

Взаимосвязь полиморфизма генов коллагенов COL1A1, COL2A1 и COL3A1 с развитием хронического генерализованного пародонтита у россиян

Зорина О. А., к.м.н., старший научный сотрудник отделения пародонтологии ФГУ «ЦНИИС и ЧЛХ Минздравсоцразвития», г. Москва; **Донников А. Е.**, к.м.н., зам. генерального директора по научно-клинической работе ЗАО «НПФ ДНК-Технология», г. Москва; **Кулаков А. А.**, д.м.н., проф., директор ФГУ «ЦНИИС и ЧЛХ Минздравсоцразвития», зав. отделением имплантологии, г. Москва; **Борискина О. А.**, младший научный сотрудник отделения пародонтологии ФГУ «ЦНИИС и ЧЛХ Минздравсоцразвития», г. Москва; **Ребриков Д. В.**, д.б.н., директор по науке ЗАО «НПФ ДНК-Технология», руководитель ЦКП ОБН РАН «Генетический полиморфизм», г. Москва

Association of collagen COL1A1, COL2A1 and COL3A1 gene polymorphism with chronic periodontitis in Russians

Zorina O.A., Donnikov A.E., Kulakov A.A., Boriskina O.A., Rebrikov D.V.

Резюме

Коллаген составляет основу соединительной ткани, обеспечивает её прочность и эластичность и может играть роль в развитии заболеваний пародонта. Полиморфизм генов коллагенов влияет на уровень транскрипции и структуру кодируемого белка. В данной работе исследована взаимосвязь полиморфизмов COL1A1 -1997 G>T (rs1107946), COL2A1 C>A (rs1635529) и COL3A1 698 A>G (rs1800255) с развитием хронического генерализованного пародонтита у жителей Москвы и Московской области. Установлена ассоциация варианта C полиморфизма COL2A1 C>A (rs1635529) с развитием хронического генерализованного пародонтита.

Ключевые слова: коллаген, полиморфизм, пародонтит

Summary

Collagen is the main protein of connective tissue and may play a role in the development of periodontal disease. COL polymorphisms could alter transcription and function of these proteins. The aim of this study was to investigate COL1A1, COL2A1 and COL3A1 gene polymorphisms (COL1A1 -1997 G>T (rs1107946), COL2A1 C>A (rs1635529) and COL3A1 698 A>G (rs1800255)) in relation to susceptibility to severe chronic generalized periodontitis among the Russians. Our data suggest that COL2A1 C allele is associated with an increased risk for chronic generalized periodontitis in the Russian population.

Keywords: collagen, SNP, periodontitis

Введение

Пародонтит, наравне с другими широко распространенными заболеваниями (такими как сердечно-сосудистые заболевания, диабет и т.п.), относят к комплексным мультифакторным заболеваниям. Как правило, по природе пародонтит представляет собой медленно прогрессирующий и хронический процесс. Возникновение и скорость прогрессии пародонтита является следствием сочетания трёх факторов: состояния пародонтопа-

тогенной микрофлоры, факторов окружающей среды (в том числе таких, как курение и стресс [1]) и индивидуального генетического профиля [2-3].

Роль генетического компонента в развитии хронического пародонтита установлена путем исследования близнецов. Близнецовый метод является одним из стандартных методов изучения генетических аспектов множества заболеваний, в том числе и заболеваний пародонта. Так, Michalowicz с соавторами оценили ряд параметров, связанных с пародонтитом (глубину десневых карманов, десневой индекс и индекс зубного налета) у 110 взрослых близнецов и пришли к выводу, что от 38 до 82% популяционной изменчивости данных параметров являются генетически обусловленными [3].

Существенную роль в развитии пародонтита играет состояние соединительной ткани. Среди генетических факторов, способных оказать влияние на возникновение

Ответственный за ведение переписки -
Ребриков Денис Владимирович,
117587, Москва, Варшавское шоссе, д. 125Ж,
корп. 6, эт. 11, ДНК-Технология,
тел.+7 903 777 24 64,
e-mail: denis@dna-technology.ru

и скорость прогрессии заболевания, можно отметить белки внеклеточного матрикса и ферменты, отвечающие за их синтез или деградацию.

