

8. Shumatova T.A., Shishatskaya S.N., Zernova E.S. [et al.]. Modern markers in the diagnosis of food intolerance in infants // Pacific Medical Journal. 2015. No. 3. P. 55–58.
9. Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. EAACI, 2014. 278 p.
10. Koletzko S., Niggemann B., Arato A. [et al.]. Diagnostic approach and management of cow's milk protein allergy in infants and children: ESPGHAN GI committee practical guidelines // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2012. Vol. 55. No. 2. P. 221–229.
11. Vandenas Y., Dupont C., Eigenmann P. [et al.]. A workshop report on the development of the Cow's Milk-related Symptom Score awareness tool for young children // Acta Paediatr. 2015. Vol. 104, No. 4. P. 334–339. doi: 10.1111/apa.12902.
12. Vandenas Y., Marchand J., Meyns L. Symptoms, diagnosis, and treatment of cow's milk allergy // Curr. Pediatr. Rev. 2015. Vol. 11, No. 4. P. 293–297.

Поступила в редакцию 20.07.2016.

#### IMPROVING THE DIAGNOSIS OF COW'S MILK PROTEIN ALLERGY IN INFANTS

T.A. Shumatova<sup>1</sup>, S.N. Shishatskaya<sup>1</sup>, E.S. Zernova<sup>1</sup>, A.N. Ni<sup>1</sup>, E.Yu. Katenkova<sup>1</sup>, N.G. Prikhodchenko<sup>1</sup>, L.A. Grigoryan<sup>1</sup>, S.V. Egorova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation), <sup>2</sup> Regional Clinical Center of Specialized Medical Care (30/37 Uborevicha St. Vladivostok 690091 Russian Federation)

**Objective.** The research objective is to analyze the possibilities of using the rating clinical scale CoMiSS and the determination of endogenous proteins and peptides in coprofiltrates for the improvement of diagnosis of cow's milk protein allergy (CMPA) in infants.

**Methods.** The study included 60 infants of the first year of life with suspected CMPA: 30 infants with CMPA (the 1<sup>st</sup> group), and 30 infants with the secondary lactase deficiency (the 2<sup>nd</sup> group). The control group included 20 healthy infants. We assessed clinical symptoms using CoMiSS instrument and cutaneous syndrome based on SCORAD index, determined in coprofiltrates endogenous proteins and peptides:  $\beta$ -defensin 2, zonulin, eosinophilic cationic protein. **Results.** In the monitoring groups the total number of points on the scale CoMiSS the score was higher than in the control group, but not significantly different between groups. The differences in the severity of symptoms of lactase deficiency were also unreliable and symptoms of skin lesions were more common in the 1<sup>st</sup> group. The defeat of the respiratory tract is not registered in any of the child with a secondary hypolactasia. An increase in the  $\beta$ -defensin 2 in coprofiltrates was typical only for children with the CMPA, zonulin content in children of the 1<sup>st</sup> was 1.5 higher than that of children in the 2<sup>nd</sup> group, and 2.3 times higher than the control parameters. The level of eosinophil cationic protein in patients with the CMPA was 2.9 times higher than that of children in the 2<sup>nd</sup> group, and it was 2.7 times higher than in healthy children.

**Conclusions.** The widespread use of SCORAD index and the tool CoMiSS, and the analysis of the content of endogenous proteins and peptides in coprofiltrates can improve the diagnosis of the CPMA in infants by avoiding invasive research methods and provocative diets.

**Keywords:** lactase deficiency, endogenous proteins and peptides, CoMiSS, SCORAD.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 4, p. 19–22.

