

Горбунова И.Л., Вардугина О.К.

## Молекулярно-генетические аспекты резистентности тканей пародонта при воспалении

ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г.Омск

Gorbunova I.L., Vardugina O.K.

### Molecular genetic aspects of tissue resistance in the presence of inflammation of parodontium

#### Резюме

Современный уровень знаний патогенеза патологии пародонта определяет в качестве доминирующей - воспалительную концепцию, как результирующую взаимодействия «инфект-хозяин». Ключевыми молекулами воспаления являются цитокины. Продукция цитокинов закреплена генетически. Экспрессия генов цитокинов начинается в ответ на проникновение в организм патогенов, антигенное раздражение и повреждение тканей. В этой связи выявление генов-кандидатов наследственной предрасположенности, полиморфизм экспрессии которых определяет полиморфизм клинических проявлений, открывает широкие перспективы в изучении генетической детерминации стоматологической патологии воспалительного характера.

**Ключевые слова.** Воспаление, цитокины, патология пародонта, генетическая детерминация

#### Summary

Modern level of knowledge of parodontium pathology pathogenesis defines the concept of inflammation as the dominant one in the result effect "contagium-owner". The key molecules of inflammation are the cytotoxicans. The cytotoxicans response is defined genetically. The cytotoxicans gene expression starts in response to pathogene penetration, antigenic excitation, tissue damage. Therefore the detection of candidate genes of genetic predisposition, expression polymorphism of which defines the clinical implications polymorphism, opens wide perspectives in learning of the genetic determination of dental pathology of phlogistic habit.

**Key words:** Inflammation, cytotoxicans, parodontium pathology, genetic determination

#### Введение

Хронический генерализованный пародонтит протекает согласно общим патологическим механизмам, по которым развивается любое инфекционное воспаление [2;15]. Инициация воспаления в тканях пародонта выглядит следующим образом.

Воздействие повреждающего агента, который по силе и длительности превосходит адаптационные возможности пародонта, приводит к его первичному повреждению (альтерации) [6;4;14]. Чаще всего таким повреждающим агентом являются бактериальные патогены зубных бляшек [10;7]. Действие патогенного микробного фактора проявляется, прежде всего, на клеточных мембранах [11;5]. При этом в клетках происходят функциональные, структурные и метаболические изменения [25]. Часть клеток активируется, в том числе и лизосомы, содержащие реактивные ферменты. Находящийся в наружной мембране грамотрицательных микробных клеток высокоиммуногенные липополисахариды высвобождаются из клеточных мембран, активируются и, связываясь со специальными рецепторами, усугубляют то разрушительное

действие, которое оказал этиологический фактор [28]. CD14 является главным рецепторным белком, реагирующим с липополисахаридами, который взаимодействует с бактериальной клеточной стенкой грамотрицательных бактерий, опознаёт структуру липополисахаридов и активизирует врождённые защитные механизмы клетки [27]. Некоторые клетки, например активированные макрофаги, начинают продуцировать биологически активные вещества – противовоспалительные цитокины, в первую очередь – TNF- $\alpha$ , вовлекая в динамику воспаления иные клетки, как в зоне воспаления, так и вне таковой. Поступая в кровоток, TNF- $\alpha$  начинает регулировать иммунные реакции на системном уровне [21;29]. Выделяясь в окружающую среду, TNF- $\alpha$  распространяется по всему организму, где находит свои мишени. Такими мишенями, в частности, являются костные клетки, лимфоциты, нейтрофилы. На мембранах этих клеток есть специфические рецепторы, благодаря которым TNF- $\alpha$  действует именно на них, а не на другие клетки. Действие TNF- $\alpha$  происходит в самом начале любого инфекционного заболевания и даёт сигнал тем органам, на которых есть соот-

ветствующие рецепторы, включиться в воспалительный процесс. Наступает стадия вторичной альтерации. Макрофагоколонистимулирующий фактор c-fms определяет дифференцировку, пролиферацию и выживаемость клеток моноцит/макрофагального звена и, таким образом, вовлечён в формирование неспецифического иммунитета [19;12;13;26]. При хроническом генерализованном пародонтите фактор роста макрофагальных клеток c-fms участвует в дифференцировке остеокластов [17;18].

Вместе с тем в патогенезе заболевания отмечается определённая специфика, обусловленная анатомическими, физиологическими, гистологическими и функциональными свойствами органов и тканей полости рта [6;11;10].

Факторы локальной тканевой резистентности полости рта находятся под контролем ряда защитных механизмов, способных ограничить бактериальную инвазию и/или её поражающее действие на ткани пародонта [22;23]. Уровни тканевой реактивности закреплены генетически, следовательно, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию факторов неспецифической резистентности (рецепторов, сорбирующих бактерии, системы макрофагальных клеток, цитокинов и рецепторов к цитокинам) [3].