Основным классом ферментов, ответственным за деградацию внеклеточного матрикса, является семейство матриксных металлопротеиназ (ММП), среди которых выделяют желатиназы, коллагеназы и ряд других [4-6]. Несколько выполненных за последнее время работ подтверждают существенную роль матриксных металлопротеаз в развитии, ремоделировании и деструкции соединительной ткани пародонта [7-9]. ММП являются основными игроками в разрушении коллагена при деструкции пародонта [10-13]. Высокое содержание ММП в тканях пародонта приводит к дисбалансу между продукцией и деградацией коллагена, вызывая в итоге потерю зуба [14, 15].

Коллагены составляют основу соединительной ткани организма и обеспечивают ее прочность и эластичность. Последние работы указывают на возможную взаимосвязь полиморфизма коллагенов с развитием заболеваний соединительной ткани, таких как остеопороз, остеоартрит, фиброз подслизистой и т.п. [16-18]. Kuivaniemi с соавторами [19] проанализировали 278 полиморфизмов, обнаруженных в генах коллагена I, II, III, IX, X и XI типов у 317 пациентов. В результате было сделано заключение, что отдельные варианты коллагена способствуют развитию некоторых заболеваний костей, хрящей и кровеносных сосудов. Di Lullo с соавторами [20], изучая сайты связывания коллагена I типа, описали свыше 300 полиморфных позиций, ассоциированных с нарушениями соединительной ткани.

Несмотря на бурное развитие генетических исследований, роль полиморфизма коллагенов в развитии гингивита и пародонтита остается малоизученной. Согласно работе Suzuki с соавторами [21], по предварительным данным, для пациентов из Японии была установлена взаимосвязь между аллельным состоянием ряда генов коллагенов с развитием пародонтита.

Целью данной работы было исследование взаимосвязи отдельных вариантов генов коллагенов I, II и III типов и развитием пародонтита у россиян. Были выбраны полиморфизмы, предположительно влияющие на уровень продукции белка (COL1A1 -1997 G>T (rs1107946) [22], COL2A1 C>A (rs1635529)) или структуру белка (COL3A1 698 A>G (rs1800255)) и ранее не исследованные на предмет ассоциации с пародонтитом.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе ФГУ «ЦНИИС и ЧЛХ Минздравоохранения» РФ в отделении пародонтологии. Обследовано 365 пациентов, жителей Москвы и Московской области, в возрасте от 16 до 68 лет без тяжелой соматической патологии.

Основным критерием для постановки диагноза хронический генерализованный пародонтит (ХГП) являлось отсутствие зубодесневого прикрепления. Степень тяжести устанавливали на основании глубины пародонтальных карманов и степени деструкции костной ткани.

Так, для легкой степени ХГП глубина пародонтальных карманов составляла до 3 мм, а рентгенологическая картина подтверждала признаки начальной деструкции межзубных перегородок.

При средней степени ХГП глубина пародонтальных карманов варьировала от 3 до 6 мм, а при обследовании зачастую выявляли патологическую подвижность зубов 1-2 степени. Деструкция кортикальной пластинки и костной ткани межзубных перегородок при рентгенологическом исследовании составляла до 1/2 длины корня.

Тяжелая степень ХГП характеризовалась наличием пародонтальных карманов более 6 мм, патологической подвижностью зубов 2-3 степени, а при рентгенологическом исследовании выявляли деструкцию кортикальной пластинки и костной ткани от 1/2 до 1/3 длины корня. Учитывался характер жалоб и анамнез развития болезни. Основные жалобы были на периодическое гноетечение, ранний возраст возникновения, короткие сроки ремиссии после проводимого ранее лечения.

Основная группа включала 50 пациентов (20 мужчин и 30 женщин) в возрасте от 18 до 68 лет с диагнозом ХГП средней и тяжелой степени. Контрольную группу составили 315 человек (202 мужчин и 113 женщин) в возрасте от 16 до 65 лет, не предъявляющих никаких жалоб, без видимых патологических изменений в тканях пародонта.