УДК 618.177/.39-06:616-056.43-085

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2016.4.22–25

## Некоторые иммунологические механизмы невынашивания беременности и бесплодия при полинозе и возможные пути их коррекции

Г.И. Цывкина, Н.В. Григорьева, Г.А. Луценко, О.В. Петрова

Краевой клинический центр современных видов медицинской помощи (690091, г. Владивосток, ул. Уборевича, 30/37)

Обследованы 22 женщины с полинозом, имевшие в анамнезе эпизоды невынашивания беременности, и 31 женщина с полинозом, но без отягощенного акушерского анамнеза. Изменения иммунологических параметров у пациенток с полинозом имели схожую клиническую картину. Однако в группе с привычным невынашиванием беременности отмечалась высокая активность NK-клеток с цитотоксическим фенотипом. У женщин без отягощенного акушерского анамнеза NK-клетки определялись в пределах нормальных показателей и при беременности меняли свой фенотип на иммуносупрессивный.

**Ключевые слова:** истинные киллеры, T-лимфоциты, аллергия, плацента.

Классически привычным невынашиванием беременности, по рекомендации ВОЗ, принято называть ситуацию трех или более последовательных невынашиваний, однако в России практические врачи подразумевают под этим термином невынашивание более двух беременностей и устанавливают этот диагноз женщинам с двумя и более самопроизвольными прерываниями гестации. По определению ВОЗ, самопроизвольные выкидыши – потери беременности до 22 недель с массой плода менее 500 г, преждевременные роды – роды с 22 до 37 полных недель беременности с массой плода

от 500 г. В России ранними считаются выкидыши до 12 недель беременности, поздними – выкидыши в 12–22 недели. Ранее бытовало мнение, что основные причины привычного невынашивания – инфекции и хромосомные аномалии, недостаток прогестерона и анатомические дефекты. Современное обследование – сонография, гистеросальпингография, лапароскопия, биопсия эндометрия, хромосомный анализ клеток родителей и плодов, измерение уровня прогестерона, – по данным литературы, позволяет обнаружить причину только 50% невынашиваний. Есть основание предполагать, что оставшиеся причины в основе имеют иммунные механизмы. Так, большинство привычных выкидышей сопровождается иммунными нарушениями, в частности

Цывкина Галина Ивановна – канд. мед. наук, доцент, заведующая региональным центром клинической аллергологии и иммунологии ККЦСВМП; e-mail: galatsyvkina@mail.ru

наличием материнских антител к лейкоцитам отца, антифосфолипидных и антинуклеарных антител.

Эндометрий матери – это аутооттрансплантат, который позволяет аллотрансплантату (плоду) существовать в нем в течение 38–40 недель при том, что сам эндометрий содержит полный набор иммунокомпетентных клеток. Во время беременности фетоплацентарный комплекс взаимодействует с иммунной системой посредством Т- и В-лимфоцитов, иммунорегуляторных клеток, естественных киллеров, разнообразных молекулярных факторов (цитокинов, хемокинов) и антител. В значительной степени взаимодействие между фетоплацентарными тканями и иммунной системой матери определяет успешное окончание беременности.

Клетки плода несут антигены как матери, так и отца, и несмотря на это существует феномен «иммунологического парадокса» беременности, связанного с возникновением иммунологической толерантности. Толерантность иммунной системы матери к антигенам плода объясняют взаимодействием рецепторов децидуальных лимфоцитов с молекулами локуса HLA-G, экспрессированных на клетках трофобласта. Лигандами для молекул этого локуса служат рецепторы ILT и KIR2DL4 истинных (натуральных) киллеров – NK-клеток (natural killer cells – NK cells). Взаимодействие этих рецепторов с молекулами локуса препятствует активации цитотоксической функции NK-клеток [1, 2].

