

Lek. Izabela Sardecka-Milewska

Tytuł pracy: „Ocena wpływu wybranych dietetycznych czynników immunomodulujących na nabywanie tolerancji u dzieci z alergią na białka mleka krowiego do 2 roku życia.”

WSTĘP

Pierwszą manifestacją chorób alergicznych jest zazwyczaj alergia na pokarmy (AP), którą określa się jako defekt nabywania naturalnej tolerancji na alergeny pokarmowe. Kluczową jej postacią jest alergia na białka mleka krowiego (ABMK), której częstość w wieku niemowlęcym wynosi 0,3 - 7,5%. Oprócz szerokiego rozpowszechnienia, badania wskazują na wzrost częstości jej występowania. Jednocześnie ABMK stanowi istotny czynnik ryzyka rozwoju alergii na inne alergeny pokarmowe, jak również wziewne oraz zwiększa ryzyko ujawnienia się astmy w późniejszym okresie życia. Jest ważnym czynnikiem anafilaksji. Poznanie czynników, mających wpływ na rozwój choroby, jak również na jej ustępowanie, czyli nabywanie naturalnej tolerancji pokarmowej stanowią wyzwanie współczesnej medycyny. Choć mechanizmy rozwoju tolerancji nie są dokładnie znane, to wiadomo, że na jej patomechanizm mają wpływ zarówno czynniki genetyczne, epigenetyczne, jak i środowiskowe. Narastający trend występowania chorób alergicznych, jak również wydłużanie się czasu nabywania doustnej tolerancji wskazują, iż otaczające nas czynniki środowiskowe nie są optymalne dla rozwoju tolerancji i wskazują na priorytetowe znaczenie badań w tym zakresie.

CEL

Celem pracy była ocena wybranych czynników okołoporodowych oraz środowiskowych na występowanie i przebieg kliniczny ABMK oraz na nabywanie tolerancji doustnej u dzieci do 2 roku życia. Celami dodatkowymi były: analiza fenotypów nabywania tolerancji u dzieci z ABMK, ocena związku tolerancji doustnej z ekspresją genu FOXP3, stężeniem witaminy C i witaminy D w surowicy krwi oraz dietą matki w czasie ciąży.

MATERIAŁ I METODA

Przeprowadzone badanie (publikacja III i IV) było badaniem prospektywnym, dwuetapowym. W I etapie badania wyłoniono 138 dzieci z ABMK, które stanowiły grupę badaną i 101 zdrowych niemowląt bez uczulenia i objawów alergii, stanowiących grupę kontrolną.

Kryteriami włączenia do badania był wiek dziecka do 7 miesiąca życia, ABMK potwierdzona próbą eliminacji i otwartą próbą doustnej prowokacji. Kryteriami wykluczającymi były: nietolerancja laktozy, inne współistniejące zaburzenia, które mogły znacząco wpłynąć na wynik badania. Na tym etapie wśród rodziców/opiekunów prawnych dzieci zostało przeprowadzone badanie kwestionariuszowe obejmujące pytania dotyczące czynników osobniczych ze strony dziecka, jego rodziców oraz czynników środowiskowych, które potencjalnie mogły wpływać na powstanie ABMK oraz pobierano krew celem oceny asIgE, stężenia witaminy D3 25 (OH) i witaminy C oraz ekspresji FOXP3mRNA.

W II etapie badania, po 6 kolejnych miesiącach od pierwszego etapu, tj. przed ukończeniem drugiego roku życia, u dzieci z ABMK oceniano nabycie tolerancji doustnej. W pierwszej kolejności dzieci były poddane próbie prowokacyjnej z produktami mleka po obróbce termicznej. Jeśli uzyskano ujemny wynik prowokacji, czyli dziecko wykazywało tolerancję na alergeny mleka przetworzone termicznie, wykonywano standardową prowokację z nieprzetworzonymi alergenami. W ten sposób wyłoniliśmy 3 podgrupy pacjentów: dzieci z pełną tolerancją alergenów białek mleka krowiego, dzieci z „częściową” tolerancją, czyli tolerujące tylko mleko poddane obróbce termicznej, ale nadal reagujące na mleko nieprzetworzone termicznie oraz dzieci z utrzymującą się ABMK, czyli dzieci z defektem rozwoju tolerancji.