Геномную ДНК пациентов экстрагировали из периферической крови при помощи набора реагентов «ПробанК» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

Генотип по полиморфизмам в генах коллагена первого типа COL1A1 -1997 G>T (rs1107946), коллагена второго типа COL2A1 C>A (rs1635529) и коллагена третьего типа COL3A1 698 A>G (rs1800255) определяли при помощи ПЦР «в реальном времени» с использованием примакающих флуоресцентно-меченых проб (kissing probes) путем определения температуры плавления проб после амплификации (melting curve analysis). Последовательности использованных в работе праймеров и флуоресцентно-меченых проб приведены в таблице 1.

ПЦР проводили с помощью детектирующего амплификатора «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Условия реакции: 94С – 5 сек, 68С – 10 сек в течение 40 циклов, плавление с регистрацией уровня флуоресценции после амплификации. Учет результатов реакции проводили с помощью программного обеспечения детектирующего амплификатора «ДТпрайм».

Статистическую обработку данных проводили с помощью свободно распространяемого программного продукта WINPEPI версии 11.4 [23]. Для определения статистической значимости различий в распределении генотипов применялся F-критерий Фишера. Отношение шансов (OR) приведено с 95% доверительным интервалом (CI).

Результаты и обсуждение

Распределение частот исследованных вариантов генов COL1A1, COL2A1 и COL3A1 приведено в таблице 2.

Наблюдаемое распределение частот исследованных

Таблица 1. Последовательности использованных в работе праймеров и флуоресцентно-меченых проб

COL1A1: -1997 G>T (коллаген I типа альфа 1)	
COL1-1997s	GCCAGCGACTGCAGGGCAGGAC
COL1-1997a	GCGGCACCTGCCTAGACCAC
COL1-1997p1	CCAAGAGAACCCCTC-FAM
COL1-1997p2	CCAAGAGACCCCTC-VIC
COL1-1997pq	BHQ1-CCTAATAGGCGACAGGGG-3'-(P)
COL2A1: rs1635529 C>A (коллаген II типа альфа 1)	
COL2_29s	TCTTGCCCAAAGGCTAGGCGGA
COL2_29a	CCAGAGGGCGAGAAAGAAACGA
COL2_29p1	AAAAAGGAAAGTTTATC-FAM
COL2_29p2	AAAAAGGAACGTTTATC-VIC
COL2_29pq	BHQ1-TTTGGATTTTCACTCTCTT-3'-(P)
COL3A1: A>G (A698T) (коллаген III типа альфа 1)	
COL3_698s	TGGTGCCCTGGTGAACGTGGA
COL3_698a	CCTAGGTGAATGGAATGCTGTGGA
COL3_698p1	TGGAAGCTGGTCCCC-FAM
COL3_698p2	TGGAGCTGGTCCCC-VIC
COL3_698pq	BHQ1-CTGGTCCCGAAGGAGGA-3'-(P)

Таблица 2. Распределение частот исследованных вариантов генов COL1A1, COL2A1 и COL3A1 у пациентов с ХГП и в контрольной группе. Указана численность индивидов с данным генотипом, в скобках даны частоты генотипов

Группа	COL1A1 rs1107946			COL2A1 rs1635529			COL3A1 rs1800255			n
	AA	AC	CC	AA	AC	CC	AA	AG	GG	
Контр.	13 (0,04)	87 (0,28)	215 (0,68)	42 (0,13)	125 (0,40)	148 (0,47)	6 (0,02)	124 (0,39)	185 (0,59)	315
Опыт	0 (0,00)	10 (0,20)	40 (0,80)	1 (0,02)	14 (0,28)	35 (0,70)	2 (0,04)	18 (0,36)	30 (0,60)	50
Всего	13 (0,04)	97 (0,26)	255 (0,70)	43 (0,12)	139 (0,38)	183 (0,50)	8 (0,02)	142 (0,39)	215 (0,59)	365

вариантов генов соответствовало распределению Харди-Вайнберга.

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма COL3A1 698 A>G (rs1800255) в исследуемых группах не различалось.