Имплантиция и нормальное развитие беременности во многом зависят и от продуцируемых NK-клетками децидуальной оболочки цитокинов [3]. Беременность сопровождается повышенной секрецией интерферона- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ) NK-клетками. Связывание молекулы локуса HLA-G, экспрессированной на клетках трофобласта, и рецептора KIR2DL4 NK-клеток стимулирует секрецию ИФН- $\gamma$  этими лимфоцитами при одновременном ингибировании их цитотоксической активности в отношении трофобласта [4, 9, 11]. NK-клетки матки оказывают иммуномодулирующее действие на клетки плаценты за счет продукции гликоделина и галектина-1. Гликоделин и галектин-1 обладают подавляющими иммунный ответ свойствами и влияют на цитокиновую сеть плаценты. Они уменьшают продукцию фактора некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкина (ИЛ) 2 и ИФН- $\gamma$  Т-лимфоцитами, локализованными в эндометрии, а также снижают продукцию ИЛ-12 активированными макрофагами, что способствует индукции иммунной толерантности в отношении плода [12]. Также NK-клетки матки продуцируют ангиопоэтин-2 и плацентарный фактор роста. При связывании с ними рецепторов KIR2DL4 NK-клетки экспрессируют ИЛ-1 $\beta$  и ИФН- $\gamma$ , стимулируют продукцию фактора роста эндотелия сосудов клетками трофобласта и таким образом способствуют ангиогенезу и повышают жизнеспособность клеток плаценты [10]. Кроме того, эти лимфоциты продуцируют ИЛ-8 и индуцибельный протеин-10 – цитокины, помогающие инвазии трофобласта. Таким образом, NK-клетки матки оказывают

значительное влияние на формирование плаценты. Изменение их функционального состояния может приводить к нарушению формирования ткани плаценты и развитию таких патологий беременности, как невынашивание и гестоз [14].

Из литературы известно, что при физиологическом течении беременности NK-клетки мигрируют из периферической крови в ткань матки, где происходит изменение их фенотипа с цитотоксического (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) на регуляторный (CD16<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>). При этом NK-клетки матки обладают сниженной цитотоксической активностью при сохранении способности к синтезу и секреции ИФН- $\gamma$  и других цитокинов [7, 8]. При физиологическом течении беременности эти лимфоциты остаются иммунологически толерантными в отношении клеток трофобласта и плаценты. При нарушении экспрессии трофобластом неклассических молекул главного комплекса гистосовместимости HLA-G цитотоксическая активность NK-клеток матки не подавляется, что способствует индукции воспалительной реакции в ткани плаценты и нарушению формирования ее сосудистой сети за счет усиления апоптотической гибели клеток [6]. Нарушение экспрессии NK-клетками рецепторов KIR, взаимодействующих с неклассическими молекулами локуса HLA I класса, при беременности приводит к усилению цитотоксической активности NK-клеток, что также способствует развитию таких осложнений, как гестоз и привычное невынашивание. У женщин с привычным невынашиванием меняется соотношение цитокинов: повышается концентрация ИЛ-2 и ИЛ-12 и снижается концентрация ИЛ-4 и ИЛ-10. Изменяется хелперный профиль в сторону Т-хелперов 2-го типа [15].

Согласно результатам многочисленных популяционно-статистических исследований, распространенность аллергических заболеваний в течение последних 30 лет повсеместно удваивалась каждые десять лет. Классическим примером таких заболеваний служит поллиноз, которым страдают до 30 % населения планеты. Активационный процесс при поллинозе описан в большом числе публикаций, уже многое известно об экспрессии основных активационных антигенов при его обострении и ремиссии. Сформирована концепция о нарушении индукции активационного апоптоза при атопических заболеваниях [4, 5].

---

#### Материал и методы

---

Объектом исследования послужили направленные врачами-гинекологами женщины 22–38 лет, страдавшие поллинозом в стадии ремиссии с отягощенным (1-я группа – 22 человека) и неотягощенным (2-я группа – 31 человек) акушерским анамнезом. Контрольная группа – 20 пациенток без отягощенного аллергического и гинекологического анамнеза. Исследование проводилось 5 лет.

