

АНАЛИЗ АССОЦИИ ВАРИАНТНЫХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА ИЛ-1В (511 С/Т) НА ПАТОГЕНЕЗ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА У БОЛЬНЫХ С ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЖЕЛУДКА И ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ

Исамулаева А.З.¹

¹ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, г Астрахань, Россия, e-mail: agma@astranet.ru

Поражение тканей пародонта относится к мультифакторным заболеваниям во взаимодействии экзогенных факторов с наследственной предрасположенностью, включающей особенности иммунного ответа и определенный тип метаболизма. Учитывая системный характер воспаления и выявленное в ходе анализа фенотипическое влияние данного полиморфизма на течение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, рассмотрено влияние аллелей и генотипов гена ИЛ-1b (511 С/Т) на поражение тканей пародонта. Проведенный молекулярно-генетический анализ полиморфизмов позволяет утверждать, что изучение клинической динамики патологий пародонта на фоне язвенно-эрозивных поражений желудочно-кишечного тракта является генетической гетерогенностью, определяющейся как этнической неоднородностью групп больных, так и полиморфизмом клинических форм и вариантов прогрессирования заболеваний. Это дает возможность на этапе диагностики воспалительных заболеваний пародонта обосновать проведение иммунокорректирующей терапии, способной оказать решающее воздействие на адекватное протекание защитных реакций и элиминацию патогена.

Ключевые слова: заболевания пародонта, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциации вариантных аллелей, молекулярно-генетический метод, полиморфизм генов

ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF VARIANT ALLELES OF IL-1B (511 C / T) IN THE PATHOGENESIS OF PERIODONTAL DISEASE IN PATIENTS WITH GASTRIC ULCER AND DUODENAL ULCER

Isamulaeva A.Z.¹

¹Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia, e-mail: agma@astranet.ru

The defeat of the periodontal tissues related to multifactorial diseases in the interaction of exogenous factors and genetic predisposition, which includes features of immune response and a specific type of metabolism. Given the systemic nature of inflammation and revealed during the analysis of the phenotypic effect of this polymorphism on the course of gastric ulcer and duodenal ulcer the influence of alleles and genotypes of IL-1b (511 / T) on the destruction of periodontal tissue. Molecular genetic analysis of the polymorphisms suggests that the study of the dynamics of clinical periodontal pathology on the background of ulcerative erosive lesions of the gastrointestinal tract is the genetic heterogeneity is defined as ethnically mixed groups of patients, and polymorphism of clinical forms and variants of the disease progression. It makes it is possible to stage diagnosis inflammatory periodontal diseases justify holding immunokorrigirujushchej therapy that can have a decisive impact on the course of adequate protective reactions and elimination of the pathogen.

Keywords: periodontal disease, gastric ulcer and duodenal ulcer, the association of variant alleles, molecular genetic methods, gene polymorphism

Дисбаланс в продукции белков семейства ИЛ-1 может влиять на характер течения воспалительных и воспалительно-деструктивных заболеваний в тканях пародонта и являться одним из пусковых моментов для генерации патологических процессов при заболеваниях полости рта на фоне сопутствующей соматической патологии [2, 3, 5, 6].

Активность продукции ИЛ-1 закодирована двумя отдельными генами, такими как интерлейкин-1-альфа (ИЛ-1 α) и интерлейкин-1 бета (ИЛ-1 β), размещенными в локусе хромосомы 2q14 (q13-21), в кластере такого также имеется ген антагониста рецептора ИЛ-1

(IL-1Ra) [8, 9]. Функциями последнего являются антагонизм рецептора IL-1 и блокада биологических эффектов IL-1 α и IL-1 β соответственно. В результате этого гены цитокинов регулируют характер иммунного ответа и активность воспалительных реакций организма в ответ на эндогенные и экзогенные факторы. Наиболее изучены биаллельные полиморфизмы IL-1 β в позициях -511, -31 и +3954, что есть однонуклеотидные транзиции [7].