Статистически значимые отличия по частоте встречаемости генотипов между исследованными группами были обнаружены для полиморфизма COL2A1 C>A (rs1635529). Генотипическая частота встречаемости аллеля С была достоверно выше в основной группе по сравнению с контролем (84,0% и 66,8% соответственно, $p=4,2 \cdot 10^{-4}$). Количественную оценку риска проводили двумя методами: согласно аутосомно-доминантной модели (генотип СТ+СС) $OR=7,54 (1,03 - 54,96)$, $p=0,017$; согласно аутосомно-рецессивной модели (генотип СС) $OR=2,63 (1,39 - 4,98)$, $p=3,5 \cdot 10^{-3}$.

Для полиморфизма COL2A1 C>A (rs1635529) ранее была показана взаимосвязь с миопией [24, 25]. В литературе отсутствует информация о том, как данный полиморфизм влияет на структуру или уровень наработки белка, однако принимая во внимание то, что варибельная позиция rs1635529 расположена в центральной части первого интрона гена COL2A1, можно предположить,

что она скорее влияет на уровень продукции белка, нежели на его структуру. Повышенный риск развития заболевания у носителей варианта С rs1635529 может являться следствием повышенной или пониженной продукции альфа 1 цепи коллагена второго типа.

Генотипическая частота встречаемости аллеля С полиморфизма COL1A1 1997 G>T (rs1107946) также была повышена в основной группе по сравнению с контролем (90,0% и 82,1% соответственно), но различия не достигали уровня статистической значимости ($p=0,060$).

Литературные данные указывают на ассоциацию позиции COL1A1 -1997 G>T (rs1107946) с минеральной плотностью костей (BMD) [22]. Авторы сообщают о пониженной BMD у женщин-носителей варианта С. Установлено, что вариант С ведет к повышению уровня транскрипции гена COL1A1, а возникающая вследствие этого гиперпродукция цепи альфа 1 коллагена первого типа вызывает дисбаланс соотношения цепей альфа 1 и альфа 2, приводя к нарушениям в строении костной ткани. Такой механизм вполне соотносится с обнаруженной в нашем исследовании повышенной частотой встречаемости варианта С rs1107946 в основной группе по сравнению с контролем. Дефекты строения костной ткани при нару-

шенном соотношении вариантов цепей коллагена могут способствовать более интенсивному разрушению кости и потере зуба.

Таким образом, в данном исследовании выявлена ассоциация полиморфизма COL2A1 C>A (rs1635529) с развитием хронического генерализованного пародонтита. Генотипическая частота встречаемости аллеля С полиморфизма COL1A1 1997 G>T (rs1107946) повышена в основной группе, не достигая однако уровня статистической значимости.

Для полиморфизма COL3A1 698 A>G (rs1800255) ассоциации с пародонтитом не обнаружено. Полученные нами данные позволяют рассматривать генетическую предрасположенность к дезорганизации соединительной ткани как фактор риска развития пародонтита. ■

Работа выполнена при частичной поддержке Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (ГК 8657р/14067)

Литература:

