

Саркисян Н.Г.<sup>1,2,4</sup>, Ронь Г.И.<sup>1</sup>, Тузанкина И.А.<sup>2,4</sup>, Свитич О.А.<sup>3</sup>, Ганковская Л.В.<sup>3</sup>, Долгих М.А.<sup>1</sup>

## Генетические критерии диагностики пародонтита

1. Кафедра терапевтической стоматологии ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет Минздрав России, г. Екатеринбург; 2. ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уро РАН, г. Екатеринбург; 3. Кафедра иммунологии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.Н. Пирогова, 4. Уральский Федеральный Университет имени Б.Н. Ельцина.

Sargsyan N.G., Ron G.I., Tuzankina I.A., Svitich O.A., Gankovskaya L.V., long M.A.

## Genetic diagnostic criteria for periodontitis

### Резюме

В статье проводится оценка результатов определения полиморфизма генов DEF-44, DEF-20, IL-10, TNF, TLR2\_753, TLR2\_677 у пациентов, больных хроническим генерализованным пародонтитом. Определена взаимосвязь наличия ЛОР патологии и возникновения заболеваний пародонта при высокой вероятности полиморфизма генов DEF-44 и TLR-2.

Ключевые слова: пародонтит, диагностика, гены, полиморфизм

### Summary

The article assesses the results of the determination of gene polymorphism DEF-44, DEF-20, IL-10, TNF, TLR2\_753, TLR2\_677 in patients with chronic generalized periodontitis. The correlation presence of ENT diseases and the emergence of periodontal disease with a high probability of gene polymorphism DEF-44 and TLR-2.

**Key words:** periodontal disease, diagnostics, gene, polymorphism

### Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, интактный пародонт встречается лишь в 2-10% наблюдений, а распространенность заболеваний пародонта различной степени тяжести составляет более 90% у взрослого населения. Для наиболее полного использования новых диагностических возможностей необходимо обеспечение самого тесного взаимодействия научных исследователей в разных областях знаний с практикующими врачами, гармоничной интеграции новых технологий и подходов в существующую клиническую практику, что позволит повысить эффективность лечения распространенных заболеваний [1]. Болезни пародонта являются фактором, негативно влияющим на разные системы организма человека: пищеварительную, центральная нервную систему, иммунная, сердечно-сосудистую и др., индуцируя системную воспалительную реакцию. Это широкая общемедицинская проблема [2,3] разработкой которой занимаются специалисты различного профиля, в том числе стоматологов [4,5,6].

Распространено мнение о том, что между возникновением хронических очагов одонтогенной и пародонтопатогенной инфекции (практически у 100% больных наблюдается генерализованный пародонтит с выраженной воспалительной реакцией) и заболеваниями внутренних органов, в том числе ЛОР, существует тесное патогенетическое единство, обусловленное обоюдными причинно-

следственными взаимоотношениями, опосредованными иммунологическим дисбалансом, нарушением интерлейкиновой регуляции, свободно-радикальным повреждением органов и тканей, неполноценностью организма [7]. Наличие хронических очагов инфекции в челюстно-лицевой области при генерализованных воспалительных заболеваниях пародонта сопряжено с формированием вторичных иммунодефицитных состояний на фоне патологической активации свободно-радикального окисления липидов, белков, низкомолекулярных тиолов, сохраняющейся и при клинической ремиссии очаговой инфекции [8].

Возникновение пародонтита у членов одной семьи позволяет предположить, что генетические факторы играют важную роль в развитии данной патологии [9]. Несмотря на большое количество исследований, посвященных оценке генетически детерминированных рисков развития хронических заболеваний пародонта, до настоящего времени не выявлено определенной взаимосвязи между конкретными генетическими маркерами и развитием заболевания. Заболевания пародонта прогрессируют у пациентов молодого возраста, что вызывает особый интерес генетических детерминант, предполагающих характер развития заболевания. Патогенез и клинические проявления хронического генерализованного пародонтита, особенно на фоне соматической патологии, представлены взаимообусловленными процессами, в которые

вовлечены не только «местные» факторы, но и разнообразные соматические заболевания [10].

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).