W badaniu, którego efektem jest publikacja V, do grupy badanej zakwalifikowano 51 par matka-niemowlę z ABMK, a do grupy kontrolnej 25 par matka-niemowlę, w analogicznym wieku, bez alergii. Analizy diety dotyczącej dziennego spożycia wybranych składników odżywczych dokonywano retrospektywnie na podstawie 7 dniowego jadłospisu matki z III trymestru ciąży oraz kwestionariusza ankiety własnej konstrukcji bazującego na zwalidowanym arkuszu FFQ (Food Frequency Questionnaire). Do opracowania jadłospisów matek posłużono się programem Dieta 5.D.

WYNIKI

ABMK występowała 3 razy częściej u dzieci z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku alergii (aOR=3,89; 95%CI 2,11-7,17; p<0,001). Ryzyko wystąpienia ABMK u dziecka było prawie trzykrotnie wyższe, jeśli matka miała wykształcenie wyższe (aOR=2,887; 95%CI 1,58-5,25; p<0,001). Dzieci z ABMK były karmione wyłącznie piersią istotnie krócej (Me=2,00; IQR=4,00) niż dzieci z grupy kontrolnej (Me=2,00; IQR=4,50; p=0,014). Ryzyko występowania ABMK było 4 razy większe przy karmieniu sztucznym niż naturalnym (OR=4,233; 95%CI 2,44-7,33; p<0,0001), a 3 razy niższe wśród dzieci posiadających w domu

zwierzęta (aOR=0,266; 95%CI 0,13-0,53; p<0,001). IgE-zależną ABMK rozpoznano u 29 (21%) dzieci, natomiast IgE-niezależną u 109 (79%) dzieci. Połowa dzieci z ABMK IgE-zależną była karmiona piersią przez okres 2 miesięcy (Me=0,00; IQR=2,00), a z IgE-niezależną przez okres 5 miesięcy (Me=2,00; IQR=5,00; p=0,02). Ryzyko wystąpienia ABMK IgE-zależnej w stosunku do IgE-niezależnej było 2 razy większe, gdy rodzina była wielodzietna (OR=2,299; 95%CI 1,00-5,27; p=0,04) i aż 9 razy większe przy występowaniu objawów wielonarządowych (OR=9,219; 95%CI 1,19-71,01; p=0,011). Istotnie wyższe ryzyko wystąpienia ABMK IgE-zależnej odnotowaliśmy u dzieci karmionych sztucznie (OR=21,225; 95%CI 2,78-161,67; p=0,001), a 10 razy mniejsze u karmionych naturalnie (OR=0,05; 95% CI 0,01-0,45; p=0,004).

W 2 etapie badania, na podstawie przeprowadzonych doustnych prób prowokacyjnych wykazano, że 41 (29,7%) dzieci nabyło tolerancję na białka mleka krowiego, 43 (31,2%) dzieci nabyło „częściową” tolerancję, a 54 (39,1%) nadal prezentowało objawy ABMK. Dzieci, które „wyrósł” z ABMK lub osiągnęły „częściową” tolerancję prezentowały pierwsze objawy alergiczne zazwyczaj wcześniej ($2,3 \pm 1,5$ m.ż.) niż dzieci z przetrwałą ABMK, u których pierwsze objawy najczęściej rozwijały się później ($4,1 \pm 1,9$ m.ż.) (p=0,012). Szybsze osiągnięcie tolerancji na mleko dotyczyło także dzieci, które miały objawy jednonarządowe w porównaniu do dzieci z objawami wielonarządowymi (p=0,009). Tylko 6 dzieci z ABMK IgE-zależną (11,5%) nabyło pełną tolerancję na mleko w 2 r.ż. Większość dzieci z IgE-zależną ABMK nie nabyło tolerancji w 2 r.ż., nawet tolerancji „częściowej”. Znacząco więcej dzieci z ABMK IgE-niezależną rozwinęło tolerancję na nieprzetworzone mleko lub mleko poddane obróbce termicznej niż dzieci z ABMK IgE-zależną (p=0,001). Najniższe stężenie asIgE wykazano u dzieci, które tolerowały mleko poddane obróbce termicznej, wyższe u dzieci, które osiągnęły pełną tolerancję, a najwyższe u dzieci nadal prezentujących objawy ABMK (p=0,01; p=0,04). Średni poziom ekspresji FOXP3mRNA w grupie badanej był znacznie niższy niż w grupie kontrolnej ($2,07 \pm 1,23$ vs $2,98 \pm 1,52$; p<0,001). Najniższy poziom ekspresji FOXP3mRNA wykazano u dzieci z utrzymującą się ABMK w drugim roku życia; wyższy u dzieci tolerujących mleko poddane obróbce termicznej, a najwyższy u tych dzieci, które osiągnęły pełną tolerancję, tj. „wyrósł” z alergii; wszystkie wartości były istotnie statystycznie niższe niż wartości ekspresji FOXP3mRNA w grupie kontrolnej ($1,50$ vs $2,21$ vs $2,70$ vs $2,98$; p<0,03; p<0,001; p<0,001). Ekspresja FOXP3mRNA była znacząco wyższa w grupie dzieci z ABMK IgE-niezależną w porównaniu do dzieci z ABMK IgE-zależną ($2,25 \pm 1,16$ vs $1,79 \pm 1,29$; p=0,03). Niższe stężenie asIgE było związane z wyższą ekspresją FOXP3mRNA ($\rho = -0,344$; p=0,01). Wartość ekspresji FOXP3mRNA poniżej 1,45 u dzieci w 1 r.ż. może wskazywać na ryzyko