- Borrell L.N. and Papanou P.N., "Analytical epidemiology of periodontitis," Journal of Clinical Periodontology, vol. 32, supplement 6, pp.132-158, 2005.
- Michalowicz B.S., Diehl S.R., Gunsolley J.C., et al., "Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis," Journal of Periodontology, vol. 71, no. 11, pp. 1699-1707, 2000.
- Michalowicz B.S., Aeppli D., Virag J.G., et al., "Periodontal findings in adult twins," Journal of Periodontology, vol. 62, no. 5, pp. 293-299, 1991.
- Woessner J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB J. 1991;2145-2154.
- Krane S.M. Clinical Importance of metalloproteinases and their inhibitors. Ann NY Acad Sci. 1994;732:1-10.
- Birkedal-Hansen H, Moore W.G., Bodden M.K., Windsor L.J., Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler J.A. Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med. 1993;4(2):197-250.
- Hannas A.R., Pereira J.C., Granjeiro J.M., Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. Acta Odontologica Scandinavica. 2007;65:1-13.
- Hayakawa T. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in development and disease of oral tissues. Dent in Japan. 1998;34:167-177.
- Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(3):221-233.
- Van der Zee E., Everts V., Beertsen W. Cytokine-induced endogenous procollagenase stored in the extracellular matrix of soft connective tissue results in a burst of collagen breakdown following its activation. J Periodontol Res. 1996;3:483-488.
- Chang Y.C., Yang S.F., Lai C.C., Liu J.Y., Hsieh Y.S. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. J Periodontol Res. 2002;37(3):196-203.
- Nishikawa M., Yamaguchi Y., Yoshitake K., Saeki Y. Effects of TNF-alpha and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. J Periodontol Res. 2002;37(3):167-176.
- Rossa-Junior C., Liu M., Patil C., Kirkwood K.L. MKK3/6-p38 MAPK negatively regulates murine MMP-13 gene expression induced by IL-1beta and TNF-alpha in immortalized periodontal ligament fibroblasts. Matrix Biol. 2005;24(7):478-488.
- Hernandez M., Valenzuela M.A., Lopez-Otin C., Alvarez J., Lopez J.M., Vernal R., Gamonal J.. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. J Periodontol. 2006;77(11):1863-1870.
- Sorsa T, Tjaderhane L, Kontinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, Golub LM, Brown DL, Mantyla P. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. Ann Med. 2006;38(5):306-321.
- Chiu CJ, Chang ML, Chiang CP, Hahn LJ, Hsieh LL, Chen CJ. Interaction of collagen-related genes and susceptibility to betel quid-induced oral submucous fibrosis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002 Jul;11(7):646-53.
- Castellani C, Malerba G, Sangalli A, Delmarco A, Petrelli E, Rossini M, Assael BM, Mottes M. The genetic background of osteoporosis in cystic fibrosis: association analysis with polymorphic markers in four candidate genes. J Cyst Fibros. 2006 Dec;5(4):229-35.
- Pun YL, Moskowitz RW, Lie S, Sundstrom WR, Block SR, McEwen C, Williams HJ, Bleasel JF, Holderbaum D, Haqqi TM. Clinical correlations of osteoarthritis associated with a single-base mutation (arginine519 to cysteine) in type II procollagen gene. A newly defined pathogenesis. Arthritis Rheum. 1994 Feb;37(2):264-9.
- Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ. Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. Hum Mutat. 1997;9(4):300-15.
- Di Lullo GA, Sweeney SM, Korkko J, Ala-Kokko L, San Antonio JD. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. J Biol Chem. 2002 Feb 8;277(6):4223-31.
- Suzuki A, Ji G, Numabe Y, Muramatsu M, Gomi K, Kanazashi M, Ogata Y, Shimizu E, Shibukawa Y, Ito A, Ito T, Sugaya A, Arai T, Yamada S, Deguchi S, Kamoi K. Single nucleotide polymorphisms associated with aggressive periodontitis and severe chronic periodontitis in Japanese. Biochem Biophys Res Commun. 2004 May 7;317(3):887-92.
- Stewart TL, Jin H, McGuigan FE, Albagha OM, Garcia-Giral N, Bassiti A, Grinberg D, Balcells S, Reid DM, Ralston SH. Haplotypes defined by promoter and intron 1 polymorphisms of the COL1A1 gene regulate bone mineral density in women. J Clin Endocrinol Metab. 2006 Sep;91(9):3575-83. Epub 2006 Jun 27.
- Abramson J. H. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists // Epidemiol Perspect Innov. - 2004. - Vol. 1. - №1. - P. 6.
- Mutti DO, Cooper ME, O'Brien S, Jones LA, Marazita ML, Murray JC, Zadnik K. Candidate gene and locus analysis of myopia. Mol Vis. 2007 Jun 28;13:1012-9.
- Metlapally R, Li YJ, Tran-Viet KN, Abbott D, Czaja GR, Malecaze F, Calvas P, Mackey D, Rosenberg T, Paget S, Zayats T, Owen MJ, Guggenheim JA, Young TL. COL1A1 and COL2A1 genes and myopia susceptibility: evidence of association and suggestive linkage to the COL2A1 locus Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 Sep;50(9):4080-6. Epub 2009 Apr 22.