Учитывая актуальность поиска генетических маркеров заболеваний пародонта, патогенетической взаимосвязи, с особенностями экспрессии различных генов, возникает необходимость углубленного изучения генетических параметров, взаимосвязанных с развитием пародонтита.

**Цель исследования:** оценка роли полиморфизма генов DEF-44, DEF-20, IL-10, TNF, TLR2\_753, TLR2\_677 в развитии хронического генерализованного пародонтита у представителей уральского региона (европеоидной расы).

## Материалы и методы

В исследовании приняли участие 142 пациента, среди них 57 мужчины и 85 женщины в возрасте от 35 до 55 лет. Все пациенты были поделены на три клинические группы: группа пациентов с пародонтитом, группа сравнения 1 - с частыми воспалительными заболеваниями ЛОР-органов и группа сравнения 2 — доноры без ЛОР патологии. В группе сравнения 1 по расширенному сбору анамнеза жизни выявлено наличие воспалительной патологии ЛОР-органов (гайморит, тонзиллит, ларингит, этмоидит, отит, трахеит, фарингит). Проведено комплексное стоматологическое обследование на базе частной стоматологической клиники г. Екатеринбурга, которое включало: заполнение амбулаторной карты формы 043У, сбор жалоб, анамнеза жизни, заболевания, осмотра с индексной оценкой гигиенического состояния полости рта, забор генетического материала. Предварительно пациенты давали информированное согласие на проведение исследования. Нами был разработан опросник для специалистов [11], в том числе и стоматологов, в котором учитывались аспекты общего состояния организма, перенесенные заболевания, характер и сроки течения различных заболеваний. Для исследования были сопоставлены данные опросника и результат генетического исследования.

Для получения генетического материала проводился соскоб эпителиальных клеток из ротовой полости. Анализ материала выполнен на базе кафедры иммунологии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.Н. Пирогова. Для молекулярно-генетического исследования были выбраны такие факторы врожденного иммунитета, как DEFB1, IL-10, TNFA и TLR2.

Для оценки полиморфизмов из эпителиальных клеток была выделена геномная ДНК с использованием наборов «К-сорб» (Синтол, РФ). Выделение нуклеиновой кислоты проводили строго в соответствии с инструкции фирмы – производителя. Полученные образцы ДНК хранили при температуре минус 70°С. Далее проводили по-

лимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для приготовления ПЦР-смеси в реакциях использовали Hot Start Taq DNA Polymerase (Синтол, РФ) а также наборы «Набор реактивов для проведения ПЦР-РВ» (Синтол, РФ). Реакцию для оценки полиморфных маркеров проводили на приборах RotorGene («QIAGEN», Германия), ДТ-96 («ДНК-технология», Россия) и PikoReal 96 («ThermoScientific», США). Праймеры, задействованные в работе с генетическими маркерами, были созданы с помощью программы Vector NTI 8.0 и синтезированы фирмой Синтол (РФ). Системы для проведения ПЦР-РВ для определения исследуемых полиморфизмов были разработаны ранее на кафедре иммунологии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова [12,13,14].

ПЦР-РВ для оценки полиморфных маркеров (-308G/A) в гене TNFA и (-1082 A/G) в гене IL-10. Реакционная смесь состояла из компонентов «Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» (Синтол, Россия): 1xBuffer+SYBR (1,5 мкл), 2,5 мМ dNTP (1,5 мкл), 25 мМ MgCl2 (1,5 мкл), 5 ед/мкл Taq-ДНК-полимераза (0,3 мкл), Праймер прямой\* 1 ОЕ/мл (1 мкл), Праймер обратный\* 1 ОЕ/мл (1 мкл). Общий объем смеси составлял 12 мкл, образца – 3 мкл (50-500 нг). Реакция проводилась на амплификаторе ДТ-96 («ДНК-технология», Россия) по следующей программе: 94°С – 2 мин; (94°С – 30 сек, 61°С – 1 мин, 72°С – 1 мин) 40 циклов; плавление (100 циклов - 90°С – 15 сек.). В результате реакции получали кривые зависимости уровня флуоресценции от циклов амплификации. Рост кривой ассоциировался с накоплением ПЦР-продукта в пробирке. Высокий уровень флуоресценции в одной из двух пробирок говорил о наличии только одного аллеля – гомозиготное состояние данного маркера. Гетерозиготное состояние маркера наблюдалось в случае высокого уровня флуоресценции по двум пробиркам.