**Цель исследования.** Установление молекулярных механизмов регуляции воспалительного ответа при хроническом генерализованном пародонтите, путём выявления ассоциаций между вариантами аллелей генов регуляторных молекул, реализующих свою активность на начальных этапах воспаления, и клиническим проявлением патологии, обуславливая характер протекания защитных реакций.

## Материалы и методы

В соответствии с поставленной целью было проведено углублённое клинико-лабораторное обследование лиц обоего пола в возрасте 17-75 лет, больных хроническим генерализованным пародонтитом различной степени тяжести в стадии ремиссии. Рандомизация обследуемых по возрастным группам осуществлялась согласно Международной статистической классификации возрастов человека, рекомендованной Европейским региональным бюро Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) для международных сравнений 10-го пересмотра по распределению обследованного контингента в медико-биологических исследованиях [16].

Исследовательскую когорту составили 194 человека, из которых 100 мужчин и 94 женщины, средний возраст  $36 \pm 4,8$  лет [20]. Предварительно у всех было получено письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Необходимый объём выборки рассчитывали по формуле Lopez-Jimenez et al. [24]:

$$N = \frac{[p_1 \times (100 - p_1)] + [p_2 \times (100 - p_2)] \times 7,9}{(p_2 - p_1)^2}, \text{ где}$$

N – число наблюдений, которое требуется для получения статистически значимых выводов;

p1 – ожидаемое значение основного критерия оценки для группы исследования;

p2 – ожидаемое значение основного критерия оценки для группы сравнения.

Требуемое число наблюдений для получения значимого различия показателей в независимых выборках определяли по формуле:  $n_1, n_2 \geq [(x_1 - x_2)^2]$ . Требуемое число наблюдений для получения значимого различия показателей в связанных выборках определяли по формуле:  $n \geq [t_{052} \times S \Delta x^2] : [(\Delta x)^2]$  [1].

При объективном исследовании воспалительный процесс был классифицирован согласно следующим признакам: гиперемия, отёк, кровоточивость.

Степень тяжести хронического пародонтита определялась: путём измерения глубины пародонтальных карманов по методике А.И. Лампусовой (1980) [8]; путём подсчёта степени резорбции костной ткани (по данным ортопантограммы) с определением критерия Fucsh (1946) [11], путём подсчёта пародонтального индекса (PI) по методике Russel (1956) [8].

Оценку папиллярно-маргинально-альвеолярного индекса (PMA) проводили по Schour E. и Massler J. в модификации Parma C. [8].

Степень индуцированной кровоточивости десны (SBI) после зондирования определялась по методике Mühlemann H.R, Son S. [8].

Популяционный анализ проведён с использованием образцов ДНК, выделенных из венозной крови обследуемых, кровь подвергалась генотипированию, после чего проводился анализ делеционного/инсерционного полиморфизма определяемых генов по полиморфным сайтам.

Статистический анализ полученных клинических и лабораторных данных выполняли с использованием ППП «STATISTICA 6.0» и SPSS 11.5 for Windows. Проверку нормальности распределения случайной величины проводили в модуле Basic Statistics программы Statistica 6.0. Проверка гипотезы о различии в независимых выборках осуществлялась по критерию Вальда-Вольфовица. Если значения показателя подчинялись нормальному закону распределения случайной величины, то использовался параметрический t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферони с использованием программных пакетов статистической обработки данных SPSS 12.0 и StatSoft Statistica 6.0 for Windows. Для расчёта t-критерия в независимых выборках использовалась формула:

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{[(S1^2 \times (n_1 - 1) + (S2^2 \times (n_2 - 1))) / (n_1 + n_2)] : [(n_1 + n_2 - 2) \times n_1 \times n_2]}}$$

Для расчёта t-критерия в связанных выборках использовалась формула:

$$t = \frac{|\Delta x|}{[S \Delta x : \sqrt{n}]}$$

Если значения показателя не подчинялись нормальному закону распределения, то для межгруппового сравнения применялись непараметрические методы. Две независимые выборки сравнивались относительно среднего значения определённого показателя при использовании критерий серии Вальда-Вольфовица (Wald-Wolfowitz runs test), U-критерий Манна-Уитни, H-критерия Краскелла-Уоллиса и двухвыборочного критерия Колмогорова-Смирнова.

