

О.В. Ильчукова, Л.Б. Зубжицкая

Внутриутробное «программирование» аллергического фенотипа ребёнка и профилактика пищевой сенсibilизации на первом году жизни

Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург

Резюме: Установлено, что в условиях хронической плацентарной недостаточности плода частота пищевой сенсibilизации ребенка составляет 75%, тогда как в группе детей без хронической плацентарной недостаточности – 34,4%. Показано, что при неблагоприятных условиях внутриутробного развития система иммунитета плода испытывает значительную антигенную агрессию со стороны материнского организма. Об этом свидетельствует выявленная только при данной патологии значительная экспрессия сигнальных молекул CD83 и CD31 в периваскулярном пространстве децидуальной оболочки и в строме ворсин хориона плаценты в сочетании с активацией С3-компонента комплемента, высокой представленностью иммуноглобулинов А, М, G, ИЛ-4 и ИЛ-6. Передача антигена плоду, осуществляемая путем миграции дендритных клеток через сосудистый эндотелий ворсинчатого хориона, может способствовать преимущественной дифференцировке «наивных» Т-лимфоцитов в клетки с фенотипом Th2 – «программированию» аллергического фенотипа ребенка. Использование смеси на основе частичного гидролизованного сывороточного белка «НАН гипоаллергенный» производства компании «Нестле» (Швейцария) при смешанном и/или искусственном вскармливании детей, развивавшихся в условиях хронической плацентарной недостаточности, способствует развитию пищевой толерантности к белкам коровьего молока и тем самым снижает частоту проявлений ранней пищевой сенсibilизации.

Ключевые слова: новорожденный, пищевая сенсibilизация, хроническая плацентарная недостаточность, CD83, CD31, С3-компонент комплемента, цитокины, иммуноглобулины, профилактика, НАН гипоаллергенный.

Введение. Рост пищевой сенсibilизации привлекает внимание исследователей к изучению механизмов, лежащих в основе формирования аллергического фенотипа ребенка [3, 7, 18, 19]. Эпидемиологические и экспериментальные исследования показали тесную связь между воздействием аллергенов во время беременности, лактации и ранним развитием пищевой сенсibilизации, что позволило предположить возможность «программирования» аллергической направленности иммунитета в период внутриутробного развития плода [6, 16, 20]. Известно, что стимуляция иммунного ответа плода на антигены чужеродного материала, поступающие из организма матери в плацентарный кровоток, осуществляется дендритными клетками (ДК) плаценты, которые представляют антиген «наивным» Т0-лимфоцитам и определяют их дифференциацию в Th1 или Th2 лимфоциты [1, 2]. В последние годы накоплены экспериментальные данные и клинические наблюдения, свидетельствующие о том, что способность ДК модулировать дифференцировку «наивных» Т-лимфоцитов и инициировать формирование реакции адаптивного иммунитета зависит от активации С3-компонента комплемента [10, 11]. Последняя имеет значительную степень выраженности при антигенной стимуляции во время беременности и развитии хронической плацентарной недостаточности [12, 21].

Цель исследования. Изучить роль плаценты в патофизиологических механизмах, лежащих в основе формирования адаптивного иммунитета в период внутриутробного развития плода в условиях хронической плацентарной недостаточности (ХПН). Выяснить возможность использования гипоаллергенной смеси для профилактики пищевой сенсibilизации при смешанном и/или искусственном вскармливании детей, развивавшихся в условиях ХПН.

Материалы и методы. Обследованы 298 матерей и их детей при рождении и на первом году жизни. В исследование не включали матерей, страдающих бронхиальной астмой, сахарным диабетом и диабетом беременных. Критериями исключения для детей являлись недоношенность, рождение в асфиксии, родовая травма, внутриутробные инфекции и пневмония, гипербилирубинемия, врожденная патология функциональных систем организма. Основную группу составили 116 матерей и их детей, развивавшихся в условиях ХПН, подтвержденной результатами гистологического исследования последа. Контрольную группу составили 182 матери и их дети, беременность у которых протекала без ХПН.

Оценку соматического здоровья матери проводили на основании опроса, данных карт женской консультации и истории родов. Проводили клиническую оценку состояния новорожденных.