ПЦР-РВ для оценки полиморфных маркеров (-44G/C) и (-20A/G) в гене DEFB1

Для определения полиморфных маркеров (-44G/C) и (-20A/G) в гене DEFB1 использовали технологию TaqMan-зондов [15]. ПЦР в режиме реального времени проводили на приборах ДТ-96 («ДНК-Технология», РФ) и RotorGene («QIAGEN», Германия) с использованием «Набора для проведения ПЦР-РВ» («Синтол», Россия). ПЦР-смесь готовили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Программа проведения реакции ПЦР-РВ: 95оС - 10 мин, (94оС - 15 сек, 62оС - 30 сек) 40 циклов. Последовательности праймеров и системы для детекции данных маркеров были отработаны ранее на кафедре иммунологии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова [21].

ПЦР-РВ для оценки полиморфных маркеров Arg753Gln и Arg677Trp в гене TLR2

Для проведения ПЦР-РВ использовали реактивы из «Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» (Синтол, Россия), реакционная смесь готовилась в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Для оценки полиморфных маркеров Arg753Gln и Arg677Ttr в гене TLR2 проводили ПЦР и реакцию рестрикции. При исследовании полиморфных маркеров, локализованных в гене TLR2, был использован подход предложенный Schröder NW с соавторами. ПЦР проводилась на амплификаторе PikoReal 96 («ThermoScientific», США) по следующей программе: 94°C - 5 мин; (94°C - 20 сек, 60°C - 20 сек, 72°C - 40 сек.) 40 циклов, плавление (100 циклов - 90°C - 15 сек.). Далее, для детекции полиморфных маркеров Arg677Ttr и Arg753Gln в гене TLR2 проводили рестрикционный анализ.

Для определения маркеров Arg753Gln и Arg677Ttr в гене TLR2 использовали рестриктазу BspAC1 (Сибэнзим, РФ) - аналог фермента Aci I. Для постановки реакции объемом 30 мкл, использовали 3 мкл 10 X SE-buffer O.1 мкл BspAC1, 18,5 мкл деионизированной воды и 7,5 мкл ПЦР-образца. Далее, полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 2 часов для работы фермента и инактивировали при 65°C в течение 20 минут. Для детекции полученных фрагментов ставилась реакция плавления на амплификаторе PikoReal 96 (Thermo Scientific, США).

Статистическая обработка данных проводилась в программе Microsoft Excel 2007, с использованием статистического пакета «STATISTICA 6.0», а также при использовании формул «Pearson Chi-square» и «M-L Chi-square». Для оценки достоверности различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров применяли критерий  $\chi^2$ . Различия между показателями в группах считались достоверными если  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В разделенных группах исследования: 17 пациентов имеют хронический генерализованный пародонтит, но не имеют ЛОР-патологии в анамнезе. 46 пациентов имеют хронический генерализованный пародонтит и инфекционную патологию (гайморит, тонзиллит, ларингит, этмоидит, отит, трахеит, фарингит), группа сравнения 1. 79 пациентов - без ЛОР-патологии и пародонтита (группа сравнения 2).

В качестве маркеров были выбраны два цитокина: провоспалительный TNF- $\alpha$  и противовоспалительный IL-10, которые являются антагонистами друг друга. Нами проведен сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов полиморфных маркеров TNF- $\alpha$ (-308 G/A) и IL-10(-1082 A/G) в группе пациентов с пародонтитом. Как известно, нарушения в промотерных областях исследуемых цитокинов могут привести к дисбалансу в цитокиновом профиле в ткани пародонта. В качестве одной из групп сравнения была использована группа пациентов с воспалительными заболеваниями ЛОР-органов (гайморит, тонзиллит, ларингит, этмоидит, трахеит, фарингит). Дисбаланс в системе цитокинов может привести к хронической воспалительной патологии, в том числе в верхних дыхательных путях.

