

Определение взаимосвязи между индивидуальными полиморфными аллелями и гаплотипами генов цитокинов IL-1 β и антагониста его рецептора (IL-1RN) для прогноза характера течения хронического воспаления пародонта

Григорович Э. Ш., к.м.н., доцент кафедры терапевтической стоматологии ГОУ ВПО «Омская Государственная Медицинская Академия Росздрава», г. Омск

Determining the relationship between individual polymorphic alleles and haplotypes of genes of cytokines IL-1 β and its receptor antagonist (IL-1RN) to predict the nature of chronic periodontal inflammation

Grigorovich E. S.

Резюме

Установлено, что носители T аллеля полиморфного локуса C-511T ИЛ-1 β и генотипа C/T встречались значимо чаще в группе пациентов, больных тяжелыми формами пародонтита. При исследовании нуклеотидной замены генов IL-1 β C+3953T аллель T также чаще встречался в основной группе у больных пародонтитом. При исследовании полиморфизма генов IL-1RN достоверных различий между исследуемыми группами обнаружено не было. Имеется тенденция к увеличению количества носителей аллеля 2R, генотипа 2R/4R и 2R/2R среди лиц с тяжелым течением воспаления пародонта. Ключевые слова: Полиморфизм генов IL-1 β , IL-1RN, хроническое воспаление пародонта

Resume

Found that carriers of the T allele of the polymorphic locus of C-511T of IL-1 β and genotype C / T met significantly more likely in the group of patients with severe periodontitis. In the study of nucleotide substitution of genes IL-1 β C +3953 T allele T is also more common in the study group in patients with periodontitis. In the study of gene polymorphism IL-1RN significant differences between treatment groups were found. There is a tendency to increase the number of carriers of allele 2R, genotype 2R/4R and 2R/2R among persons with severe periodontal inflammation.

Keywords: Polymorphism of genes, a chronic inflammation of periodontal

Обращаемость населения по поводу заболеваний пародонта занимает 4-е место среди других стоматологических болезней (кариеса и его осложнений). Известно, что 85% обслуживаемого населения нуждается в пародонтологической помощи, при этом 65% больных обращаются в стоматологическую поликлинику уже с тяжелой формой заболевания и только 5% – с начальными стадиями воспаления пародонта. Несвоевременное обращение пациентов к стоматологу приводит к потере зубов у взрослых примерно в 50% случаев.[1]

Этиологическими факторами воспалительных заболеваний пародонта, в настоящее время, принято считать инфекционные агенты, персистирующие в зонах зубодесневое соединения. Соответственно увеличению содержания пародонтопатогенных микроорганизмов возрастает уровень синтезируемых ими экзотоксинов и повреждающих пародонтальные ткани ферментов, что заканчива-

ется деструкцией тканей пародонта. В ответ на повреждение реализуется стереотипная воспалительная реакция с вовлечением сосудов микроциркуляторного русла. Это создает предпосылки для формирования воспалительного инфильтрата, способного вызывать вторичную альтерацию тканей пародонта вследствие чрезмерного действия цитокинов. Воспалительный ответ является ведущим в формировании и хронизации течения воспалительного процесса в десне, прогрессирование воспаления связывают с изменением экспрессии различных цитокинов и хемокинов. [2,3] Имеются сведения о наследственном характере заболеваний пародонта. [4,5] Предполагается, что у человека существует особый наследственный профиль провоспалительных цитокинов, который предрасполагает к определенному характеру течения воспаления. В настоящее время, делаются попытки определить генетическую основу межиндивидуальных различий в иммунном ответе путем определения взаимосвязи между индивидуальными полиморфными аллелями, или гаплотипами генов цитокинов и заболеванием. Известно, что IL-1 β – провоспалительный цитокин, который играет главную роль в инициации и поддержании воспалительного ответа и осуществлении всего комплекса защитных реакций. Его функция во время воспаления: пролиферация активированных T- и B- клеток индукция PGE2 про-

Ответственный за ведение переписки -

Григорович Э.Ш.