Таблица 1. Оценка связи показателей состояния тканевой резистентности полости рта у больных хроническим генерализованным пародонтитом с генотипом T/T гена CD14 C(-260)→T

Сравниваемые показатели	Количество пациентов	Коэффициент Spearman	t (N-2)	Уровень значимости
<b>мужчины</b>				
SBI	69	-0,851389	-13,2859	0,000000
PMA	69	-0,850634	-13,2433	0,000000
<b>женщины</b>				
SBI	66	-0,817109	-11,3392	0,000000
PMA	66	-0,834875	-12,1339	0,000000

Для оценки связи между двумя переменными, вместо обычно вычисляемого коэффициента корреляции Пирсона, в непараметрических методах нами использовались ранговые коэффициенты Спирмена R [9].

## Результаты и обсуждение

Результаты исследования свидетельствуют о клинической информативности полиморфизма экспрессии гена CD14 C(-260)→T в формировании генетической предрасположенности к пародонтиту определённой степени тяжести у больных различного пола и возраста. При разделении больных хроническим генерализованным пародонтитом по степени тяжести воспаления в пародонте во всех трёх группах (лёгкая степень пародонтита; средняя степень тяжести пародонтита и тяжёлая степень пародонтита) отмечается значительное увеличение частоты гомозиготного по дикому аллелю генотипа C/C гена CD14 в сравнении с популяционными выборками ( $p < 0,001$ ). Возможно, что ассоциация C/C гена CD14, способна гетеродимеризоваться с рецептором T/T гена CD14 в макрофагах или других клетках эпителия прикрепления десневой борозды, что позволяет ему инициировать передачу специфического сигнала при стимуляции клетки одними лигандами и, наоборот, делает рецептор C/C CD14 восприимчивым к другим лигандам. В этой связи можно предполагать, что значительная часть случаев пародонтита в обследованной популяции ассоциирована с генотипом C/C гена CD14.

При установлении взаимосвязи между одноимёнными показателями, характеризующими локальную резистентность полости рта, больных хроническим генерализованным пародонтитом сильная и статистически значимая корреляционная связь отмечалась между индексами SBI и PMA (табл.1). При этом все пациенты были гомозиготными по мутантному аллелю, то есть имели значимое ( $p < 0,01$ ) повышение частот генотипа T/T.

При генотипировании обследованных пациентов по гену TNF- $\alpha$  в позиции -308 у больных хроническим генерализованным пародонтитом отмечается статистически значимое увеличение частоты генотипа A/G по отношению к частоте A/G в популяции (табл.2). В результате проведённого исследования была показана значительная

связь у гетерозиготных по гену TNF- $\alpha$  больных хроническим генерализованным пародонтитом с некоторыми показателями тканевой резистентности полости рта. Так, отмечалась статистически значимая ( $p < 0,001$ ) корреляционная связь между показателями PI и PMA; PI и КП; PI и SBI.

Получены статистически значимые данные о наличии ассоциаций между продукцией цитокина TNF- $\alpha$  (A/A, G/A, G/G) при G(-308)→A и степенью тяжести хронического генерализованного пародонтита. Установлено, что частоты изученных аллелей промоторного участка гена различаются в зависимости от значений индекса PI по Russel, отмечается статистически значимое ( $p = 0,05$ ) влияние данных полиморфизмов на степень тяжести пародонтита.

Кроме этого нами были оценены частоты встречаемости аллельных вариантов полиморфизма гена c-fms del425 и 3'UTR среди больных хроническим генерализованным пародонтитом различной степени тяжести. При определении полиморфизма гена 3'UTR и (del425) гена c-fms у больных хроническим генерализованным пародонтитом частоты гаплотипов находятся в равновесии Харди-Вайнберга и не имеют статистически значимых отличий. Частота встречаемости более редкого аллеля по полиморфному сайту в 3'-нетранслируемой области гена c-fms колеблется в пределах 19,08%-37,26% у больных с лёгкой степенью пародонтита; 30,87%-39,93% - у больных пародонтитом средней степени тяжести и 42,07%-54,01% - у больных с тяжёлой степенью пародонтита. Встречаемость менее распространённого варианта полиморфизма гена c-fms, локализованного в 11-м интроне ( $\Delta 425$ ), также высока у данных категорий обследуемых и составляет 30,88%-41,06% у больных пародонтитом лёгкой степени; 14,93%-27,07% - у больных пародонтитом средней тяжести и 19,03%-31,49% у больных тяжёлыми формами пародонтита. При этом различия в частотах гаплотипов гена c-fms у больных хроническим генерализованным пародонтитом с различными степенями течения воспалительного процесса в пародонте высоко статистически значимы ( $p < 0,001$ ).