Новорожденные дети основной группы имели гестационный возраст ≥ 37 недель. Среднюю массу тела $2848,0 \pm 144,0$ г, рост – $49,0 \pm 0,5$ см. Оценка по шкале Апгар при рождении составила 7–8 баллов. Поскольку дети развивались в условиях ХПН, у большинства из них отмечалась задержка внутриутробного развития. 57 детей были извлечены с помощью плановой операции кесарева сечения по показаниям со стороны матери (рубец на матке, высокая степень миопии, нарастание тяжести гестоза). Период новорожденности у детей протекал без осложнений. Максимальная убыль массы тела на 3–4-й дни жизни составила в среднем 6,0%, ее восстановление наблюдалось с 4–5-го дня жизни.

Дети контрольной группы имели гестационный возраст ≥ 37 недель, среднюю массу тела $3456,6 \pm 50,8$ г, рост – $51,7 \pm 0,3$ см. Оценка по шкале Апгар при рождении составила 7–8 баллов. С помощью плановой операции кесарева сечения по тем же показаниям, что и в основной группе, были рождены 50 детей. Период новорожденности протекал без осложнений. Максимальная убыль массы тела на 3–4 день жизни составила в среднем 5,3%, ее восстановление наблюдалось с 4–5-го дня жизни.

Дети, извлеченные операцией кесарева сечения, были приложены к груди матери к концу первых суток жизни, остальные – сразу после рождения.

Все дети на первом году жизни были здоровы. Характер вскармливания и частоту пищевой сенсибилизации анализировали на основании опроса матерей по специально разработанной анкете, включавшей при указании матери на наличие у ребенка аллергии следующие вопросы: 1) Какой продукт «подозревается»; 2) вызывает ли «подозреваемый» продукт определенные симптомы со стороны кожи, желудочно-кишечного тракта при каждом его употреблении, и зависит ли выраженность симптомов от количества продукта; 3) через какой период времени после еды симптомы возникают и как долго сохраняются; 4) бывают ли подобные клинические симптомы без употребления «подозреваемого» продукта.

21 ребенок, получал докорм смесью на основе частично гидролизованного сывороточного белка «НАН гипоаллергенный», «Нестле» (Швейцария). 45 детей получали докорм стандартными смесями на основе цельного белка коровьего молока по выбору родителей «НАН 1» производства компании «Нестле», «Нутрилон» фирмы «Нутриция», «Фрисолак» фирмы «Фрисо»).

При изучении 38 плацент использованы дополнительно иммуногистохимический анализ для выявления экспрессии молекулы CD83 – показателя присутствия зрелых ДК и молекулы клеточной адгезии CD31. Кроме того, с помощью иммуноморфологического исследования определяли наличие активации С3-компонента комплекса, иммуноглобулинов (IgM, IgA, IgG), и цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-6).

Имуногистохимический анализ проводили на криостатных срезах с использованием первичных моноклональных мышинных антител к CD83 (1:20) и

биотинилированных антимышиных иммуноглобулинов в качестве вторичных антител, для визуализации окраски использовали комплекс авидина с биотинилированной пероксидазой (ABC-kit) с последующим проявлением пероксидазы хрена диаминобензидином (все реагенты фирмы «Dako»). Для измерения площади поля зрения (S%) и оптической плотности (у.е.) использовали систему компьютерного анализа микроскопических изображений состоящую из микроскопа «Nikon Eclipse E400», цифровой камеры «Nikon DXM 1200», персонального компьютера на базе Intel Pentium 4, программного обеспечения AC-1, версия 2.12 и «Видеотест-морфология 5.0».

Имуноморфологическое исследование биоптатов центрального и периферического отделов плаценты проводили на криостатных срезах, обработанных по методу Cronenberg с использованием метода прямой и непрямой иммунофлюоресценции с применением специфических сывороток против цитокинов ИЛ-4, ИЛ-6, С3-фракции комплемента человека (фирма ICN, США), а также моноклональных антител против (IgM, IgA, IgG) (титр 1:10), меченных ФИТЦ («протеиновый контур», СПб). Препараты изучали в люминесцентном микроскопе «Zeiss Axiostar Plus HBO 50/AC» и фотографировали с помощью фотокамеры Nikon. В полученных снимках при использовании компьютерной программы Video-Test-Master оценивали интенсивность люминесцентного свечения в условных единицах (у.е.). Интенсивность свечения считали значительно выраженной при 30 и более у.е. (максимальная степень свечения 320 у.е.).