Поскольку -511С/Т-полиморфизм гена IL-1 β (id.:rs16944) играет важную роль в работе иммунной системы и может быть одной из главных генетически обусловленных причин выраженной дисрегуляции воспаления, он оказывает существенное влияние на общие особенности протекания воспалительного ответа в тканях пародонта у пациентов с язвенной болезнью желудка (ЯБЖ) и двенадцатиперстной кишки (ЯБДК), принадлежащих к разным национальностям и проживающих в Астраханской области. Для оценки влияния гена IL-1 β на динамику заболеваний пародонта на фоне ЯБЖ и ЯБДК был проведен анализ ассоциаций клинических проявлений с полиморфными вариантами указанного гена, с изучением частоты исследуемого полиморфизма в выборках больных и здоровых доноров.

Цель исследования

Проанализировать распределение аллельных вариантов гена IL-1 β (511 С/Т) у больных с поражением пародонта при ЯБЖ и ЯБДК и здоровых доноров.

Материалы и методы исследования

Было обследовано 100 больных с воспалительными заболеваниями пародонта (ВЗП): в сочетании с ЯБЖ — 60 человек и ЯБДК — 40 человек в возрасте от 19 до 45 лет, находящихся на лечении в гастроэнтерологическом отделении МУЧ «Городская клиническая больница № 3 им. С.М. Кирова» г. Астрахани в период с 2012 по 2015 гг. Группу сравнения составили 117 здоровых доноров. Для оценки состояния пародонта нами использовалась модифицированная классификация ВЗП, принятая на заседании секции Президиума пародонтологии Стоматологической Ассоциации России в 2001 г. Диагноз «язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки» устанавливался согласно действующим стандартам клинической диагностики и существующей Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ 10). При выполнении исследования соблюдены этические принципы, получены письменные согласия пациентов на обработку персональных данных (№ 152-ФЗ) и на обследование, а также на проведение медицинского вмешательства.

Стоматологическое обследование включало определение интенсивности поражения зубов кариесом по индексу КПУ (К — кариозный зуб, П — пломбированный, У — удаленный), уровень гигиены по упрощенному индексу Грина—Вермильона (ОНИ-S). Состояние тканей пародонта оценивали на основании папиллярно-маргинально-

альвеолярного индекса (РМА) в модификации Parma, воспалительно-деструктивные изменения в пародонте – при помощи пародонтального индекса РІ по Расселу.

В результате поиска однонуклеарных полиморфных замен с предполагаемым фенотипическим эффектом в промоторных и интронных областях с помощью методов биоинформатики выделен VNTR полиморфизм в гене антагониста IL-1. Выделение геномной ДНК проводилось из лейкоцитов венозной крови набором реактивов «Wizard Genomic DNA Purification Kit» фирмы «Promega» (USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) синтеза ДНК проводили на амплификаторе фирмы «ДНК-технология» (Россия). Проводили реакцию амплификации по соответствующей программе. Концентрации хлорида магния и олигонуклеотидных праймеров подбирались для каждой реакции отдельно в ходе эксперимента. Для определения нуклеотидных замен проводили гидролиз амплифицированных фрагментов соответствующей рестриктазой. Используемые ферменты произведены фирмой «Сибэнзим» (Россия) или МБИ «Fermentas» (Литва). Разделение фрагментов ДНК после амплификации и рестрикции проводили при помощи электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ). Идентификация фрагментов ДНК проводилась с помощью окрашивания геля раствором бромистого этидия (5 мкг/л) с последующей визуализацией в проходящем УФ-свете и документацией, с использованием системы фотодокументации «Vilber Lourmat» (Франция). Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием параметрической и непараметрической статистики в зависимости от шкал и характера распределения переменных.

