

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАРОДОНТИТЕ

Трофимов В.А.¹, Власов А.П.¹, Адамчик Р.В.¹, Кондюрова Е.В.¹, Прытков В.А.¹

¹ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева», Саранск, Россия (430005, г. Саранск, ул. Большевикская, 68), e-mail: vap.61@yandex.ru

Изучены показатели развития деструктивного процесса ткани пародонта 70 больных хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести с давностью заболевания от 4 до 12 лет в возрасте от 32 до 54 лет, проходивших лечение в Республиканской стоматологической поликлинике и стоматологической поликлинике № 3 г. Саранска. Исследована интенсивность процесса перекисного окисления липидов и частота встречаемости полиморфизмов генов антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и глутатион S-трансферазы P1 у больных хроническим пародонтитом. В геномах больных пародонтитом выявлена повышенная частота встречаемости патологических аллелей генов супероксиддисмутазы, глутатион S-трансферазы. Показана ассоциация с риском развития хронического пародонтита мутаций Ala16Val гена супероксиддисмутазы и Ala114Val гена глутатион S-трансферазы. Полученные данные свидетельствуют о важной роли в реализации патогенеза заболевания свободнорадикального механизма, обуславливающего высокий риск повреждения клеточных мембран, развития деструктивных процессов и гибели клеток, что является основанием для исследования генетической составляющей, связанной с наличием полиморфизмов в генах ферментов, влияющих на эффективность антиоксидантной защиты в организме больных.

Ключевые слова: пародонтит, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, генетический полиморфизм.

ANTIOXIDANT ENZYME GENE POLYMORPHISM IN CHRONIC PERIODONTITIS

Trofimov V.A.¹, Vlasov A.P.¹, Adamczyk R.V.¹, Kondyurova E.V.¹, Prytkov V.A.¹

Mordvinian State University, Saransk, Russia (430005, Saransk, street Bolshevistskaya, 68), e-mail: vap.61@yandex.ru

The parameters of the destructive process of periodontal tissue of 70 patients with chronic generalized periodontitis of moderate severity with disease duration from 4 to 12 years in age from 32 to 54 years who were treated in the Republican dental clinic and dental clinic number 3 of Saransk. Investigated the intensity of lipid peroxidation and the frequency of occurrence of gene polymorphisms of antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione S-transferase P1 in patients with chronic periodontitis. In the genomes of patients with periodontitis revealed increased incidence of pathological alleles superoxide dismutase, glutathione S-transferase. Shows association with the risk of developing chronic periodontitis gene mutations Ala16Val superoxide dismutase and glutathione Ala114Val gene S-transferase. These data suggest an important role in the implementation of the free radical mechanism of disease pathogenesis, causes a high risk of damage to cell membranes, the development of destructive processes and cell death, which is the basis for the study of the genetic component associated with the presence of polymorphisms in the genes of enzymes that affect the efficiency of the antioxidant defense in the body patients.

Keywords: periodontitis, lipid peroxidation, antioxidant system, genetic polymorphism.

Пародонтит является многофакторным хроническим воспалительным заболеванием, обусловленным развитием пародонтопатогенной микрофлоры, накоплением экзо- и эндотоксинов на фоне снижения иммунологической реактивности организма [4,6].

До настоящего времени острота проблемы возникновения, развития и хронизации пародонтита не снижается. Болезни пародонта наряду с кариесом зубов и его осложнениями остаются самыми распространенными стоматологическими заболеваниями. Воспалительными заболеваниями пародонта в разных возрастных группах страдают от 80 до 100 % взрослого населения. Несвоевременное и неэффективное лечение хронического

генерализованного пародонтита выступает основной причиной потери зубов среди взрослого населения [2].

Очевидно, что для повышения эффективности лечения пародонтита требуется дальнейшее изучение патогенетических механизмов формирования, развития и прогрессирования заболевания на молекулярном уровне. Исследованы полиморфизмы генов цитокинов, коллагенов, выявляются ассоциации между степенью тяжести заболеваний пародонта и носительством патологических аллелей [3,5,7,10].

Исходя из того, что в патогенезе пародонтита ведущую роль в гибели клеток и повреждении ткани пародонта играют свободные радикалы и другие экзо- и эндотоксины нами изучена распространенность значимых полиморфизмов генов супероксиддисмутазы, каталазы, глутатион S-трансферазы у больных с пародонтитом и определён их вклад в развитие заболевания.

