

О.В. Мозирська

Значення поліморфізму тол-подібного рецептора-2 в розвитку сенсibiliзації до кліщів домашнього пилу в дітей із atopічним дерматитом

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

Modern Pediatrics. Ukraine. (2022). 4(124): 60-64. doi 10.15574/SP.2022.124.60

For citation: Mozyrska OV. (2022). The tol-like receptor 2 polymorphism significance for the development of sensitization to house dust mites in children with atopic dermatitis. Modern Pediatrics. Ukraine. 4(124): 60-64. doi 10.15574/SP.2022.124.60.

Atopічний дерматит являє собою хронічне рецидивне запальне захворювання шкіри, яке уражує 5–20% дітей. Повітряні алергени, що походять із кліщів домашнього пилу, можуть викликати atopічний дерматит. TLR2 відіграють важливу роль у розпізнаванні алергенів кліщів домашнього пилу.

Мета — вивчити поширення сенсibiliзації до кліщів домашнього пилу в дітей з atopічним дерматитом; визначити роль поліморфізму TLR2 rs4696480 в обумовленні розвитку чутливості до кліщів домашнього пилу.

Матеріали та методи. Залучено 100 хворих на atopічний дерматит. Генотипування поліморфізму TLR2 rs4696480 проведено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Вимірювання sIgE до пилових кліщів виконано методом Вестерн-блот за протоколом виробника («Simesta-Medivis», Україна-Німеччина).

Результати. Сенсibiliзація до кліщів домашнього пилу відмічалася в 48% дітей. Діти з підвищеним рівнем специфічного IgE до пилових кліщів мали достовірно вищий індекс SCORAD порівняно з хворими без сенсibiliзації ($p < 0,001$). У групі дітей, сенсibiliзованих до кліщів домашнього пилу, відмічалися достовірно вищі показники загального IgE ($p < 0,001$) і триваліший перебіг захворювання ($p < 0,05$). Не виявлено статистично значущої різниці в розподілі генотипів залежно від наявності сенсibiliзації до пилових кліщів (ВШ=1,250 (0,481–3,245) для AA та AT; ВШ=2,125 (0,715–6,315) для AA та TT).

Висновки. Отже, чутливість до пилових кліщів серед дітей з atopічним дерматитом становить 48%. Наявність чутливості до кліщів домашнього пилу впливає на тяжкість захворювання.

Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації. Протокол дослідження ухвалено Локальним етичним комітетом зазначеної в роботі установи. На проведення досліджень отримано інформовану згоду батьків, дітей.

Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів.

Ключові слова: TLR2, кліщі домашнього пилу, atopічний дерматит, діти.

The tol-like receptor 2 polymorphism significance for the development of sensitization to house dust mites in children with atopic dermatitis

O.V. Mozyrska

O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Atopic dermatitis is a chronic recurrent inflammatory skin disease that affects 5–20% of children. Airborne allergens derived from house dust mites can cause atopic dermatitis. TLR2 play an important role in the recognition of house dust mite allergens.

Purpose — to investigate the prevalence of sensitization to house dust mites in children with atopic dermatitis and the role of TLR2 rs4696480 polymorphism in the development of sensitivity to house dust mites.

Materials and methods. The study included 100 patients with atopic dermatitis. Genotyping of the polymorphism TLR2 rs4696480 was performed in the patient group using real-time PCR. Measurements of sIgE to dust mites were performed by Western blotting according to the manufacturer's protocol (Simesta-Medivis, Ukraine-Germany).

Results. Sensitization to house dust mites was found in 48% of children. Children with elevated levels of specific IgE to dust mites had a significantly higher SCORAD index than patients without sensitization ($p < 0,001$). In the group of children sensitized to house dust mites, there were significantly higher levels of total IgE ($p < 0,001$) and a longer course of the disease ($p < 0,05$). There was no statistically significant difference in the distribution of genotypes depending on the presence of sensitization to dust mites (OR=1.250 (0.481–3.245) for AA and AT; OR=2.125 (0.715–6.315) for AA and TT).

Conclusions. This study showed that the susceptibility to dust mites among children with atopic dermatitis is 48%. The presence of susceptibility to house dust mites affects the severity of the disease.

The research was carried out in accordance with the principles of the Helsinki Declaration. The study protocol was approved by the Local ethics committee of the participating institution. The informed consent of the patient was obtained for conducting the studies.

No conflict of interests was declared by the author.

Key words: TLR2, house dust mites, atopic dermatitis, children.