Достоверность различий количественных признаков определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента для сравнения независимых выборок. Результаты рассматривали как статистически значимые при $p < 0,05$. Математическую обработку результатов исследования проводили с использованием описательных статистик: Me (медиана) и Q1–Q3 (quartile 1–3). Для определения достоверности различий качественных признаков использовали анализ таблиц сопряженностей с вычислением точного значения критерия χ^2 и точного критерия Фишера. Для анализа количественных признаков при сравнении двух независимых выборок применяли критерий Манна–Уитни, при сравнении трех и более выборок — *H*-критерий Краскола–Уоллиса. При достоверности межгрупповых различий проводили попарные сравнения с использованием *Z*-критерия Краскола–Уоллиса с поправкой на множественные сравнения. Достоверным считался уровень значимости $p < 0,05$. Сравнение распределения генотипов и частот аллелей проводили с помощью критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность при числе степеней свободы, равном 1, а также точный тест Фишера в случае, если ожидаемое значение хотя бы в одной ячейке таблицы сопряженности было меньше 5.

Подсчитывали отношение шансов (OR — odd ratio) для оценки ассоциации между определенными генотипами и риском развития заболевания, по стандартной формуле $OR = a/b \times d/c$, где a и b — количество больных, имеющих и не имеющих мутантный генотип, соответственно, и d и c — количество человек в контрольной группе, имеющих и не имеющих мутантный генотип. OR указан с 95%-ным доверительным интервалом (Confidence interval CI) [4]. Расчет критериев проводился с использованием пакета «Statistica 6.0».

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе исследования выявлено, что достоверных различий по частоте встречаемости аллелей и генотипов между основной группой и группой контроля нет. А именно генотип С/С встречался в 11,0% и 20% ; С/Т : 45,0% и 43%; гомозиготное состояние аллеля Т 44,0% и 37,0% соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Распределение аллельных вариантов гена ИЛ-1b (511 С/Т) у больных с поражениями пародонта при ЯБЖ и ЯБДК и здоровых доноров

Генотипы	Больные	Контроль	χ^2
	(N=100)	(N=117)	
СТ	45 (0,45)	50 (0,43)	$\chi^2 = 3,263; p > 0,05$
СС	11 (0,11)	23 (0,20)	
ТТ	44 (0,44)	44 (0,37)	
Аллели	n=145	n=167	χ^2
С	56 (0,387)	73 (0,437)	$\chi^2 = 0,877 p > 0,05$
Т	89 (0,613)	94 (0,563)	

Достоверных различий по частоте встречаемости мутантного аллеля Т между пациентами с ВЗП на фоне эрозивно-язвенного поражения желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и соматически здоровыми донорами не выявлено (61,3% и 56,3% ($p > 0,05$)).

Группы обследуемых больных с различными генотипами по полиморфизму 511 С/Т гена ИЛ-1b не отличались по полу, возрасту, месту проживания, локализации язвенного дефекта (табл. 2, 3, 4,5). Статистический анализ данных показал, что достоверных гендерных различий между пациентами с «диким» и мутантным аллелем не выявлено.

Анализ выявил достоверные гендерные различия между носителями различных генотипов по полиморфизму 511 С/Т гена ИЛ-1b, а именно: наблюдается достоверное превосходство мужчин, носителей нормального аллеля С в гомозиготном состоянии, над женщинами, с поражениями пародонта при язвенно-эрозивных изменениях желудка и двенадцатиперстной кишки ($\chi^2 = 8,51; P = 0,035$) (табл. 2).

Таблица 2

Распределение больных по полу в группах с различными аллелями и генотипами по полиморфизму 511 С/Т гена ИЛ-1b

Пол	511 С/Т			χ^2	P (d.f.=2)	
	1.С/С	2.С/Т	3.Т/Т			
Женщины	2	29	28	8,52	0,043	
				$\chi^2_{21}=8,51$	0,035	
Мужчины	9	16	16	$\chi^2_{22}=1,11$	0,316	
				$\chi^2_{23}=1,01$	0,306	
Пол	511 С/Т				χ^2	P (d.f.=1)
	Аллель С		Аллель Т			
	N	%	N	%		
Женщины	31	35,2	57	64,8	1,09	>0,05
Мужчины	25	43,8	32	56,2		

Достоверных гендерных различий по генотипам С/Т и Т/Т между пациентами не выявлено.