644073 г. Омск, Дианова 18

корпус 1 кв 222

89059222127сотовый личный

8(3812)233228 служебный

09061966@inbox.ru

дукция цитокинов макрофагов, индукция лихорадки, прогрессирования острой фазы, активности остеокластов. В популяции людей наблюдается полиморфизм гена IL-1β. Хорошо изучены два полиморфизма: полиморфизм в промоторной области гена в положении С-511Т и полиморфизм нуклеотидной замены С+3953Т в 5 экзоне. Оба полиморфизма связаны с увеличением продукции интерлейкина 1β в 2-4 раза. Ген антагонист рецептора интерлейкина-1β является естественным ингибитором действия интерлейкина. Дефект гена антагониста приводит к развитию более пролонгированного иммунного ответа и связан с повышением риска развития хронических воспалительных состояний. [6,7] В гене антагониста рецептора известен минисателлитный полиморфизм (вариабельность по числу 86-членных тандемных повторов) во 2-м интроне, который предполагает существование пяти аллелей, каждому из которых соответствует определенное число повторов. Наиболее часто встречается аллель содержащий 4 повтора (4R у 74 % населения), и аллель, содержащий 2 повтора (2R 21%). Оставшиеся аллели встречаются менее чем в 5% случаев. Считается, что увеличение числа повторов (4R,5R,6R) ведет к понижению количества антагониста рецептора IL-1β, а носительство аллеля с двумя повторами (2R) связано с повышенным уровнем циркулирующего антагониста рецептора IL-1β в ходе воспаления. [8,9]

Цель исследования изучить распределение генотипов и аллелей генов IL-1β и антагониста его рецептора (IL-1RN) у больных пародонтитом тяжелой и средне-тяжелой степени и проанализировать возможные ассоциации генотипов этих генов с риском развития заболевания.

Материал и методы

На базе клиники кафедры терапевтической стоматологии ОмГМА и пародонтологического отделения ГКСП №1 г. Омска были обследованы 75 пациентов, больных пародонтитом средне-тяжелой и тяжелой степени. Объектами исследования явились образцы венозной крови, полученные у 75 пациентов (средний возраст 39,1±5,7 обоюбого пола), больных пародонтитом, и образцы венозной крови, полученные у 75 пациентов случайной популяционной выборки.

Забор венозной крови проводили с антикоагулянтом и последующим получением взвеси лейкоцитов, из которой выделяли ДНК методом перхлоратной экстракции с этанольным осаждением. Молекулярно-генетическое исследование проводилось в ДНК лаборатории на базе академического центра патологической анатомии ГОУ ВПО ОмГМА. У всех больных было получено информированное согласие на исследование.

Для проведения генетического исследования использовали праймеры, синтезированные в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Структуры праймеров и программа амплификации приведены в таблицах (таб.1 и 2). ПЦР проводили на амплификаторе "Терцик" («ДНК-Технология», Москва) с начальной денатурацией при 95оС - 2 мин, далее в течение 35 циклов при следующих режимах: денатурация - 7 сек при 95оС; отжиг праймеров - 10 сек при 64оС для IL1- RN и при 60оС для IL-1β; элонгация - 20 сек при 72оС. Исследование полиморфизма IL1- RN проводили с помощью ПЦР с праймерами, фланкирующими полиморфный регион в пределах второго интрона, в котором находится вариабельное количество

Таблица 1. Структура олигонуклеотидных праймеров

Ген	Мутация	U	R
L-1 β	С+3953Т	TCCTACTGGTGTGT CATCAG	CTTGGGTGGACATG GTCCTG
	С-511Т	AAAGAGGCAAAGGAG GGTGTTC	GGGTACAATGAAGG GCCAATAG
L-1RN	Intron 2 86 п.о. VNTR	CCCCTCATGGCCCTT GTTC	GGCTCAATGGTACCA CATC

Таблица 2. Программа амплификации

IL-1β						IL-1RN								
С+3953Т			С-511Т			Intron 2 86 п.о. VNTR								
95 °С	3 мин	1 цикл	95 °С	3 мин	1 цикл	95 °С	3 мин	1 цикл						
95 °С	10 с	40 циклов	95 °С	10 с	40 циклов	95 °С	10 с	40 циклов						
60 °С	10 с		64 °С	10 с		62 °С	10 с							
72 °С	5 с		72 °С	5 с		72 °С	25 с							
72 °С	2,5 мин	1 цикл	72 °С	2,5 мин	1 цикл	72 °С	2,5 мин	1 цикл						
20 °С	хранение		20 °С	хранение		20 °С	хранение							

Таблица 3. Частота встречаемости аллелей полиморфного локуса С-511Т ИЛ-1 β в группе пациентов с пародонтитом тяжелой и средне-тяжелой степени (основная группа) и группе сравнения

Аллель	Основная группа (150 хромосом)		Группа сравнения (150 хромосом)		χ^2 , уровень p
	Количество хромосом	%	Количество хромосом	(%)	
С	90	60	115	76,7	9,63; 0,003*
Т	60	40	35	23,3	

Примечание. * - различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий χ^2).