Вступ

Атопічний дерматит (АД) являє собою хронічне рецидивне запальне захворювання шкіри, яке уражує 5–20% педіатричної популяції та 2–8% дорослих, часто починаючи з дитинства [11]. Цей складний розлад, швидше за все, залежить від взаємодії між генетичною схильністю, порушенням шкірно-

го бар'єра, імунною відповіддю та аномальною мікробною колонізацією шкіри [7]. Пацієнти, які страждають на АД, часто мають полісенсibiliзацію до багатьох різних мікробних алергенів та аутоалергенів, у тому числі аероалергенів. Зокрема, повітряні алергени, що походять із кліщів домашнього пилу (КДП), можуть викликати АД. Виявлено, що завдяки ферментативній активності алергени руйнують щіль-

ні з'єднання та погіршують функцію шкірного бар'єра в пацієнтів з АД [1]. Це порушення шкірного бар'єра дає змогу білкам з аероалергенів проникати в епідерміс, презентуватися дендритними клітинами, стимулювати Th2-алергічну системну запальну відповідь і погіршувати тяжкість АД. Активація PAR-2 (рецептора-2, що активується протеїназою) в епідермальних кератиноцитах і дермальних нервах у результаті активності протеази відіграє важливу роль у генерації свербіжних, не пов'язаного з гістаміном, затримці загоєння та відновленні функції шкірного бар'єра і вивільненні цитокінів [1].

Незалежно від сенсibilізації екстракти кліщів можуть індукувати про-Th2 цитокіни IL-25 та IL-33 через активацію передачі сигналів TLR1/6 [6]. Точний механізм, за допомогою якого вплив КДП призводить до погіршення екземи, досі не відомий; проте, коли пацієнтам з екземою проводили аплікаційний тест пластирем з екстрактом КДП, CD4+T-клітини, специфічні для КДП, виявляються на ділянці шкіри, яка має екзематозні ознаки [1]. Показано, що TLR2 відіграють важливу роль у розпізнаванні алергенів КДП. Зокрема, TLR2 стимулює Th2-залежну відповідь на Der p 2 у шкірі, яка не залежала від функціонального TLR4 [10].

TLR2 також може бути активований шляхом розпізнавання Der f 31, алергенів 5, 7, 13, 21 груп, хітину, представленого алергенами КДП з імовірним доменом, що зв'язує хітин [5]. Реакція на КДП-похідний хітин повністю ослаблена в мишей з дефіцитом TLR2, що свідчить про те, що компоненти екзоскелета кліща або продукти життєдіяльності діють прямо або опосередковано через TLR2 [2,8].

Мета дослідження — вивчити поширення сенсibilізації до КДП у дітей, хворих на АД; визначити роль поліморфізму TLR2 rs4696480 в обумовленні розвитку чутливості до КДП.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження виконано за участю 100 хворих з АД (n=100); віком від 6 місяців до 18 років, медіана 6 (3;10), які перебували на обстеженні в алергологічному відділенні Київської міської дитячої клінічної лікарні № 2 та Медичного центру «Алерголог». Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації. Протокол дослідження ухвалено етичною комісією Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, усі пацієнти/батьки хворих дітей дали інформовану згоду на участь.

Діагноз АД встановлено за критеріями Hanifin & Rajka, за анамнезом пацієнта. Клінічні параметри пацієнтів включали вік, стать, вік початку і тривалість захворювання, тяжкість АД, супутні алергічні захворювання, алергологічний анамнез батьків, загальний IgE. Тяжкість АД оцінено за допомогою індексу SCORing AD (SCORAD). SCORAD <25 відповідав легкому АД, SCORAD від 25 до 50 — АД середнього ступеня тяжкості, а SCORAD >50 — тяжкому АД.

Вимірювання sIgE проведено методом Вестерн-блот за протоколом виробника («Simesta-Medivis», Україна-Німеччина). Результати класифіковано за класами: 0 (<0,35 кО/л), 1 (0,35–0,7 кО/л), 2 (0,7–3,5 кО/л), 3 (3,5–17,5 кО/л), 4 (17,5–50 кО/л), 5 (50–100 кО/л) і 6 (100 кО/л). Клас 1 або вище визначено як позитивний.

Виділення ДНК. Забір букального епітелію проведено з використанням букальних щіток із подальшим заморожуванням зразків та їх зберіганням за температури -20°C. ДНК для генотипування екстраговано зі зразків із використанням наборів «NeoPrep 100 DNA» (лабораторія «Неоген», Україна) відповідно до протоколу виробника. Концентрацію ДНК визначено за допомогою «NanoDrop» спектрофотометра «ND1000» (NanoDrop Technologies Inc., США).