В 1-й группе при аллергологическом обследовании чаще всего встречалась сочетанная сенсibilизация

к пыльце деревьев, смеси сорных трав и злаков – 9 человек (40,9%). Сенсibilизация к пыльце деревьев и сорных была у 7 (31,8%), одновременно к злакам и смеси сорных трав – у 6 (27,3%) женщин.

При исследовании иммунного статуса применяли фенотипирование мембранных антигенов (CD – Cluster of Differentiation) лимфоцитов периферической крови методом проточной цитофлуориметрии, определяли фагоцитарную активность нейтрофилов и другие фагоцитарные показатели, уровень различных фракций комплемента и цитокинов. Все исследования проводились в сети медицинских лабораторий «ТАФИ-Диагностика».

При статистическом анализе полученных данных использовали параметрический критерий Стьюдента. Результаты исследования даны как средняя арифметическая и ее средняя ошибка.

#### Результаты исследования

У пациенток с поллинозом доля Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>) составила в среднем 42,9±3,4%, что значимо ниже нормативных показателей. Причем, падение общей численности этих клеток отмечалось у 63,8% обследованных. Содержание НК-клеток (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) у всех пациенток с поллинозом было снижено и колебалось в пределах 7,0±1,5%, тогда как у здоровых женщин оно было значимо выше – 12,8±0,7%. Причем снижение этого показателя в группе женщин с отягощенным акушерским анамнезом было достоверно ниже, чем во 2-й группе. Доли В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>) в 1-й и 2-й группах значимо не различались: 10,0±0,4 и 10,0±1,7%, соответственно. Активация цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) регистрировалась в обеих группах вне зависимости от гинекологического анамнеза.

Беременность у представительниц 1-й группы чаще всего наступала в период повышенной поллинииции причинно-значимых аллергенов, и ее I триместр приходился на опасный период (пыления). Обычно им назначалась базисная неспецифическая гипосенсибилизирующая терапия, длительно, до наступления беременности. Планировать беременность рекомендовалось с учетом времени цветения аллергенов – октябрь – начало ноября. У 19 человек беременность наступила в рекомендуемые сроки с отменой гипосенсибилизирующей терапии, одна пациентка исключена из исследования по семейным обстоятельствам и у двух беременность наступила в период лечения и повышенной поллинииции «виновных» аллергенов. Так, у одной из этих двух пациенток в анамнезе было два эпизода невынашивания и отсутствие беременности в течение 17 лет, у другой – три эпизода невынашивания и две неудачные попытки экстракорпорального оплодотворения (в период повышенной поллинииции). Учитывая сложность ситуации и клинические признаки поллиноза, этим женщинам на период пыления продолжали терапию обратными агонистами H<sub>1</sub>-рецепторов (зиртек) и интраназальными препаратами, а также

внутривенно вводили человеческий нормальный иммуноглобулин G (октагам) по специально разработанным схемам при невынашивании беременности.

В процессе клинического исследования 19 женщинам 1-й группы, прошедшим полный курс базисной терапии, повторили иммунологическое обследование перед предполагаемой беременностью (12–18 месяцев, в зависимости от спектра сенсibilизации и периода начатого лечения). Количественные показатели НК-клеток, общих Т-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов у них не отличались от контроля.

#### Обсуждение полученных данных

В последнее время появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что большинство привычных выкидышей, замерших беременностей и самопроизвольных аборт вызваны иммунными нарушениями. Важную роль в процессах имплантации плодного яйца и формировании спиральных артерий эндометрия играют натуральные киллеры (НК-клетки), ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2 [13]. При этом повышенная цитотоксичность НК-клеток создает проблемы в вынашивании беременности [7]. По неизвестным на сегодня причинам эти клетки могут «атаковать собственную беременность», приводя к остановке ее развития до 12 недель. Это связано с формированием плаценты, которая является мощным буфером, отсекающим негативное влияние НК-клеток и других факторов. Повышенный уровень натуральных киллеров в более поздних сроках может привести к отслойке нормально расположенной плаценты, ее отеку и антенатальной гибели плода. Известно, что при значительно сниженных показателях цитотоксичности НК-клеток вне беременности отмечается повышение ее уровня во время последующей беременности. Причины данного феномена до сих пор неизвестны [12, 13].