Таблица 3

Распределение по месту проживания больных с различными генотипами по полиморфизму 511 С/Т гена ИЛ-1b

Место проживания	511 С/Т			χ^2	P (d.f.=2)
	С/С	С/Т	Т/Т		
Астрахань	27,5 %	20,5 %	21,9 %	0,361	>0,05
Астраханская область, другие города	72,5 %	79,5 %	78,1 %		

Таблица 4

Средний возраст обследованных больных с различными генотипами по полиморфизму 511 С/Т гена ИЛ-1b

	511 С/Т			χ^2	P
	С/С	С/Т	Т/Т		
Средний возраст обследуемых больных	27,37±2,67	32,8±5,78	33,02±6,7	0,311	>0,05

Таблица 5

Анализ локализации язвенного дефекта с различными генотипами по полиморфизму 511 С/Т гена ИЛ-1b

Локализация язвенного дефекта	511 С/Т			χ^2	P(d.f.=2)	
	С/С	С/Т	Т/Т			
ЯБЖ	8	25	27	1,51	0,76	
ЯБДК	3	17	12			
Локализация язвенного дефекта	511 С/Т				χ^2	P (d.f.=1)
	Аллель С		Аллель Т			
	N	%	N	%		
ЯБЖ	33	38,8	52	61,2	0,05	0,82
ЯБДК	20	40,8	29	59,2		

Анализ данных свидетельствует о том, что у пациентов с генотипом Т/Т достоверно чаще по сравнению больными с генотипом С/С выявлялось обострение процесса ($\chi^2=7,234$ P=0,0072) (табл. 6).

Таблица 6

Анализ динамики течения ЯБЖ и ЯБДК у больных с поражениями пародонта

	511 С/Т			χ^2	P(d.f.=2)	
	1.С/С	2.С/Т	3.Т/Т			
Ремиссия	8	18	12	7,12	0,033	
				χ^2	P(d.f.=1)	
Впервые диагностировано, обострение	3	27	30	$\chi^2_{21-2}=3,81$	0,05	
				$\chi^2_{22-3}=1,26$	0,24	
Впервые диагностировано, обострение	30	50,0	30	$\chi^2_{21-3}=7,23$	0,0072	
	511 С/Т				χ^2	P(d.f.=1)
	Аллель С		Аллель Т			
	N	%	N	%		
Ремиссия	26	38,6	30	61,4	0,11	>0,05
Впервые диагностировано, обострение	30	50,0	30	50,0		

Резюмируя полученные результаты, можно утверждать, что сочетание ЯБЖ И ЯБДК встречалось только у пациентов с генотипами С/Т (6 пациентов) и Т/Т (8 пациентов). Комбинация сахарного диабета и язвенной болезни была выявлена у 5 больных с указанными генотипами. Причем у четверых из них был определен генотип Т/Т.

В настоящее время показано, что нуклеотидные замены в генах *IL1B* могут приводить к изменению характера их экспрессии цитокинов. Согласно литературным данным наличие мутантного аллеля Т в гомо- или гетерозиготном состоянии, в генотипе ассоциируется с повышением уровня кодируемого цитокина и более агрессивным течением системного

воспалительного процесса [1, 3]. Таким образом, полученные результаты мы сопоставляем с высокой системной экспрессией ИЛ-1b, ассоциированной с заменой тимина на цитозин в 511-м положении, что клинически обуславливает характер течения, воспалительно-деструктивные изменения и наличие интеркуррентного заболевания (сахарный диабет).