Таблица 4. Частота встречаемости генотипов полиморфного локуса С-511Т гена ИЛ-1 β в группе пациентов с пародонтитом тяжелой и средне-тяжелой степени (основная группа) и группе сравнения

Генотип	Основная группа (n=75)		Группа сравнения (n=75)		χ^2 , уровень p
	Абс. количество	%	Абс. количество	%	
С/С	22	29,3	43	57,3	11,97; 0,0005*
С/Т	46	61,3	29	38,7	7,71; 0,006*
Т/Т	7	9,4	3	4,0	1,71; 0,19

Примечание. * - различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий χ^2).

ство tandemных повторов - 86 п.н. (VNTR). В результате амплификации определяли фрагменты ДНК размером 438, 610, и 696 п.н. с 2, 4 или 5 tandemными повторами, соответственно. Эти аллели были обозначены как 2R, 4R.

Для определения полиморфных вариантов генов ИЛ-1 β использовали ПЦР с дальнейшей рестрикцией ампликонов эндонуклеазами рестрикции. При гидролизе амплификационного фрагмента гена ИЛ-1 β эндонуклеазой рестрикции TaqI выявлялось три фрагмента размером 550 п.н., 146 п.н. и 404 п.н. Фрагмент 550 п.н. соответствовал амплификационному фрагменту, не подвергнувшемуся гидролизу, что указывает на присутствие аллеля +3953Т ИЛ-1 β . При наличии аллеля С происходит разрезание амплификационного фрагмента ДНК на два, размером 146 п.н. и 404 п.н.

Анализ рестрикционных смесей проводили с помощью электрофореза в 8%-м полиакриламидном геле.

Для обнаружения ассоциации между частотами встречаемости аллелей и генотипов применялись стандартные статистические методы. Парное сравнение контрольных и опытных частот проводилось с помощью точного критерия Фишера и χ^2 для долей с включением поправки Йейтса на непрерывность.[10]

Результаты и обсуждение

Были получены следующие результаты: при исследовании полиморфизма генов ИЛ-1 β локуса С-511Т, в группе сравнения и основной группе, было статистически значимо больше носителей аллеля С, носители Т аллеля в группе пациентов, больных тяжелыми формами пародонтита встречались чаще, чем в группе сравнения (таб. 3). Большинство лиц группы сравнения имели генотип С/С, а в основной группе значимо чаще определялся генотип С/Т. (таб. 4) При исследовании нуклеотидной замены генов ИЛ-1 β С+3953Т так же преобладающим в обеих группах оказался аллель С, аллель Т чаще встречался в основной группе больных пародонтитом. (таб. 5) Частота встречаемости генотипа С/С полиморфного локуса С+3953Т была наибольшей в группе сравнения, а генотипа Т/Т в основной группе. Генотип С/Т чаще определялся в основной группе пациентов, но данные не достигали уровня статистической значимости (таб. 6). При исследовании полиморфизма генов ИЛ-1RN достоверных различий между исследуемыми группами обнаружено не было. Но прослеживается тенденция к увеличению количества носителей аллеля 2R, генотипа 2R/4R и 2R/2R среди лиц основной группы (таб. 7,8).

Таблица 5. Частота встречаемости аллелей полиморфного локуса С+3953Т ИЛ-1 β в группе пациентов с пародонтитом тяжелой и средне-тяжелой степени (основная группа) и группе сравнения

Аллель	Основная группа (150 хромосом)		Группа сравнения (150 хромосом)		χ^2 , уровень p
	Количество хромосом	%	Количество хромосом	%	
С	101	67,3	129	6,0	14,61;
Т	49	32,7	21	4,0	0,0001*

Примечание. * - различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий χ^2).