utrzymywania się ABMK w 2 r.ż. Średni poziom witaminy D w surowicy w grupie dzieci z ABMK był znacząco niższy niż w grupie kontrolnej ($29,67 \pm 7,09$ ng/ml vs $33,35 \pm 4,13$ ng/ml; $p < 0,001$).

Średnie dzienne spożycie retinolu przez matki dzieci z ABMK było istotnie niższe niż w grupie matek z grupy kontrolnej i wynosiło odpowiednio $375,6$ $\mu\text{g/d}$ vs $543,7$ $\mu\text{g/d}$ ($p = 0,040$). Z kolei spożycie beta-karotenu w grupie badanej było istotnie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej ($p = 0,009$). Średnie stężenie witaminy C w diecie matek dzieci z alergią było wyższe niż w diecie matek potomstwa bez alergii, ale nieistotnie ($p > 0,05$). Spożycie błonnika pokarmowego w obu grupach było porównywalne ($p > 0,05$) i zgodne z rekomendowanymi zaleceniami. Natomiast istotnie więcej folianów spożywały w ciąży kobiety dzieci z ABMK $598,8$ $\mu\text{g/d}$ vs $361,1$ $\mu\text{g/d}$ ($p = 0,001$). W odniesieniu do rekomendacji podaży folianów w grupie matek dzieci bez alergii była niedostateczna, natomiast prawidłowa w diecie matek dzieci z alergią. Spożycie witaminy D w obu grupach było niższe od zalecanych norm, przy czym wartości w grupie badanej były istotnie niższe w porównaniu do grupy kontrolnej, tj. $3,6$ $\mu\text{g/d}$ vs $6,9$ $\mu\text{g/d}$ ($p = 0,038$). Zawartość LC-PUFA w diecie matek z grupy badanej było znacznie poniżej zalecanej normy (45% wartości rekomendowanych), ale u matek dzieci bez ABMK wartości LC-PUFA były również niewystarczające, choć stanowiły już 85% wartości zalecanych; $0,09$ g/d vs $0,18$ g/d odpowiednio ($p = 0,016$). Matki dzieci bez alergii istotnie częściej spożywały ryby ($n = 12,48\%$), w porównaniu z grupą matek dzieci z alergią ($n = 9; 17,6\%$) ($p = 0,007$).

WNIOSKI

Istnieje związek między występowaniem chorób alergicznych w rodzinie, edukacją matki, przebywaniem zwierząt w domu oraz długością karmienia piersią a rozwojem ABMK u dzieci w pierwszym roku życia. Na podstawie oceny poziomu ekspresji FOXP3mRNA można przewidzieć szansę nabycia tolerancji w 2 r.ż. u dzieci z ABMK. Dzieci z ABMK mają niższe stężenie witaminy D w surowicy krwi niż zdrowe dzieci. Dieta kobiety ciężarnej może mieć wpływ na rozwój ABMK u jej potomka. Ocena czynników ryzyka rozwoju ABMK/defektu rozwoju tolerancji wymaga dalszych badań.