В ходе исследования установлено, что пациенты с различными генотипами по полиморфизму 511 С/Т гена ИЛ-1b не отличаются по частоте наследования ЯБЖ и / или ЯБДК. Подобная тенденция наблюдается и при сравнении по аллелям (табл. 7).

Таблица 7

Частота наследования ЯБЖ и/или ЯБДК у пациентов с различными генотипами по полиморфизму 511 С/Т гена ИЛ-1b

Наследственность	511 С/Т			χ^2	P(d.f.=2)	
	С/С	С/Т	С/С			
Выявлена	3	14	13	0,767	>0,05	
Не выявлена	8	31	29			
Наследственность	511 С/Т				χ^2	P(d.f.=1)
	Аллель А1		Аллель А2			
	N	%	N	%		
Выявлена	26	76,4	8	23,6	0,028	>0,05
Не выявлена	53	77,9	15	22,1		

Учитывая значение данного цитокина в патогенезе воспалительного процесса, можно предположить модифицирующее влияние мутаций в гене ИЛ-1b на клинические проявления заболеваний полости рта.

Согласно полученным данным достоверных различий между генотипами, а также аллелями С и Т по видам прикуса не было выявлено (табл. 8).

Таблица 8

Сравнительная характеристика видов прикуса у пациентов с различными генотипами по полиморфизму 511 С/Т гена ИЛ-1b

Виды прикуса	511 С/Т			χ^2	P(d.f.=2)
	1.С/С	2.С/Т	3.Т/Т		
Патологический	3	11	13	0,461	0,74
Физиологический	8	34	29		
Виды прикуса	511 С/Т			χ^2	P(d.f.=1)

	Аллель С		Аллель Т		0,21	0,65
	N	%	N	%		
Патологический	14	38,8	24	61,2		
Физиологический	42	40,0	63	60,0		

Согласно полученным данным катаральный гингивит в 2 раза чаще встречается у носителей аллеля Т, однако степень достоверности на уровне 10% (табл. 9).

Таблица 9

Анализ частоты встречаемости гингивита у больных с различными генотипами по полиморфизму 511 С/Т гена ИЛ-1b

Гингивит	511 С/Т			χ^2	P(d.f.=2)	
	С/С	С/Т	Т/Т			
Катаральный	3	18	23	4,197	0,101	
Гипертрофический	1	8	2			
Гингивит	511 С/Т				χ^2	P(d.f.=1)
	Аллель С		Аллель Т			
	N	%	N	%		
Катаральный	21	33,8	41	67,2	1,1	>0,05
Гипертрофический	9	48,7	10	51,3		

Возможно, данная тенденция ассоциирована с большей экспрессией цитокина и степенью воспаления.

Данные статистического анализа не выявили влияния генотипов на тяжесть течения пародонтита у больных с ЯБЖ И ЯБДК (табл. 10).

Таблица 10

Распределение различных генотипов по полиморфизму 511 С/Т гена ИЛ-1b у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом от степеней тяжести

Степень тяжести	511 С/Т			χ^2	P(d.f.=4)	
	С/С	С/Т	Т/Т			
Легкая	4	10	5	4,812	>0,05	
Средняя	2	9	8			
Тяжелая	1	1	3			
Степень тяжести	511 С/Т				χ^2	P(d.f.=2)
	Аллель С		Аллель Т			
	N	%	N	%		
Легкая	18	62,5	4	37,5	1,517	>0,05
Средняя	14	45,0	3	55,0		

Тяжелая	5	28,5	3	61,5		
---------	---	------	---	------	--	--

Несмотря на то что в ходе работы были выявлены ассоциации генотипов, содержащие мутантный аллель Т с течением ЯБЖ и ЯБДК, у обследованных больных не были определены достоверные различия по основным стоматологическим критериям (индексу КПУ, ОНI-S, РМА, ПИ) и между С/С, С/Т, Т/Т генотипами ИЛ-1b (табл. 11).

