska-Królikowska K, Polakowska E, Chrul S. Cytokine profile in children with asthma undergoing food challenges. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009; 19: 43-8.
27. Kim A, Pettoello-Mantovani M, Goldstein H. Decreased susceptibility of peripheral blood mononuclear cells from individuals heterozygous for a mutant CCR5 allele to HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 19: 145-9. [\[CrossRef\]](#)
28. Mediaty A, Neuber K. Total and specific serum IgE decreases with age in patients with allergic rhinitis, asthma and insect allergy but not in patients with atopic dermatitis. *Immun Ageing* 2005; 2: 9. [\[CrossRef\]](#)
29. Dupont C, Heyman M. Food protein-induced enterocolitis syndrome: laboratory perspectives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: S50-7. [\[CrossRef\]](#)
30. Saarinen 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: 423-9. [\[CrossRef\]](#)
31. Jyonouchi H, Geng L, Ruby A, Reddy C, Zimmerman-Bier B. Evaluation of an association between gastrointestinal symptoms and cytokine production against common dietary proteins in children with autism spectrum disorders. *J Pediatr* 2005; 146: 605-10. [\[CrossRef\]](#)
32. Osterlund P, Järvinen KM, Laine S, Suomalainen H. Defective tumor necrosis factor- α production in infants with cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 1999; 10: 186-90. [\[CrossRef\]](#)