Таблица 6 Частота встречаемости генотипов полиморфного локуса С+3953Т гена ИЛ-1 β в группе пациентов с пародонтитом тяжелой и средне-тяжелой степени (основная группа) и группе сравнения

Генотип	Основная группа (n=75)		Группа сравнения (n=75)		χ^2 , уровень p
	Абс. количество	%	Абс. количество	%	
С/С	37	49,3	56	74,7	10,22; 0,001*
С/Т	27	36,0	17	22,7	3,22; 0,07
Т/Т	11	14,7	2	2,6	6,82; 0,009*

Примечание. * - различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий χ^2).

Таблица 7 Частота встречаемости аллелей полиморфного локуса VNTR-intr2 гена IL-1RN в группе пациентов с пародонтитом тяжелой и средне-тяжелой степени (основная группа) и группе сравнения

Аллель	Основная группа (150 хромосом)		Группа сравнения (150 хромосом)		χ^2 , уровень p
	Количество хромосом	%	Количество хромосом	%	
2R	42	28	29	19,3	3,12;
4R	108	72	121	80,7	0,08

Примечание. * - различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий χ^2).

Таблица 8. Частота встречаемости генотипов полиморфного локуса VNTR-intr2 гена IL-1RN в группе пациентов с пародонтитом тяжелой и средне-тяжелой степени (основная группа) и группе сравнения

Генотип	Основная группа (n=75)		Группа сравнения (n=75)		χ^2 , уровень p
	Абс. количество	%	Абс. количество	%	
2R/2R	2	2,7	0	0	2,03;0,15
2R/4R	38	50,7	29	38,7	2,18;0,14
4R/4R	35	46,6	46	61,3	3,25;0,07

Примечание. * - различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий χ^2).

По литературным данным такое увеличение носителей аллеля 2R, обуславливающее большую продукцию антагониста интерлейкина-1 на фоне увеличения продукции самого интерлейкина-1 вполне объяснимо. Согласно существующей версии, при реализации воспалительного ответа у носителей генетически обусловленного перевеса в сторону выработки антагониста рецептора количество этого белка больше, чем необходимо для адекватной реализации воспаления, что вызывает компенсаторное образование еще большего количества интерлейкина-1. При этом и антагониста рецептора в ответ вырабатывается тоже больше. Таким образом, носительство сочетаний генов интерлейкина-1 и антагониста его рецеп-

тора, определяющих перевес в сторону выработки антагониста, приводит к более продолжительному воспалительному ответу.[6,9]

Кроме того, у носителей аллеля T гена интерлейкина 1 β и 2R гена антагониста рецептора воспаление, по всей видимости, должно быть не только более продолжительным, но и более интенсивным. Проанализировав возможную связь ДНК-полиморфизмов гена интерлейкина-1 и антагониста его рецептора, мы полагаем, что полученные данные, могут использоваться в качестве генетического маркера в комплексе с другими исследованиями для прогноза развития у пациентов тяжелых форм заболевания пародонта.■

Литература:

- 1 Боровской ЕВ. Терапевтическая стоматология М, 2003; 746
- 2 Безрукова ИВ. Быстропрогрессирующий пародонтит. М. Мед ювита, 2004; 142
- 3 Смольникова МВ, Коненков ВИ. Ключевая роль иммуногенетики заболеваний человека. Медицинская иммунология 2001; (3) 379-389.
- 4 Вольф Г.Ф., Ратайрхаг Эдит М., Ратайрхаг К. Пародонтология. Под ред. проф. Г.М. Барера. М. МЕДпресс-информ, 2008; 548 ил ISBN5-98322-347-X
- 5 Newman M.G., Takei H.H., Carranza F.A. Clinical periodontology Saunders 2002; (1030) 168-182
- 6 El Omar EM, Carrington M, McColl KE, Bream JH, Young HA (et al). Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature- 2000; 404, 398-402.
- 7 Pociot F., Molvig J., Wogensen L., Pociot F. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 β (IL-1 β) gene correlates with IL-1 β secretion in vitro. Eur. J. Clin. Invest. 1992; (22) 396-402.
- 8 Machado JC, Pharoah P, Sousa S, Carvalho R, Oliveira C, Figueiredo C (et al). Interleukin-1 β and interleukin-1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. Gastroenterology -2001; 121:823-9.
- 9 Nicklin M.J., Weith A., Duff G.W. A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. Genomics 1994; (19) 382-384.
- 10 Гланц С. Медицинско-биологическая статистика. М.: Практика, 1998; 123-159.