Материалы и методы исследования. В основу работы положены результаты клинико-лабораторного исследования. Были обследованы 70 больных хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести с давностью заболевания от 4 до 12 лет (28 мужчин и 42 женщины) в возрасте от 32 до 54 лет, проходивших лечение в Республиканской стоматологической поликлинике и стоматологической поликлинике № 3 г. Саранска. Диагноз был выставлен с учетом Международной классификации болезней ВОЗ на основании клинической картины и данных клинико-лабораторных исследований. Пациенты проходили комплексное обследование: стоматологическое, клинико-лабораторное, рентгенологическое, биохимическое и функциональное.

Выделена группа в количестве 60 здоровых лиц в возрасте 34-52 лет (22 мужчины и 38 женщин). Величины изученных показателей, полученные в этой группе, были использованы в качестве отправной точки сравнения как физиологически нормальные значения.

ДНК выделяли из ядродержащих клеток крови человека по методу Woodram [8]. Генотипы исследуемых аллельных вариантов генов определяли при помощи ПЦР с использованием TagMan зондов комплементарных полиморфной последовательности ДНК (Синтол).

Диеновые и триеновые конъюгаты определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 232–233 и 275 нм, малоновый диальдегид спектрофотометрическим методом в реакции с тиобарбитуровой кислотой. Активность супероксиддисмутазы оценивали в реакции с нитросинимтетразолием, активность каталазы исследовали спектрофотометрическим методом, активность фосфолипазы A₂ исследовали с использованием фосфатидилхолинов яичного желтка в присутствии 10 мМоль CaCl₂ [1].

Полученные данные обрабатывали статистически с помощью пакета прикладных программ MicrosoftOfficeExcel 2003, Statistica 6.0 (StatSoft), BIOSTAT.

При попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группе больных и контроля использовали критерий $\chi^2(p)$ для таблиц сопряженности 2x2 с поправкой Йейтса на непрерывность [1]. Силу ассоциации оценивали в значениях показателя соотношения шансов OddsRatio (OR).

Результаты исследования и их обсуждение

Пародонтит как локальный хронический воспалительный процесс поддерживается высокой интенсивностью процесса перекисного окисления липидов, повышенной активностью фосфолипазы A_2 на фоне недостаточной активности антиоксидантной системы организма (табл. 1). При этом в крови больных пародонтитом отмечается относительно высокий уровень как начальных продуктов перекисного окисления липидов (диеновых и триеновых конъюгатов), так и вторичных ТБК-реактивных продуктов, соответственно на 70 и 32 % относительно контроля. К другим значимым изменениям следует отнести активность фосфолипазы A_2 , превышающей в 1,85 раз контрольные показатели и понижение супероксиддисмутазной активности на 21 % относительно контроля. В тоже время необходимо отметить значимость явления, связанного с отсутствием изменений в активности каталазы, поскольку этот фермент катализирует распад перекиси водорода, важнейшего реакционноспособного представителя активных форм кислорода, поддерживающего высокий уровень процессов перекисного окисления липидов.

Представленные данные свидетельствуют о важной роли в патогенезе хронического пародонтита свободнорадикальных процессов и поддерживаемого ими эндотоксикационного звена, как компонентов тканевого воспалительного процесса.

Важнейшими ферментами организма, во многом определяющими эффективность работы антиоксидантной и детоксикационной систем являются супероксиддисмутаза, каталаза и глутатион S-трансфераза, гены которых и стали объектами дальнейшего исследования (табл. 2).

Распределение частот аллелей и генотипов по полиморфным маркерам генов в исследуемых группах соответствовало распределению Харди-Вайнберга.