Установлено, что глубина пародонтальных карманов в обследованной группе больных пародонти-

Таблица 2. Частоты генотипов и аллелей полиморфизма гена TNF- $\alpha$  у больных хроническим генерализованным пародонтитом

Категория пациентов	Ген	Генотип	Группы обследуемых	Частота аллели, % (численность)		Всего
				Мужчины	Женщины	
Больные хроническим генерализованным пародонтитом	TNF- $\alpha$	A/A	Количество	41	7	48
			Частота аллели с учётом пола	88,1%	61,9%	100,0%
			Частота аллели в популяции	89,3%	60,0%	74,1%
		A/G	Количество	5	16	21
			Частота аллели с учётом пола	21,4%	78,6%	100,0%
			Частота аллели в популяции	10,7%	36,7%	24,1%
	G/G	Количество	0	21	21	
		Частота аллели с учётом пола	0%	100,0%	100,0%	
		Частота аллели в популяции	0%	3,3%	1,7%	

том определяется генотипом пациента. Увеличение глубины пародонтальных карманов при изначальной их глубине  $\pm$  3мм среди гетерозигот (C/T) и гомозигот (C/C) произошло в 36,8 $\pm$ 18,9% и 21,5 $\pm$ 17,1% случаев соответственно. Ассоциации между характером распределением вариантов генотипов и аллелей других изучаемых нами генов (TNF- $\alpha$  и CD14) с индексом, характеризующим глубину пародонтальных карманов, менее информативны.

При сравнении значений индекса кровоточивости SBI по Mühlemann, Son в динамике исследования было зафиксировано снижение значений данного показателя, причём уровень снижения был одинаков у всех изучаемых генотипов по двум генам, регулирующим реакцию воспаления - TNF- $\alpha$  и c-fms, и составил в среднем 22,5 $\pm$ 2,2 %.

**Заключение**

Результаты проведённого исследования убедительно доказывают, что изучаемые полиморфизмы генов,

регулирующие воспалительную реакцию, CD14 (C/C, C/T, T/T) при C(-260) $\rightarrow$ T, TNF- $\alpha$  (A/A, G/A, G/G) при G(-308) $\rightarrow$ A и c-fms (3' UTR TC $\rightarrow$ CA) и (del425) посредством влияния на показатели тканевой резистентности полости рта ассоциированы с индивидуальной потенциальной вероятностью развития (прогрессирования) пародонтита, что доказывается ухудшением значений таких клинических показателей, как глубина пародонтальных карманов и степень индуцированной кровоточивости десны, которые наиболее полно отражают процесс воспаления в тканях пародонта.

Исходя из результатов исследования, можно сделать вывод о том, что существует тесная взаимосвязь между генетическим статусом пациента и развитием пародонтита, а также особенностями его течения. В этой связи, изучение ассоциаций выбранных полиморфизмов генов, регулирующих реакцию воспаления, с клинико-морфологическими показателями тканевой резистентности пародонта перспективно для оценки в клинической практике генетических маркеров пародонтита.■

**Горбунова И.Л.**, доктор медицинских наук, ассистент кафедры терапевтической стоматологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» МЗ РФ **Вардугина О.К.** клинический ординатор кафедры терапевтической стоматологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» МЗ РФ. Адрес для переписки: 644029, г.Омск ул.Малунцева 13-7, тел. +79835666908, e-mail: fedotovaok00@mail.ru