INTRODUCTION

The first manifestation of allergic diseases is usually food allergy (FA), which is defined as a defect in the acquisition of natural tolerance to food allergens. It's main form is cow's milk allergy (CMA), which prevalence in infancy is 0.3 – 7.5%. Beside it's widespread, researches indicate it's increased incidence. At the same time, CMA is an important risk factor for the development of allergies to other food allergens, as well as inhaled ones and increases the risk of asthma in later life. It's an important factor in anaphylaxis. Understanding the factors, which influence the development of the disease, as well as it's disappearance, i.e. acquiring natural food tolerance, is a challenge of modern medicine. Although the mechanisms of tolerance development are not exactly known, it is known that its pathomechanism is indicated by both genetic, epigenetic and environmental factors. The growing trend of the occurrence of allergic diseases, as well as the extending in the time the oral tolerance's acquirement indicate that the environmental factors surrounding us are not optimal for the development of tolerance and indicate the priority of research in this area.

OBJECTIVE

The aim of the study was to assess selected perinatal and environmental factors on the occurrence and clinical course of CMA and on acquiring oral tolerance in children up to 2 years old. Additional goals were: analysis of phenotypes of acquiring tolerance in children with CMA, assessment of the relationship between oral tolerance and FOXP3 gene expression, vitamin C and vitamin D concentration in blood serum and mother's diet during pregnancy.

MATERIAL AND METHOD

The study (publication III and IV) was a prospective two-step study. In the first stage of the study, 138 children with CMA were selected, who constituted the study group and 101 healthy infants without allergy and allergy symptoms, constituting the control group. The criteria inclusion in the study were: the child's age before 7 months, CMA confirmed by the elimination diet and an open oral food challenge. Exclusion criteria were: lactose intolerance, other disorders that could significantly affect the result of the study. At this stage, a questionnaire survey was conducted among parents/legal guardians of children, including questions about child's individual factors, it's parents and environmental factors that could potentially affect the occurrence of CMA and blood was collected to assess asIgE, vitamin D3 25 (OH) and vitamin C and FOXP3mRNA expression.

In the second stage of the study, after 6 consecutive months from the first stage, i.e. before the end of the second year of life, the acquisition of oral tolerance was assessed in children with CMA. First, the children were provoked with heated milk products. If a negative challenge was obtained, i.e. the child was tolerant to thermally processed milk allergens, then a standard challenge with unprocessed allergens was performed. In this way, we have selected three subgroups of patients: children with full tolerance to cow's milk, children with "partial" tolerance, i.e. tolerating only heat-treated milk, but still reacting to thermally unprocessed milk, and children with persistent CMA, i.e. children with defected development of tolerance. In the study, the effect of which is publication number V, 51 mother-baby pairs with CMA were the study group, and 25 mother-baby pairs at the same age, without allergies, were the one. Dietary analysis of the daily intake of selected nutrients was made retrospectively on the basis of a 7-day mother's menu from the third trimester of pregnancy and a questionnaire of own design based on a validated FFQ (Food Frequency Questionnaire) sheet. The 5.D. Diet program was used to develop mothers' menus.

RESULTS

CMA was 3 times more common in children with a positive family history of allergies (aOR=3.89; 95%CI 2.11-7.17; $p<0.001$). The risk of child's CMA was almost three times higher if the mother had a university degree (aOR=2.887; 95%CI 1.58-5.25; $p<0.001$). Children with CMA were only breastfed significantly shorter (Me=2.00; IQR=4.00) than children from the control group (Me=2.00; IQR=4.50; $p=0.014$). The risk of CMA was 4 times higher when child was artificially fed than naturally (OR=4.233; 95%CI 2.44-7.33; $p<0.0001$), and 3 times lower among children having pets at home (aOR=0.266; 95%CI 0.13-0.53; $p<0.001$). IgE-dependent CMA was diagnosed in 29 (21%) children, while IgE-independent in 109 (79%) children. Half of children with IgE-dependent CMA were breastfed for 2 months (Me=0.00; IQR=2.00), and with IgE-independent for 5 months (Me=2.00; IQR=5.00; $p=0.02$). The risk of IgE-dependent CMA versus IgE-independent was 2 times higher when the family was large (OR=2.299; 95%CI 1.00-5.27; $p=0.04$) and 9 times higher with multi-organ symptoms (OR=9.219; 95%CI 1.19-71.01; $p=0.011$). A significantly higher risk of developing IgE-dependent CMA was observed in artificially fed children (OR=21.225; 95%CI 2.78-161.67; $p=0.001$), and 10 times lower, when naturally fed (OR=0.05; 95%CI 0.01-0.45; $p=0.004$).