Полімеразна ланцюгова реакція. Реакції ампліфікації проведено з використанням «Fast Real-time PCR System» («Applied Biosystems», США), кінцевої реакції обсягом 20 мкл, що містив 2X TaqMan Універсальний Master Mix («Applied Biosystems», США), assay C_27994607_10 і матричну ДНК (5' AAC3 Rev TLR2-R 5' AGCAGTTTATTGTGAGAATGAGTTT 3'). Ампліфікація фрагментів гена складалася зі стадії денатурації за температури 95°C протягом 20 с, а потім 40 циклів ампліфікації за 95°C протягом 3 с і за 60°C — протягом 30 с. Аналіз даних проведено з 7500 Fast Real-Time PCR Software.

Статистичний аналіз. Отримані дані оброблено статистично з використанням «SPSS» (версії 22.0) та програмного середовища «R» (версії 3.0). Для перевірки розподілу частот генотипів згідно із законом розподілу Харді-Вайнберга використано «SNPAnalyzer» (вебпрограма забезпечення). Асоціацію поліморфізму та сенсibilізації до КДП досліджено за допомогою тесту χ^2 та визначення відношення шансів (ВШ) з 95% довірчим інтервалом (ДІ). Відмінність у розподілі генотипів прийнято статистично значущою на рівні $p < 0,05$. U-тест

Демографічні, анамнестичні, клінічні та генотипічні дані пацієнтів з atopічним дерматитом

Параметр	КДП+ n=48 (48%)	КДП- n=52 (52%)	ВШ з 95% ДІ	
Вік (роки), Ме [QI; QIII]	7 [3; 10,5]	5 [2,9; 8]		
Тривалість (роки) АД, Ме [QI; QIII]	7 [2,5; 10]	4 [1; 6,5]		
SCORAD, Ме [QI; QIII]	37,5 [30; 60]	29 [20; 32]		
Загальний IgE (кО/л), Ме [QI; QIII] **	364,5 [140; 756]	43 [15; 112,5]		
Ранній вік початку (до 18 міс), абс. (%)	44 (91,7)	43 (82,7)	2,302 (0,659–8,040)	
Обтяжений сімейний анамнез, абс. (%)	20 (41,7)	16 (30,8)	1,607 (0,706–3,657)	
Супутні алергічні захворювання, абс. (%)	БА	13 (27,1)	6 (11,5)	2,848 (0,984–8,240)
	АР	21 (43,75)	12 (23,1)	2,593 (1,096–6,133)*
	БА+АР	11 (22,9)	2 (3,8)	7,432 (1,553–35,564)*
Стать, абс. (%)	Чол.	26 (54,2)	26 (50,0)	1,182 (0,538–2,594)
	Жін.	22 (45,8)	26 (50,0)	
Генотип	АА	15	12	
	АТ	23	23	1,250 (0,481–3,245)
	ТТ	10	17	2,125 (0,715–6,315)

Примітка: * — статистично значущий результат при $p < 0,05$.

Манна—Уїтні використано для порівняння відмінностей клінічних параметрів у сенсibilізованих і нечутливих до КДП хворих. Статистичну обробку проведено за допомогою програмного забезпечення «EZR» версії 1.32 (графічний інтерфейс «R» (версія 2.13.0).

Результати дослідження та їх обговорення

Сенсibilізація до КДП відмічалася в 48 (48%) дітей (КДП+), у 52 (52%) хворих на АД результат був негативний (КДП-).

Досліджено зв'язок між наявністю чутливості до КДП і клінічними параметрами, такими як ступінь тяжкості АД за шкалою SCORAD, тривалість захворювання, рівень загального IgE, наявність супутніх алергічних захворювань (бронхіальної астми — БА, алергічного риніту — АР), вік і стать.

Діти в порівнюваних групах (КДП+ та КДП-) не різнилися за віком (рис. 1) і статтю (табл.).

sIgE до КДП у хворих на АД був достовірно вищим у дітей із супутнім АР (ВШ=2,593 (1,096–6,133)) та в дітей з обома супутніми алергічними захворюваннями, зокрема, з БА та АР (ВШ=7,432 (1,553–35,564)) (табл.).