## Литература:

1. Власов В.В. Введение в доказательную медицину / В.В. Власов. – М.: Медиа Сфера, 2001. – 329 с.
2. Воспаление пародонта (этиология, патогенез, принципы лечения) / под ред. А.И. Воложина, Д.Н. Маянского. – М., 1996. – 111 с.
3. Выявление генетической предрасположенности к болезням пародонта. (Detecting genetic predisposition to periodontal disease.) : Пат. 5686246 США, МПК6 C12Q 1/68, C12P 19/34 / S. Kornman Kenneth, W. Duff Gordon - №510 696.
4. Григорьян А.С. Болезни пародонта / А.С. Григорьян [и др.]. – М., 2004. – 287 с.
5. Григорьян А.С. Ключевые звенья патогенеза заболеваний пародонта в свете данных цитоморфометрического метода исследований / А.С. Григорьян, А.И. Грудянов // Стоматология. – 2001. - №1. – С.5-8.
6. Грудянов А.И. Пародонтология. Избранные лекции / А.И. Грудянов. – М., 1997. – 32 с.
7. Дмитриева Л.А. Современные аспекты клинической пародонтологии / Л.А. Дмитриева. – М., 2001. – 125 с.
8. Дунызина Т.М. Современные методы диагностики заболеваний пародонта / Т.М. Дунызина, Н.М. Калинина, И.Д. Никифорова – Санкт-Петербург. - 2001. – 48 с.
9. Зайцев В.М. Прикладная медицинская статистика / В.М. Зайцев, В.Г. Лифляндский, В.И. Маринкин. – СПб.: ООО Изд-во Фолиант, 2003. – 432 с.
10. Иванов В.С. Заболевания пародонта / В.С. Иванов. – М., 1998. – 294 с.
11. Канканян А.П. Болезни пародонта (новые подходы в этиологии, патогенезе, диагностике, профилактике и лечении) / А.П. Канканян, В.К. Леонтьев. – Ереван, 1998. – 358 с.
12. Кузнецова Т.Н. Делеционный полиморфизм 11-го интрона гена *c-fms* человека: частоты аллелей в некоторых популяциях России и возможная функциональная значимость / Т.Н. Кузнецова [и др.]. // Генетика. – 2004. – Т.40. - №1. – С.102-112.
13. Кузнецова Т.Н. Полиморфизмы экспрессирующихся в макрофагах генов *c-fms* и *scr5*: частотные распределения аллелей и генотипов в некоторых этнических группах северной Азии // Т.Н. Кузнецова [и др.]. // Сборник научных статей «Генофонд населения Сибири». – Новосибирск. – 2003. – С.44-49.
14. Ласкарис Дж. Атлас по пародонтологии. Проявления местных и системных поражений / Дж. Ласкарис, К. Скалли // Пер. с англ. под ред. А.И. Грудянова. – М., 2005. – 347 с.
15. Логинова Н.К. Патофизиология пародонта / Н.К. Логинова, А.И. Воложин. – Москва, 1993. – 80 с.
16. Международная классификация стоматологических болезней на основе МКБ-10. - 3-е изд. – Женева: ВОЗ, 1997. – 247 с.
17. Обнаружение двух полиморфных сайтов в гене *c-fms* человека: частоты аллелей и генотипов в некоторых популяциях России / А.Г. Ромащенко [и др.] // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 1. – С. 33-40.
18. Почтаренко В.А. Влияние ФИММ и ТИМП-3 генного полиморфизма на развитие пародонтита / В.А. Почтаренко, О.О. Янушевич, К. Приор // Пародонтология. – 2006. – № 1 (38). – С. 8-13.
19. Ромащенко А.Г. Генотипирование полиморфного сайта гена *the c-fms* в популяциях человека: обнаружение связи гена с реакцией человека на факторы окружающей среды / А.Г. Ромащенко [и др.] // II Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров «Отдалённые последствия, мутагенез, канцерогенез: закономерности, механизмы. – Санкт-Петербург. - 2000. – Т.2. – С.206.
20. Флетчер Р. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины / Р. Флетчер, С. Флетчер, Э. Вагнер // Пер с англ. – М., 1998. – 352 с.
21. Хитров Н.К. Медиаторы воспаления / Н.К. Хитров // Воспаление. – М. – 1995. – 225 с.
22. Lee H.J. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis / H.J. Lee [et al.] // J. Periodontal Res. – 1995. – 30: P.23-33.
23. Lee H.J. The subgingival microflora and gingival crevicular cytokines in refractory periodontitis / H.J. Lee [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 1994. – 21: 118-27.
24. Lopez-Jimenez F. Problems and solutions in the interpretation of diagnostic tests / F. Lopez-Jimenez, L.E. Rohde, M.A. Luna-Jimenez // Rev. Invest. Clin. – 1998. – Vol. 50 (1). – P.65-72.
25. Page R.C. Critical issues in periodontal research / R.C. Page // J. Dent. Res. – 1995. – 74: 1118-28.
26. Romaschenko A.G. The allelic states of two polymorphic sites of the *c-fms* gene in human population of Eurasia / A.G. Romaschenko [et al.] // Biodiversity and dynamics of ecosystems in North Eurasia. – P.4. – 2001. – V.1. – P. 171-173.
27. Unkelbach K. A New Promoter Polymorphism in the Gene of Lipopolysaccharide Receptor CD14 Is Associated With Expired Myocardial Infarction With Low Atherosclerotic Risk Profile / K. Unkelbach [et al.] // J. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1999. – P.932-938.
28. Van Dyke T.E. New agents in the chemical control of plaque and gingivitis – reaction paper / T.E. Van Dyke // J. Dent. Res. – 1992. – 71: 1457-8.
29. Warzocha K. Genetic Polymorphisms in the Tumor Necrosis Factor Locus Influence Non-Hodkin Lymphoma Outcome / K. Warzocha [et al.] // Blood. – 1998. – Vol. 91. - №10. – P.3574-3581.