Статистическая обработка данных включала подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения доверительного интервала для каждой выборки и U-критерия Вилкоксона – Манна – Уитни – для независимых выборок с помощью программы Statistica-6,0. Вычисления значимости различий процентов проводили по методике углового преобразования Фишера. С целью статистического изучения связи между явлениями рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что экспрессия CD83 – маркера зрелых антигенпрезентирующих клеток и сигнальной молекулы CD31, участие которой установлено в модуляции клеточной адгезии, в механизмах активации и дифференциации Т-лимфоцитов, выявляется, как правило, в ткани при наличии хронической плацентарной недостаточности ($r=0,6$; $p<0,01$). Относительная площадь экспрессии CD83 составляет $4,94 \pm 1,05\%$, CD31 – $1,28 \pm 0,34\%$, а оптическая плотность, соответственно, – $0,35 \pm 0,08$ и $0,29 \pm 0,02$ у.е. При этом, чем больше площадь представленности ДК, тем больше площадь, занимаемая CD31-иммунопозитивными клетками ($r=0,8$; $p<0,001$). Подобная взаимосвязь характерна и для степени оптической плотности их свечения ($r=0,07$; $p<0,001$).

Имелась высокая положительная корреляционная связь между представленностью ДК и значительным отложением в ткани С3-компонента комплемента ($r=0,95$; $p<0,001$), IgA ($r=0,82$; $p<0,001$), IgM ($r=0,69$; $p<0,001$), IgG ($r=0,67$; $p<0,001$) и фибриноида ($r=0,7$; $p<0,001$). Только в тех плацентах, где были выявлены CD83 и CD31, наблюдалось избыточное (от 30 до 320 у.е.) свечение ИЛ-6 и ИЛ-4 в межворсинчатом пространстве, в области базальных мембран трофобласта и сосудов ворсин хориона. Имелась положительная корреляционная связь между наличием ДК (CD83) и высокой оптической плотностью свечения ИЛ-4 ($r=0,800$; $p<0,001$), ИЛ-4 ($r=0,625$; $p<0,05$).

Активация С3-компонента комплемента необходима для дифференцировки и созревания ДК. Компоненты С3, связываясь с ДК, обеспечивают эффективный захват последними иммунных комплексов, подвергнутых апоптозу или некрозу клеток плаценты, а также различных антигенов, поступающих из материнского кровотока [10, 12]. ДК, являясь главными активаторами «наивных» Т-лимфоцитов, модуляторами ответов В-лимфоцитов и натуральных киллеров, продуцируют цитокины, которые дифференцированно регулируют тип иммунного ответа [8, 14]. Положительная корреляция между наличием в плаценте экспрессии ДК и высокой продукцией ИЛ-4 и ИЛ-6 может указывать на активацию Th2-типа иммунного ответа.

Выявленная экспрессия CD31 в местах локализации зрелых ДК, вероятно, связана с миграцией последних и стимуляции «наивных» Т-лимфоцитов. Известно, что белок CD31 способствует созреванию ДК, их адгезии к сосудистому эндотелию и миграции через сосудистую стенку [4, 9], участвует в регуляции количества и паттерна продуцируемых ДК цитокинов [13, 15], а также в процессах дифференциации «наивных» Т-лимфоцитов в сторону Th2-типа иммунного ответа и синтеза антител В-лимфоцитами [5, 8, 15].

Установлено, что частота пищевой сенсибилизации ребенка при развитии в условиях ХПН составляет 75%, тогда как в контрольной группе – 34,4%.

Для анализа эффективности профилактики пищевой сенсибилизации у детей основной группы были сформированы следующие подгруппы: 1-я – 6 детей, матери которых указывали на наличие аллергических заболеваний (АЗ), но беременность протекала у них без осложнений, 2-я – 9 детей, у матерей которых не было АЗ, но беременность осложнилась ХПН, 3-я – 6 детей, у матерей которых имелись АЗ и осложнение беременности ХПН. Группы сравнения выбраны по тому же принципу среди новорожденных контрольной группы (25:8:12; 1а:2а:3а соответственно). В 4-ю подгруппу вошли 39 детей, матери которых не страдали аллергией и не имели осложнения беременности ХПН. Установлено, что в 1-й подгруппе детей, в анамнезе матерей которых имелись указания на аллергию, частота пищевой сенсибилизации на первом году жизни не отличалась от таковой в группах сравнения и составила соответственно $50,0\pm 20,4$; $32,0\pm 9,3$; $35,9\pm 7,7\%$ ($p>0,1$) соответственно. В то же время большинство

детей групп сравнения получали в течение первых 4–6 месяцев жизни только грудное вскармливание (соответственно $68,0\pm 9,3$ и $69,2\pm 7,4\%$). Кроме того, большинство детей первой группы были извлечены путем операции кесарева сечения, тогда как в группах сравнения их было в 2 и 3 раза меньше.