Таблица 1

Содержание продуктов перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов и фосфолипазы A_2 в плазме крови больных хроническим пародонтитом ($M \pm m$)

Показатель	Норма	До лечения
------------	-------	------------

Диеновые конъюгаты, усл. ед. / мг липидов	0,23±0,01	0,37±0,03*
Триеновые конъюгаты, усл. ед. / мг липидов	0,20±0,01	0,35±0,02*
Малоновый диальдегид, нмоль/г белка	2,36±0,11	3,12±0,15*
Fe ²⁺ - индуцированный малоновый диальдегид, нмоль/г белка	5,42±0,25	6,67±0,32*
Фосфолипаза А ₂ , мкмоль/с/г белка	0,073±0,004	0,135±0,012*
Каталаза, мгН ₂ О ₂ /мин/г белка	0,061±0,003	0,063±0,005
Супероксиддисмутаза, усл.ед./мг белка	3,14±0,11	2,49±0,13*

Примечание: * – достоверность отличия по отношению к норме при (p<0,05)

Таблица 2

Частота встречаемости аллелей и генотипов по изучаемым полиморфизмам

Выборка	Ген/ полиморфизм	Частота генотипов, %			Частота аллелей		χ^2	OR аллель (95%)
		3	4	5	6	7		
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Доноры (n=56)	<i>SOD2</i> C47T	CC	CT	TT	C	T	0,954	1,53 (0,86- 2,70)
Больные пародонтитом (n=48)		55,36 (n=31)	21,43 (n=12)	23,21 (n=13)	0,66	0,34		
		37,5 (n=18)	37,5 (n=18)	25,0 (n=12)	0,56	0,44	0,17	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Доноры (n=70)	<i>ген каталазы</i> -262 C/T	AA	GA	GG	A	G	0,303	0,58 (0,31- 1,08)
Больные пародонтитом		50,0 (n=35)	32,86 (n=23)	17,14 (n=12)	0,66	0,34		
		58,2 (n=28)	41,8 (n=23)	0	0,77	0,23	0,27	

(n=51)									
Доноры (n=56)	<i>ген</i> <i>глутатион S- трансферазы</i>	GG	GA	AA	G	A	0,035	0,97 (0,55- 1,73)	
		46,7 (n=28)	40 (n=24)	13,3 (n=8)	0,71	0,36			
Больные пародонтитом (n=47)	<i>P1/Ile105Val(3 13A>G)</i>	42,6 (n=20)	48,9 (n=23)	8,5 (n=4)	0,67	0,33	0,034		
Доноры (n=60)	<i>ген</i> <i>глутатион S- трансферазы</i>	CC	CT	TT	C	T	0,046	1,59 (0,68- 3,73)	
		80 (n=48)	20 (n=12)	0 (n=0)	0,90	0,10			
Больные пародонтитом (n=60)	<i>P1/Ala114Val (341C>T)</i>	76,6 (n=46)	16,6 (n=10)	6,7 (n=4)	0,85	0,15	0,45		

Ген *SOD2* кодирует марганцевую супероксиддисмутазу (Mn SOD), играющую важную роль в ингибировании свободнорадикальных процессов. Наиболее значимой мутацией в гене *SOD2* является замена (C47T), приводящая к снижению активности фермента и повышенной повреждаемостью тканей при окислительном стрессе [11]. Показано, что частота встречаемости патологического аллеля полиморфизма C47T (Ala16Val) гена *SOD2* в группе больных пародонтитом на 40 % выше показателей контрольной выборки (табл. 2). Для больных хроническим пародонтитом также характерно увеличение степени гетерозиготности.

Результаты нашего исследования наглядно подтверждают вклад мутантного аллеля C гена *SOD2* в формирование патологического фенотипа при пародонтите (табл. 2).

Каталаза – главный антиоксидантный фермент, участвующий в разложении пероксида водорода. Нарушения каталазной активности связывают с развитием ишемической болезни сердца, астмы, диабета, ревматоидного артрита и других. Наиболее значимая мутация (-262 C/T) в гене каталазы (*CAT*) влияет на экспрессивную активность гена [9].

Изучение частоты аллелей и генотипов полиморфизма -262 C/T гена каталазы в выборках здоровых людей и больных пародонтитом показало, что у пациентов пародонтитом по изучаемому полиморфизму гена каталазы доминирует гетерозиготный генотип (GA). Участие мутантного аллеля C гена каталазы в формировании патологического фенотипа при пародонтите не подтверждено.

Ген *GSTP1* кодирует P1-глутатион S-трансферазу, участвующую в детоксикации канцерогенов, липидов, продуктов свободнорадикальных реакций. Полиморфизмы Ile105Val

(313A>G) и 341C>T гена *GSTP1* обуславливают продукцию фермента с пониженной активностью [12].

Полученные нами данные о частотах распространенности полиморфизмов Pe105Val (313A>G) и 341C>T гена *GSTP1* свидетельствуют о низкой распространённости патологических полиморфизмов в выборках обследуемых и указывают на наличие внутривнутрипопуляционных особенностей (табл. 2).