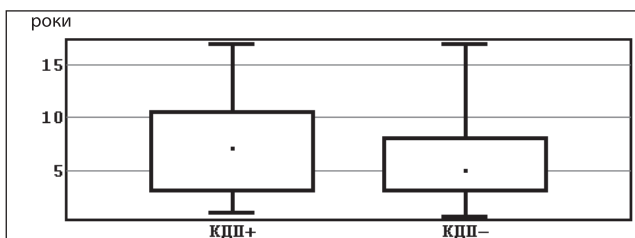


Рис. 1. Вік дітей у порівнюваних групах залежно від наявності sIgE до кліщів домашнього пилу, $p=0,06$

Вивчено значення сенсibilізації до КДП у тяжкості АД. Діти з підвищеним рівнем специфічного IgE до КДП мали достовірно вищий індекс SCORAD порівняно з хворими без сенсibilізації до КДП ($p < 0,001$), (рис. 2).

Група дітей, сенсibilізованих до КДП, достовірно відрізнялася за показниками загального IgE — показники IgE були вищими, ніж у групі хворих, які не мали сенсibilізації ($p < 0,001$), (рис. 3).

При порівнянні показників тривалості захворювання у двох групах дітей з АД виявлено, що діти, сенсibilізовані до КДП, мають триваліший перебіг захворювання порівняно з дітьми, нечутливими до КДП ($p < 0,05$), (рис. 4).

Визначено наявність відмінностей у генотипі rs4696480 в TLR2 у хворих залежно від наявності sIgE до КДП. Серед хворих на АД, які мали сенсibilізацію до КДП, 15 (15,0%) дітей мали генотип АА, 23 (23,0%) були гетерозиготами, 10 (10,0%) мали варіант ТТ. Серед хворих, які не мали sIgE, 12 (12,0%) дітей мали варіант АА, 23 (23,0%) були гетерозиготами, 17 (17,0%) мали генотип ТТ (ВШ=1,250 (0,481–3,245) для АА та АТ, ВШ=2,125 (0,715–6,315) для АА та ТТ). Не виявлено статистично значущої різ-

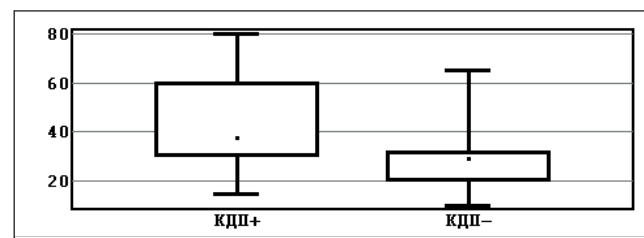


Рис. 2. SCORAD у групах дітей залежно від наявності sIgE до кліщів домашнього пилу, $p < 0,001$

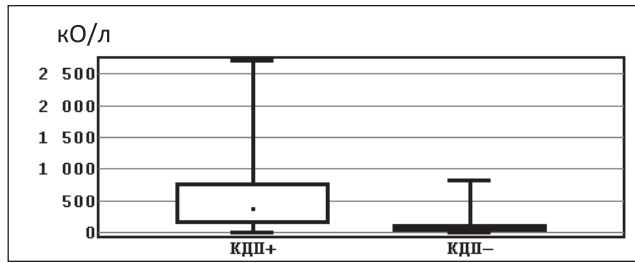


Рис. 3. Загальний IgE в групах дітей, $p < 0,001$

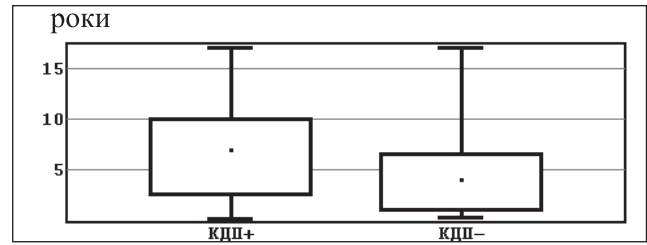


Рис. 4. Тривалість захворювання в групах дітей залежно від наявності sIgE до кліщів домашнього пилу, $p < 0,05$

ниці в розподілі генотипів залежно від наявності сенсibilізації до КДП.

Отже, в дослідженні встановлено, що 48% дітей з АД мали сенсibilізацію до КДП. Діти, чутливі до КДП, мали переважно тяжкий фенотип захворювання, вищі показники загального IgE та довшу тривалість захворювання. Дві групи дітей з АД (із сенсibilізацією до КДП або без неї) не різнилися за віком і статтю, наявністю атопії в анамнезі батьків і раннім початком захворювання.