Частота пищевой сенсибилизации у детей 2-й подгруппы составила $33,3\pm 15,7\%$; то есть соответствовала таковой в группе здоровых детей – $35,9\pm 7,7\%$ ($p>0,1$). В то же время у детей контрольной 2а группы, развивавшихся в условиях ХПН и получавших смеси без частичного гидролиза белка, в 2 раза чаще ($62,5\pm 17,1\%$; $p>0,1$) наблюдались аллергические реакции на белок коровьего молока, рыбы и некоторые овощи. Подобная закономерность была выявлена при анализе частоты пищевой сенсибилизации у детей, у матерей которых имелись АЗ и беременность осложнилась хронической ХПН. Несмотря на то, что у матерей чаще имелись заболевания эндокринной системы, у всех было тяжелое течение гестоза, задержка внутриутробного развития плода и кесарево сечение. Пищевая сенсибилизация у детей на первом году жизни не наблюдалась. В то же время она была выявлена у $83,3\pm 7,7\%$ ($p<0,001$) детей 2а контрольной группы и у $35,9\pm 7,7\%$ ($p<0,001$) детей 4-й подгруппы.

Заключение. Установлено, что при ХПН система иммунитета плода испытывает значительную антигенную агрессию со стороны материнского организма, о чем свидетельствует экспрессия сигнальных молекул CD83 и CD31 в периваскулярном пространстве децидуальной оболочки и в строме ворсин хориона плаценты в сочетании с активацией С3-компонента комплемента и высокой представленностью ИЛ-4 и ИЛ-6. Передача антигена плоду, осуществляемая путем миграции ДК через сосудистый эндотелий ворсинчатого хориона, может способствовать преимущественной дифференцировке «наивных» Т-лимфоцитов в клетки с фенотипом Th2, т.е. «программированию» аллергического фенотипа ребенка. Это свидетельствует о том, что использование смеси на основе частичного гидролиза белка («НАН гипоаллергенный») на протяжении первого года жизни ребенка в дополнение или взамен грудного вскармливания позволяет снизить частоту манифестаций пищевой сенсибилизации у детей высокого риска её развития.

Литература

1. Banchereau, J. Immunobiology of dendritic cells / J. Banchereau [et al.] // *Annu rev. immunol.* – 2000. – Vol. 18. – P. 767–811.
2. Breloer, M. CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis / M. Breloer, B. Fleischer // *Trends in Immunology.* – 2008. – Vol. 29, № 4. – P. 186–194.
3. Chung, E.K. Antenatal risk factors, cytokines and the development of atopic disease in early childhood / E.K. Chung, [et al.] // *Arch. dis. child. fetal. neonatal.* – 2007. – Vol. 92 (1). – P. 68–73.
4. Ferrero, E. CD14+ CD34+ peripheral blood mononuclear cells migrate across endothelium and give rise to immunostimulatory dendritic cells / E. Ferrero [et al.] // *J. immunol.* – 1998. – Vol. 160, № 6. – P. 2675–2683.
5. Fraska, L. CD83 orchestrates migration, survival, and Th1 immune response of human mature dendritic cells. / L. Fraska [et al.] // *Blood.* – 2006. – Vol. 107 (6). – P. 2392–2399.