Идентификация иммунологических критериев, коррелирующих с клинической картиной поллиноза, – перспективное направление клинической и лабораторной диагностики и прогнозирования возможного привычного невынашивания беременности. Коррекция иммунологических нарушений при поллинозе, в том числе вызванных выбросом биологически активных веществ, где лидирует гистамин, с помощью базисной неспецифической гипосенсибилизирующей терапии позволяет снижать цитотоксичность иммунокомпетентных клеток при невынашивании беременности за счет смены их фенотипа с CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> на CD16<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> (иммуносупрессирующий).

В связи с этим в программе пригравидарной подготовки у женщин, имеющих в анамнезе эпизоды невынашивания беременности, необходимо предусмотреть обследование на поллиноз, а у женщин с уже выявленным поллинозом – определение уровней НК-клеток (CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) и функциональной активности НК-клеток оценивать

по экспрессии ими CD107a – гликопротеина, ассоциированного с лизосомальными мембранами.

Проведенное исследование показало, что среди массы причин невынашивания беременности следует учитывать и нарушения иммунорегуляции, связанные с сенсбилизацией к экзоаллергенам. Лечение алергопатологии до наступления беременности для купирования аллергических воспалительных процессов, приводит к коррекции данных нарушений. Поэтому мы рекомендуем предусмотреть в программе пригравидарной подготовки женщин, имеющих в анамнезе эпизоды невынашивания беременности, обследование на поллиноз с последующим изучением количества и функциональной активности естественных киллеров и проведением базисной терапии у врача алерголога-иммунолога.

#### Выводы

1. Одной из причин повышения цитотоксичности НК-клеток при беременности служит выброс биологически активных веществ из клеток-мишеней аллергии у женщин, страдающих поллинозом. Причем у женщин с поллинозом и благополучным акушерским анамнезом не отмечались сезонные колебания уровня НК-клеток.

2. При базисной неспецифической гипосенсибилизирующей терапии в пригравидарной подготовке женщин и изменении сроков предполагаемого зачатия отмечалось успешное течение беременности и рождение в срок доношенных детей. Это позволяет рекомендовать в программе пригравидарной подготовки женщин, имеющих в анамнезе эпизоды невынашивания беременности, обследование на сенсбилизацию к экзоаллергенам.

3. После подтверждения диагноза «поллиноз» необходимо исследовать уровень ИФН- $\gamma$  и ИЛ-2 (так как они повышают активность НК-клеток), уровни НК-клеток и клеток, несущих CD107a (как маркера дегрануляции НК-клеток).

4. Для женщин в группе риска следует рекомендовать в пригравидарной подготовке базисную неспецифическую гипосенсибилизирующую терапию и сроки зачатия, с учетом того, чтобы в конце I триместра и весь II триместр беременности отсутствовала полинация аэроаллергенов, особенно причинно-значимых («виновных») аллергенов.

#### References

1. Clinical Allergy: a guidance for medical practitioners / edited by R.M. Khatova. M.: MEDpress-inform, 2002. 624 p.
2. Poryadin G.V. Molecular and cellular mechanisms of immunopathology: status of the problem and research perspective: commencement address, 04.14.2008. // Lechebnoe delo. 2008. No. 3. P. 3–13.
3. Barber D.F., Faure M., Long E.O. LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity // J. Immunol. 2004. Vol. 173. P. 3653–3659.
4. Carayannopoulos L.N., Barks J.L., Yokoyama W.M. [et al.]. Murine trophoblast cells induce NK cell interferon-gamma production through KLRK1 // Biol. Reprod. 2010. Vol. 83. P. 404–414.
5. Hu Y., Dutz J.P., MacCalman C.D. [et al.]. Decidual NK cells