Епідермальна сенсibilізація до КДП може бути важливою передумовою для прогресування екземи в респіраторну алергію. У дослідженні виявлено, що в групі дітей, чутливих до КДП, достовірно частіше зустрічалася респіраторна алергія — БА та АР.

Чутливість до КДП у хворих на АД попередньо вивчалася з використанням різних методів (шкірні тести, специфічний IgE до екстрактів алергенів або молекулярних компонентів). Унаслідок цього, а також гетерогенності досліджуваних груп результати досліджень суттєво різні. S. Yazici та співавт [13] вивчали сенсibilізацію в групі дітей з АД, АР, БА та кропив'ячкою з використанням шкірних тестів: чутливість до Der f мали 32,7%, а до Der p — 30,4%. У дослідженні Н.М. Ibrahim [4] 44% ($n = 22$) мали позитивні результати сироваткового IgE до екстракту КДП. R. González—Pérez та співавт. [3] виявили у 80 обстежених хворих на АД, що сенсibilізація до мажорних алергенів (Der p 23, Der p 2 і Der p 1) відмічалася у більш ніж 86% усіх суб'єктів, до інших алергенів пилових кліщів (Der p 5, Der p 7 і Der p 21) — у 65%. Дослідження J.A. Wisniewski показало, що поширеність сенсibilізації до КДП у хворих на АД суттєво залежить від віку: серед дітей до 2 років вона становила до 10%, а від 5 років — понад 50% [12]. Також у цьому дослідженні діти з екземою, чутливі до КДП, мали респіраторні алергічні захворювання.

TLR2, як показано, є посередником імунної відповіді на компоненти КДП [9], оскільки презентують їх алергени, зокрема, β -глюкан, хітин та інші. У нашому дослідженні вивчено значення поліморфізму в групі хворих на АД в розвитку сенсibilізації до КДП і не виявлено відмінностей у розподілі генотипів серед дітей, чутливих до КДП та несенсibilізованих. Імовірно, інші механізми відіграють роль у процесі епікутанної сенсibilізації.

Висновки

Виявлено, що чутливість до КДП серед дітей з АД становить 48%. Наявність сенсibilізації до КДП у хворих на АД значним чином обумовлює відмінний фенотип захворювання, що визначається його тяжкістю, тривалішим перебігом, розвитком супутніх респіраторних алергічних захворювань. Це визначає необхідність діагностики такої черешкірної сенсibilізації та застосування персоналізованого підходу до терапії, зокрема, алергенспецифічної імунотерапії препаратами КДП, що може поліпшити курс захворювання. Dectin-1 бере участь у розвитку КДП-індукованого алергічного запалення в шкірі, і поліморфізм rs7309123 гена Dectin-1 може впливати на черезшкірну сенсibilізацію до КДП у пацієнтів з АД, а інгібування сигнальних шляхів Dectin-1 може бути ефективною терапевтичною стратегією.

Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів.

Вдячність

Автор висловлює подяку пацієнтам та їхнім батькам, медичним працівникам алергологічного відділення Київської міської дитячої клінічної лікарні № 2 та медичного центру «Алерголог», Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, сектор «Молекулярна фізіологія».