6. Holt, P.G. Soothing signals: transplacental transmission of resistance to asthma and allergy / P.G. Holt, D.H. Strickland // J. exp. med. – 2009. – Vol. 206 (13). – P. 2861–2864.
7. Holt, P.G. Prenatal versus postnatal priming of allergen specific immunologic memory: the debate continues / P.G. Holt // G. allergy. clin. immunol. – 2008. – Vol. 122 (4). – P. 717–718.
8. Krumbiegel, D. Efficient maturation and cytokine production of neonatal DCs requires combined proinflammatory signals / D. Krumbiegel [et al.] // Clin. dev. immunol. – 2005. – Vol. 12 (2). – P. 99–105.
9. Partida-Sanchez, S. Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity / S. Partida-Sanchez [et al.] // Immunity. – 2004. – Vol. 20. – P. 279–291.
10. Roozendaal, R. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity / R. Roozendaal, M.C. Carrol // Immunol. Rev. – 2007. – Vol. 219. – P. 157–166.
11. Sandor, N.A novel, complement-mediated way to enhance the interplay between macrophages, dendritic cells and T lymphocytes / N. Sandor [at al.] // Mol. immunol. – 2009. – Vol. 47. – P. 438–448.
12. Sinha, D. Immunological studies of human placenta: complement components in pre-eclamptic chorionic villi / D. Sinha, M. Wels, W.P. Faulk // Clin. exp. immunol. – 1984. – Vol. 56. – P. 175–184.
13. Sozzani, S. Chemokines and dendritic cell traffic. / S. Sozzani [at al.] // J. clin. immunol. – 2000. – Vol. 20. – P. 151–161.
14. Steinman, R.M. Taking dendritic cells into medicine / R. M. Steinman, J. Banchereau // Nature. – 2007. – Vol. 449. – P. 419–426.
15. Torimoto, Y. CD31, a novel cell surface marker for CD4 cells of suppressor lineage, unaltered by state of activation. / Y. Torimoto [et al.] // J. immunol. – 1992. – Vol. 148 (2). – P. 388–396.
16. Warner, J.A. Early life events in allergic sensitization / J.A. Warner, J.O Warner // Br. med. bull. – 2000. – Vol. 56 (4). – P. 883–893.
17. Warner, J.A. Prenatal origins of allergic disease / J.A. Warner [et al.] // J. allergy clin. immunol. – 2000. – Vol. 105 (2 Pt. 2). – P. 493–498.
18. Аллергические заболевания у детей и окружающая среда (обзор материалов 53-го семинара Нестле по детскому питанию). М.: ООО «Нью Информ», 2005. – 240 с.
19. Баранов, А.А. Факторы риска возникновения аллергических болезней у детей / А.А. Баранов, И.И. Балаболкин, И.В. Рылеев // Детская аллергология: руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР-медиа, 2006. – С. 18–31.
20. Евсюкова, И.И. Механизмы программирования заболевания потомства при акушерской патологии / И.И. Евсюкова // Журн. акуш. и женских болезней. – 2011. – Вып. 3. – С. 197–202.
21. Зубжицкая, Л.Б. Иммуноморфологическое состояние плаценты при акушерской патологии / Л.Б. Зубжицкая, Н.Г. Кошелева, В.В. Семёнов. – СПб.: «Нордмедиздат», 2005. – 303 с.

O.V. Ilchukova, L.B. Zubhitzkaya

Intrauterine «programming» of infant allergic phenotype and prevention of food sensitization during the first year of life

Abstract. *The incidence of food sensitization in a child developing under conditions of chronic placental insufficiency amounted to 75%, whereas in the control group of children it was 34,4%. In unfavorable conditions of intrauterine development the immunity system of the fetus experiences considerable antigen aggression from the maternal organism, which is indicated by on considerable expression of signal molecules CD83 and CD31 in the perivascular space of the decidual membrane and in stroma of the villi of placental chorion in combination with activation of C3 complement component high representation of immunoglobulins A, M, G, IL-4 and IL-6 that are revealed only in this pathology. Presentation of an antigen to the fetus effected by migration of dendrite cells through the vascular endothelium of the villous chorion might promote predominant differentiation of «naive» T-lymphocytes into cells with Th2 phenotype – «programmings» of child's allergic phenotype. Using a formula based on partially hydrolyzed serum protein «NAN hypoallergenic», «Nestle» (Switzerland) in mixed feeding of infants, whose intrauterine development occurred under the conditions of chronic placental insufficiency, promotes development of food tolerance to cow's milk proteins and thus decreases the incidence of manifestations of early food sensitization.*

Key words: *newborn, food sensitization, chronic placental insufficiency, CD83, CD31, C3 complement component, cytokines, immunoglobulins, prevention, NAN hypoallergenic.*

Контактный телефон: 8-911-297-14-78; e-mail: aldegid@mail.ru