Заключение. Таким образом, при пародонтите в крови больных накапливаются продукты перекисного окисления липидов, возрастает фосфолипазная активность и понижается активность супероксиддисмутазы в плазме крови. Полученные данные, свидетельствующие о важной роли в реализации патогенеза заболевания свободнорадикального механизма, обуславливающего высокий риск повреждения клеточных мембран и развития деструктивных процессов и гибели клеток, являются основанием для исследования генетической составляющей, связанной с наличием полиморфизмов в генах ферментов, влияющих на эффективность антиоксидантной защиты в организме больных.

Показано, что риск развития пародонтита повышается при наличии в геномах людей мутаций в гене марганцевой супероксиддисмутазы.

Изменение активности ферментов, участвующих в обезвреживании и утилизации генотоксических соединений, определяет риск повреждения ключевых биомолекул (нуклеиновых кислот, белков, липидов) и степень деструктивных процессов, приводящих к повреждению клеток и нарушению их функциональной активности при пародонтите. Однако в случае патогенеза пародонтита речь идет скорее о механизмах изменения активности анализируемых ферментов, чем о генетической составляющей, обусловленной наличием патологических полиморфизмов.

В тоже время изучение вклада полиморфизмов генов антиоксидантных ферментов в развитие пародонтита требует проведения дальнейших исследований с расширением выборки больных с различной тяжестью заболевания.

Список литературы

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика // Под ред. И.Е. Бузикашвили и Д.В. Самойлова. – М.: Практика, 1999. - 460 с.
2. Грудянов А.И., Безрукова И.В., Ерохин А.И. Клинико-лабораторная оценка эффективности лечения пациентов с быстро прогрессирующим пародонтитом // Пародонтология. - 2002.- № 4.- С. 13-17.

3. Зорина О.А., Борискина О.А. Взаимосвязь полиморфизма генов некоторых коллагенов с развитием заболеваний пародонта // The Scientific&Educational Bulletin "Health&Educational Millennium" №5. – 2012. – Т. 14 – С. 1–3.
4. Максимовский Ю.М. Новое понимание патогенеза болезней пародонта в свете работ о роли распознающих рецепторов // Стоматология для всех. - 2006. - № 2. - С. 24-29.
5. Сафонова А.В., Петрин А.Н., Арутюнов С.Д. Ассоциация аллелей генов цитокинов со степенью тяжести воспалительных заболеваний пародонта у человека // Acta Naturae. - 2011. - Т. 3, № 1 (8). - С. 123–129.
6. Царев В.Н. Перспективы применения молекулярно-генетических методов исследований в диагностике пародонтита // Российский стоматологический журнал. - № 5. -2002. - С. 6-9.
7. Царев В.Н., Николаева Е.Н. Полиморфизм генов ИЛ1 α и ИЛ1 β и бактериальная инвазия у больных хроническим генерализованным пародонтитом // Стоматология. – 2010. - № 6. - С. 19 – 23.
8. Boodram L.L. Extraction of genomic DNA from whole blood / Protocol Online - Your Lab's Reference Book – online database of research protocols in a variety of life science fields [Electronic resource]. – 1999-2006. – Mode of access: <http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/Extraction-of-genomic-DNA-from-whole-blood-3171.html>
9. Goth L., Nagy T., Kosa Z. Effects of rs769217 and rs1001179 polymorphisms of catalase gene on blood catalase, carbohydrate and lipid biomarkers in diabetes mellitus // Free Radic Res. – 2012. – Vol. 46 (10). – P. 1249–1257.
10. Laine M.L., Loos B.G., Crielaard W. Gene polymorphisms in chronic periodontitis // International Journal of Dentistry. – 2010 – P. 1 – 22.
11. Rosenblum J., Gilula N. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – № 9. – P. 4471–4473.
12. Sharma A., Pandey A., Sharma S., Chatterjee I., Mehrotra R., Sehgal A., Sharma J. K. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) in Delhi population and comparison with other global populations // Meta Gene. –2014. - № 2. – P. 134-142.

Рецензенты:

Генинг Т.П., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой физиологии и патофизиологии Института медицины, экологии и физической культуры ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск;

Саушев И.В., д.м.н., профессор кафедры анестезиологии и реаниматологии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», г. Саранск.