REFERENCES/ЛІТЕРАТУРА

- Bumbacea RS, Corcea SL, Ali S, Dinica LC, Fanfaret IS, Boda D. (2020). Mite allergy and atopic dermatitis: Is there a clear link? (Review). *Experimental and therapeutic medicine*. 20 (4): 3554–3560. doi: 10.3892/etm.2020.9120.
- Choi JP, Lee SM, Choi HI, Kim MH, Jeon SG, Jang MH, Jee YK, Yang S, Cho YJ, Kim YK. (2016). House Dust Mite-Derived Chitin Enhances Th2 Cell Response to Inhaled Allergens, Mainly via a TNF- α -Dependent Pathway. *Allergy, asthma & immunology research*. 8 (4): 362–374. doi: 10.4168/aaair.2016.8.4.362.
- González-Pérez R, Poza-Guedes P, Pineda F, Castillo M, Sánchez-Machín I. (2021). House Dust Mite Precision Allergy Molecular Diagnosis (PAMD ®) in the Th2-prone Atopic Dermatitis Endotype. *Life (Basel, Switzerland)*. 11 (12): 1418. doi: 10.3390/life11121418.
- Ibrahim HM, El-Taieb MA, Hassan MH, Mohamed A, Kotop EA, Abd-Ellah OH, Hegazy EM. (2020). Relations between vitamin D $_3$, total and specific IgE for house dust mites in atopic dermatitis patients. *Scientific reports*. 10 (1): 21000. doi: 10.1038/s41598-020-77968-1.
- Jacquet A, Robinson C. (2020). Proteolytic, lipidergic and polysaccharide molecular recognition shape innate responses to house dust mite allergens. *Allergy*. 75 (1): 33–53. doi: 10.1111/all.13940.
- Jang YH, Choi JK, Jin M, Choi YA, Ryou ZY, Lee HS, Park PH, Kim SU, Kwon TK, Jang MH, Im SH, Moon SY, Lee WJ, Lee SJ, Kim DW, Kim SH. (2017). 7 House Dust Mite Increases pro-Th2 Cytokines IL-25 and IL-33 via the Activation of TLR1/6 Signaling. *The Journal of investigative dermatology*. 137 (11): 2354–2361. doi: 10.1016/j.jid.2017.03.042.
- Mochulska OM, Chornomydz IB, Horishnyi IM. (2018). Clinical efficacy and immunomodulatory effect of allergen-specific immunotherapy with prolonged course of probiotics at atopic dermatitis in children. *Sovremennaya pediatriya*. 8(96):99–102 [Мочульська ОМ., Чорномидз ІБ., Горішний ІМ. (2018). Сучасна стратегія лікування atopічного дерматиту у дітей (огляд літератури). *Современная педиатрия*. 8(96):99–102]. doi 10.15574/SP.2018.96.99.
- Park KH, Lee J, Lee JY, Lee SC, Sim DW, Shin JU, Park CO, Lee JH, Lee KH, Jeong KY, Park JW. (2018). Sensitization to various minor house dust mite allergens is greater in patients with atopic dermatitis than in those with respiratory allergic disease. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 48 (8): 1050–1058. doi: 10.1111/cea.13164.
- Pulsawat P, Soongrungrong T, Satitsuksanoa P, Le Mignon M, Khemili S, Gilis D, Nony E, Kennedy MW, Jacquet A. (2019). The house dust mite allergen Der p 5 binds lipid ligands and stimulates airway epithelial cells through a TLR2-dependent pathway. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 49 (3): 378–390. doi: 10.1111/cea.13278.
- Stremnitzer C, Manzano-Szalai K, Starkl P, Willensdorfer A, Schrom S, Singer J, Reichart U, Akira S, Jensen-Jarolim E. (2014). Epicutaneously applied Der p 2 induces a strong TH 2-biased antibody response in C57BL/6 mice, independent of functional TLR4. *Allergy*. 69 (6): 741–751. doi: 10.1111/all.12399.
- Volosovets OP, Beketova GV, Berezenko VS, Mityuryaeva IA, Volosovets TN, Pochinok TV. (2021). Dynamics of morbidity and prevalence of atopic dermatitis in children of Ukraine over the past 20 years: medical and environmental aspects. *Pediatrics. Vostochnaia Yevropa*. 9 (2): 206–216. [Волосовец ОП, Бекетова ГВ, Березенко ВС, Митюряева ИА, Волосовец ТН, Починок ТВ. (2021). Динамика заболеваемости и распространенности atopического дерматита у детей Украины за последние 20 лет: медико-экологические аспекты. *Педиатрия. Восточная Европа*. 9 (2): 206–216]. doi: 10.34883/PI.2021.9.2.005.
- Wisniewski JA, Agrawal R, Minniccozzi S, Xin W, Patrie J, Heymann PW, Workman L, Platts-Mills TA, Song TW, Moloney M, Woodfolk JA. (2013). Sensitization to food and inhalant allergens in relation to age and wheeze among children with atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 43 (10): 1160–1170. doi: 10.1111/cea.12169.
- Yazıcı S, Güneş S, Kurtuluş-Çokboz M, Kemer Ö, Baranlı G, Aşık-Akman S, Can D. (2018). Allergen variability and house dust mite sensitivity in pre-school children with allergic complaints. *The Turkish journal of pediatrics*. 60 (1): 41–49. doi: 10.24953/turkped.2018.01.006.

Відомості про авторів:

Мозирська Олена Вікторівна — к.мед.н., доц., доц. каф. педіатрії № 2 НМУ імені О.О. Богомольця. Адреса: м. Київ, вул. А. Навої, 3. <https://orcid.org/0000-0001-9936-8304>.
Стаття надійшла до редакції 11.01.2022 р., прийнята до друку 20.04.2022 р.