- alter *in vitro* first trimester extravillous cytotrophoblast migration: a role for IFN- $\gamma$  // J. Immunol. 2006. Vol. 177. P. 8522–8530.
6. King K., Smith S., Chapman M. [et al.]. Detailed analysis of peripheral blood natural killer (NK) cells in women with recurrent miscarriage // Hum. Reprod. 2010. Vol. 25, No. 1. P. 52–58.
  7. Krzewski K., Strominger J.L. The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses // Curr. Opin. Cell Biol. 2008. Vol. 20, No. 5. P. 597–605.
  8. Mirandola P., Ponti C., Gobbi G. [et al.]. Activated human NK and CD8<sup>+</sup> T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity // Blood. 2004. Vol. 104, No. 8. P. 2418–2424.
  9. Morel E., Bellon T. HLA class I molecules regulate IFN- $\alpha$  production induced in NK cells by target cells, viral products, or immature dendritic cells through the inhibitory receptor ILT2/CD85j // J. Immunol. 2008. Vol. 181. P. 2368–2381.
  10. Quenby S., Nik H., Innes B. et al. Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure // Hum. Reprod. 2009. Vol. 24, No. 1. P. 45–54.
  11. Rajagopalan S., Bryceson Y.T., Kuppusamy S.P. [et al.]. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G // PLoS Biol. 2006. Vol. 4, No. 1. P. 70–86.
  12. Roda-Navarro P., Vales-Gomez M., Chisholm S.E. [et al.]. Transfer of NKG2D and MICB at the cytotoxic NK cell immune synapse correlates with a reduction in NK cell cytotoxic function // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103, No. 30. P. 11258–11263.
  13. Saito S., Shiozaki A., Nakashima A. [et al.]. The role of the immune system in preeclampsia // Mol. Aspects Med. 2007. Vol. 28. P. 192–209.
  14. Tabiasco J., Rabota M., Aguerre-Girr M. [et al.]. Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties // Placenta. 2006. Vol. 27. P. S34–S39.
  15. Wu X., Jin L.P., Yuan M.M. [et al.]. Human first-trimester trophoblast cells recruit CD56 bright CD16 – NK cells into decidua by way of expressing and secreting of CXCL12/stromal cell-derived factor 1 // J. Immunol. 2005. Vol. 175. P. 61–68.

Поступила в редакцию 12.07.2016.

#### IMMUNE MECHANISMS OF MISCARRIAGE AND INFERTILITY AT POLLINOSIS AND POSSIBLE WAYS OF THEIR CORRECTION

G.I. Tsyvkina, N.V. Grigoreva, G.A. Lutsenko, O.V. Petrova  
Regional Clinical Center of Modern Medical Care (30/37 Ubovichcha St. Vladivostok 690000 Russian Federation)

**Objective.** Immune mechanisms involved in the pathogenesis of recurrent miscarriage and infertility.

Despite the fact that fetal cells carry antigens of both mother and father, there is 'an immunological paradox' of pregnancy associated with the occurrence of immunological tolerance.

**Methods.** The object of study – 22 women with pollinosis who had episodes of miscarriage in the medical history and 31 women with pollinosis, but without a burdened obstetric history (control group – 20 women without aggravated allergic and obstetric history).

**Results.** Changes in immunological parameters in patients with pollinosis had a similar clinical picture. However, in the group with recurrent miscarriage noted high activity of NK-cells with a cytotoxic phenotype. In women without the burdened obstetric history NK-cells were defined within the normal range during pregnancy and changed their phenotype to immunosuppressive one.

**Conclusions.** A preconception period program in women having had episodes of miscarriage in their medical history should cover the pollinosis screening, and in women with detected pollinosis should detect the NK-cells levels and cytotoxic T lymphocytes assessing their functional activity.

**Keywords:** true killers, T lymphocytes, allergy, placenta.