При анализе распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера (-308 G/A)TNFA у пациентов основной группы (с пародонтитом) по сравнению с контрольной группой (здоровые доноры) достоверно

чаще встречался генотип AG(0,53 и 0,29, соответственно, OR=2,73) и реже - генотип AA (0,09 и 0,25, соответственно, OR=3,44). Нами не выявлено статистически значимых различий в распределении частот полиморфного маркера (-308 G/A)TNFA в исследуемых группах. Показатели частот аллелей и генотипов в группе пациентов с воспалительными патологиями ЛОР-органов статистически значимо не отличались от показателей в других группах (в группе сравнения 2 - здоровые доноры и в основной группе с пародонтитом).

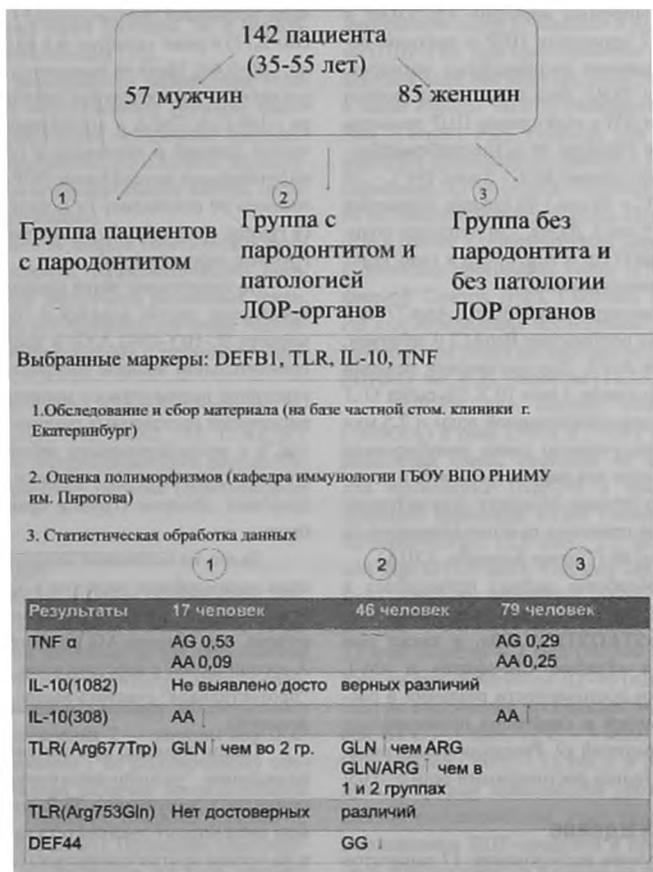
На следующем этапе проводили исследование распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера IL-10 (-1082 A/G) в исследуемых группах. При сравнительном анализе распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера IL-10 (-1082 A/G) статистически достоверных различий в группе с пародонтитом и с воспалительными заболеваниями ЛОР-органов (группа сравнения 1), а также с показателями в группе здоровых доноров (группа сравнения 2) выявлено не было.

Далее, на основании полученных данных по ассоциации полиморфных маркеров в промотерных областях генов цитокинов с риском развития пародонтита, было получено, что генотип AG полиморфного маркера G(-308) A ассоциирован с пародонтитом, а генотип AA - является "протективным" (частота выше, чем в группе здоровых доноров).

Таким образом, при изменениях в рецепторе, распознающем условно-патогенную микрофлору, могут привести к нарушению TLR-опосредованным механизмам врожденного иммунитета как в ткани пародонта, так и на уровне других слизистых (слизистых ЛОР-органов). В начале был проведен сравнительный анализ распределений аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg753Gln между группой пациентов с пародонтитом, группой пациентов с воспалительными заболеваниями ЛОР-органов и контрольной группой (здоровые доноры). Полиморфный маркер Arg753Gln локализован в районе TIR-домена TLR2. В группе пациентов с воспалительными заболеваниями ЛОР-органов частота аллеля Gln преобладала над частотой аллеля Arg, а встречаемость генотипа Gln/Arg преобладает над другими генотипами. Следует отметить, что в группе с пародонтитом соотношение частот аллелей и генотипов было сопоставимо с показателями в группе сравнения.