In the second stage of the study, based on oral provocative trials, it was shown that 41 (29.7%) children acquired tolerance to cow's milk, 43 (31.2%) children acquired "partial" tolerance, and 54 (39.1%) still presented CMA symptoms. Children, who "grew" from CMA or reached

"partial" tolerance presented usually earlier the first allergic symptoms (2.3 ± 1.5 months of age) than children with persistent CMA, in whom the first symptoms mostly developed later (4.1 ± 1.9 months) ($p=0.012$). Faster milk tolerance also occurred in children who had single-organ symptoms compared to children with multi-organ ones ($p=0.009$). Only 6 children with IgE-dependent CMA (11.5%) acquired full milk tolerance at the age of 2 years. Most children with IgE-dependent CMA did not acquire tolerance at 2 years of age, not even "partial" tolerance. Significantly more children with IgE-independent CMA developed tolerance to unprocessed milk or heated milk than children with IgE-independent CMA ($p=0.001$). The lowest asIgE concentration was found in children who tolerated heat-treated milk, higher in children who achieved full tolerance, and the highest in children still showing CMA symptoms ($p=0.01$; $p=0.04$). The average level of FOXP3mRNA expression in the study group was significantly lower than in the control group (2.07 ± 1.23 vs 2.98 ± 1.52 , $p<0.001$). The lowest level of FOXP3mRNA expression was found in children with persistent CMA in the second year of life; higher in children who tolerated heat-treated milk, and the highest in those children who have achieved full tolerance, ie "grew" from CMA; all values were statistically significantly lower than the FOXP3mRNA expression values in the control group (1.50 vs 2.21 vs 2.70 vs 2.98 ; $p<0.03$; $p<0.001$; $p<0.001$). FOXP3mRNA expression was significantly higher in the group of children with IgE-independent CMA compared to children with IgE-dependent CMA (2.25 ± 1.16 vs 1.79 ± 1.29 ; $p=0.03$). Lower asIgE concentration was associated with higher FOXP3mRNA expression ($\rho=-0.344$; $p=0.01$). FOXP3mRNA expression was significantly lower in children at 1 year of age may indicate the risk of CMA persisting at 2 years of age The average vitamin D serum level in the group of children with CMA was significantly lower than in the control group (29.67 ± 7.09 ng/ml vs 33.35 ± 4.13 ng/ml, $p<0.001$). The average daily intake of retinol by children with CMA's mothers was significantly lower than among mothers from the control group and was 375.6 $\mu\text{g}/\text{d}$ vs 543.7 $\mu\text{g}/\text{d}$, respectively ($p=0.040$). In turn, beta-carotene intake in the study group was significantly higher compared to the control group ($p=0.009$). The average vitamin C concentration in the diet of children with allergies' mothers was higher than in the diet of offspring without allergies' mothers, but not significantly ($p>0.05$). Dietary fiber intake in both groups was comparable ($p>0.05$) and accordant to recommendations. In contrast, significantly more folates were consumed by pregnant women of children with CMA 598.8 $\mu\text{g}/\text{d}$ vs 361.1 $\mu\text{g}/\text{d}$ ($p=0.001$). In relation to the recommendation, folate supply in the mothers of children without allergies was insufficient, while the correct in the diet of children with allergies' mothers. Vitamin D intake in both groups was lower than the recommended norms, while the values in the study group were significantly lower compared to the control

group, i.e. 3.6 $\mu\text{g/d}$ vs 6.9 $\mu\text{g/d}$ ($p=0.038$). The LC-PUFA content in the study group mother's diet was significantly below the recommended norm (45% of the recommended values), but among mothers of children without CMA the LC-PUFA values were also insufficient, although they already constituted 85% of the recommended values; 0.09 g/d vs 0.18 g/d, respectively ($p=0.016$). Mothers of children without allergies significantly more often ate fish ($n=12.48\%$) compared to mothers of children with allergies ($n=9$; 17.6%) ($p=0.007$).

CONCLUSIONS

There is a relationship between the occurrence of allergic diseases in the family, mother's education, the presence of animals at home and the length of breastfeeding, and the development of CMA in children in the first year of life. Based on the assessment of the expression level of FOXP3mRNA, one can predict the chance of acquiring tolerance at 2 years of age. in children with CMA. Children with CMA have lower vitamin D serum levels than healthy children. The diet of a pregnant woman can affect the development of CMA in her offspring. Assessment of risk factors for CMA development / tolerance acquisition's defect requires further study.