В результате было выявлено, что в группе пациентов с пародонтитом частота аллеля Gln (0,83 и 0,61, OR=3,18) и гомозиготного генотипа Gln/Gln (0,70 и 0,33, OR=4,67) достоверно выше чем в группе пациентов с воспалительными ЛОР-органов. Также, было выявлено, что частота гетерозиготного генотипа Gln/Arg достоверно выше в группе пациентов с воспалительными заболеваниями ЛОР - органов, чем в группе здоровых доноров и в основной группе (0,56 и 0,22, OR= 4,37)

При исследовании распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg677Ttr гена TLR2 группе пациентов с пародонтитом, в группе пациентов с воспалительными заболеваниями ЛОР-органов (группа срав-



**Схема 1. Распределение групп и результаты**

нения 1) и в группе здоровых доноров (группа сравнения 2) обнаружено преобладание частоты аллеля Trp над частотой аллеля Arg, и встречаемости генотипа TrpTrp над встречаемостью генотипов TrpArg и ArgArg во всех исследуемых группах. Отличия распределения аллелей и генотипов в группе пациентов с пародонтитами и в группе здоровых доноров были недостоверны. Однако следует отметить, что у пациентов с воспалительной патологией ЛОР-органов достоверно отсутствовал генотип Arg/Arg и были выявлены статистически значимые отличия в выявлении гетерозиготного варианта генотипа. Так, в группе пациентов с воспалительной патологией ЛОР-органов частота генотипов TrpArg составила 0,5, что достоверно выше чем в основной группе – 0,24.

Анализируя полученные данные по ассоциации полиморфных маркеров в кодирующей области гена TLR2 с пародонтитом и воспалительными заболеваниями ЛОР-органов, нами были выявлены следующие маркеры риска развития пародонтита – аллеля Gln и гомозиготного генотипа Gln/Gln (Arg753Gln в гене TLR2). Показано также, что гетерозиготный генотип TrpArg является протективным в случае пародонтита (Arg677Trp в гене TLR2).

В защите слизистых оболочек (в частности, в ротовой полости) ключевую роль играют противомикробные

пептиды – дефенсины. В настоящей работе проводилось исследование ассоциации полиморфных маркеров в гене дефенсина DEFB1 с риском развития пародонтита, а также с риском развития воспалительной патологии ЛОР-органов. Различия в распределении аллелей полиморфного маркера A(-20)G между исследуемыми группами были статистически недостоверными. Было выявлено, что генотип GG являлся «протективным» относительно группы пациентов с воспалительной патологией ЛОР-органов. Таким образом, можно говорить об отсутствии ассоциации полиморфного маркера A(-20)G гена DEFB1 и пародонтитом.

При исследовании распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера -44C/G (rs1800972) было показано, что во всех группах доминирует аллель С. Показано, что аллель G и генотип GG ассоциированы с воспалительными заболеваниями ЛОР-органов. Соответственно, генотип GG в группе с пародонтитом является «протективным» относительно группы сравнения 1.

Компоненты, исследованные в данной работе были взяты не случайно, они все связаны с иммунопатогенезом пародонтита. Активация распознающих структур врожденного иммунитета TLR2 приводит к выработке эффекторных молекул – цитокинов (TNFα) и противо-

микробных пептидов (HBD-1). В то же время срабатывают механизмы супрессирующие воспаление – IL-10. В качестве групп сравнения были изучены группа здоровых доноров (группа сравнения 2) и группа пациентов с воспалительными заболеваниями ЛОР-органов (группа сравнения 1). Показано, что маркеры в гене IL-10 не ассоциированы с пародонтитами. В SNP гена TNFα выявлено только два маркера: один ассоциирован с риском развития пародонтита – GA, другой – “протективный” – AA. В генах распознающего рецептора врожденного иммунитета и дефенсина выявлены как маркеры риска развития исследуемой патологии, так и «протективные» маркеры.

## Выводы

Из данного исследования пациентов уральского региона можно сделать выводы о том, что исследуемый полиморфизм генов при хроническом генерализованном заболевании пародонта ассоциирован с инфекционными заболеваниями ЛОР-органов. Полученные результаты дают возможность выявления склонности к пародонтиту и инфекционным заболеваниям. Исследование позволяет рекомендовать проведение генетического анализа на полиморфизм генов DEF-44 (GC, GG, CG, CC); TLR2\_753

(GC, AG, AA) в детском возрасте, что дает нам возможность направленной профилактики.

Материальные затраты на лечение хронического генерализованного пародонтита и ЛОР-органов превосходят затраты на забор и проведение направленного генетического анализа, что обосновывает необходимость его проведения. ■

*Саркисян Н.Г., Кафедра терапевтической стоматологии ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет Минздрав России, г. Екатеринбург; Ронь Г.И., Кафедра терапевтической стоматологии ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет Минздрав России, г. Екатеринбург; Тузанкина И.А., ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уро РАН, г. Екатеринбург, Свитич О.А., Ганковская Л.В., Кафедра иммунологии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, Долгих М.А., Кафедра терапевтической стоматологии ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет Минздрав России, г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку - Саркисян Нарине Гришаевна narine\_25@mail.ru*

## Литература:

1. Samani N.J., Tomaszewski M., Schunkert H. The personal genome – future of personalized medicine? // *Lancet*. - 2010, May 1. - N 375(9725). - P. 1497 – 1498
2. Ценов Л.М. Цитокины как новое направление в иммунокоррекции при воспалительных заболеваниях пародонта (обзор литературы) // *Пародонтология* 1999. Т.11.№1. С 30-32.
3. Loos B.G. Systemic effects of periodontitis // *Int J Dent Hyg*. 2006. Vol.4. Suppl1. P. 34-38.
4. D’Aiuto F., Parkar M., Andreou G., et al. Periodontitis and systemic inflammation: Control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers // *J Dent Res*. 2004. Vol.83. P. 156-160
5. Adiloglu A. K., Ocal A., Can R. et al. Detection of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* DNA in human coronary arteries and evaluation of the results with serologic evidence of inflammation // *Saudi med. J*. 2005. Vol. 26. №7. P. 1068-1074.
6. Kuramitsu H. K., Qi M., Kang I. C. et al. Role for periodontal bacteria in cardiovascular diseases // *Annals of periodontology*. 2001. № 6. P. 41-47.
7. Bullon P., Morillo J. M., Ramirez-Tortosa M. C. et al. Metabolic syndrome and periodontitis: is oxidative stress a common link? // *J. Dent. Res*. 2009. Vol. 88 (6). P. 503-518.
8. Горбачева И. А., Орехова Л. Ю., Сычева Ю. А. и др. Патогенетическая роль воспалительных заболеваний пародонта в формировании полиморбидной патологии // *Мастро стоматологии*. 2013. №2 (50). С. 14-1
9. Факторы наследственности у пациентов с пародонтитом. Саркисян Н.Г., Ронь Г.И. Российский иммунологический журнал. 2013 том 7(16), №2-3. С.178 Zabolevanija parodonta / pod red. prof. Orehovoj L. Yu. – М.: Poli Media Press. 2004. – 432 s.
10. Мирсаева Ф. Э. Экспресс-диагностика заболеваний внутренних органов у больных хроническим генерализованным пародонтитом // *Пародонтология*. 2013. №3 (68). С. 55-58. Mirsaeva F. Z. Jekspress-diagnostika zabolevanij vnutrennih organov u bol'nyh hronicheskim generalizovannym parodontitom // *Parodontologija*. 2013. №3 (68). S. 55-58.
11. Саркисян Н.Г., Ронь Г.И., Тузанкина И.А. «Онтимизация сбора анамнеза жизни при заболеваниях слизистой полости рта». // *Уральский медицинский журнал*. - 2012. - №13. - С.27-31.
12. Ганковская О.А., Исследование ассоциации полиморфных маркеров генов TLR2 и TLR9 с преждевременными родами и внутриутробным инфицированием. *Медицинская иммунология*. - 2010. - Т.12. - №1-2. - С.87-94.
13. Глаз С. Медико-биологическая статистика. - М: Практика, 1999. - 459 С
14. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени. - БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2009. – с. 65-76
15. Свитич О.А., Ганковская Л.В., Рахманова И.В., Зайцева И.А., Ганковский В.А. Ассоциация полиморфных маркеров, локализованных в 5'-нетранслируемой области гена DEFБ1, с гипертрофией аденоидных вегетаций. - *Вестник Российского государственного медицинского университета*. – 2012. - № 3. - С. 59-62.