Таблица 11

Показатели индексов КПУ, ОНI-S, РМА и ПИ у больных хроническим генерализованным пародонтитом при ЯБЖ и ЯБДК с разными генотипами ИЛ-1b

Показатели	С/С	С/Т	Т/Т	Н-критерий Краскола–Уоллиса
КПУ	6,0 (5,0–8,0)	5,0 (2,0– 9,0)	5,0 (2,0–10,0)	χ^2 3,29; p=0,11
ОНI-S	2,1 (1,5–4,4)	2,1 (1,5–3,2)	2,9 (2,2–4,3)	χ^2 2,51; p=0,283
РМА	11,1 (4,7–15,4)	15,9 (3,2–25,3)	6,5 (3,1–21,0)	χ^2 2,65; p=0,264
ПИ	1,1 (0,17–3,61)	0,29 (0,23–2,8)	1,2 (0,27–3,8)	χ^2 2,23; p=0,326

Возможно, мутантный аллель Т оказывает больше системный эффект, что обеспечивает реализацию соматического недуга, нежели влияет на местный иммунный ответ в тканях пародонта при язвенно-эрозивных поражениях желудка и двенадцатиперстной кишки.

Заключение

Таким образом, полиморфизм 511 С/Т гена ИЛ-1b не может рассматриваться как предиктор воспалительных заболеваний пародонта. В то же время указанные полиморфизмы могут быть положены в основу комплексной генетической карты для прогнозирования течения ЯБЖ и ЯБДК.

Список литературы

1. Громова А.Ю., Симбирцев А.С. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека // Цитокины и воспаление. – 2005. – № 5. – С. 10–12.
2. Иммуноterapia беталейкином в комплексном лечении больных гнойным риносинуситом с затяжным и хроническим течением: Метод. рекомендации РФ / Под ред. Ю.К.Янова – СПб., 2008. – 22 с.
3. Киселева Е.А. Фенотипическая роль полиморфизма генов цитокинов при хронических воспалительных и неопластических стоматологических заболеваниях / Е.А. Киселева, А.З.

Элбакидзе, О.Ю. Николаева // Цитокины и воспаление. – 2011. – Т.10, № 4. – С. 52–55.

4. Медик В.А., Токмачев М.С. Математическая статистика в медицине: учебное пособие / В. А. Медик, М. С. Токмачев. — М.: Финансы и статистика, 2007. — 800 с.

5. Царёв В.Н., Николаева Е.Н. Аллельный полиморфизм генов ИЛ-1 альфа и ИЛ-1 бета у больных с хроническими воспалительными заболеваниями пародонта // Вестник Российской Академии медицинских наук. — 2007. — № 3. — С. 43–47.

6. El Omar E.M., Carrington M., McColl K.E., Bream J.H., Young H.A. (et al). Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature-2001; 404, 398–402.

7. Martinez-Carrillo DN, Garza-Gonzalez E, Betancourt-Linares R, Monico-Manzano T, Antunez-Rivera C, Roman-Roman A, Flores-Alfaro E, Illades-Aguar B, Fernandez-Tilapa G. Association of IL1B -511C/-31T haplotype and Helicobacter pylori vacA genotypes with gastric ulcer and chronic gastritis. BMC Gastroenterol. 2010;10: 126–132.

8. Sainz J, Perez E, Gomez-Lopera S, Jurado M. IL1 gene cluster polymorphisms and its haplotypes may predict the risk to develop invasive pulmonary aspergillosis and modulate C-reactive protein level. J Clin Immunol. 2008;28: 473–485.

9. Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, Jeggo P, Sim RB. The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1a and IL-1b loci. Genomics. 1992;13:654–657.

Рецензенты:

Башкина О.А., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой факультетской педиатрии ГБОУ ВПО «Астраханский ГМУ Минздрава России», г. Астрахань;

Сергиенко Д.Ф., д.м.н., доцент, доцент кафедры факультетской педиатрии ГБОУ ВПО «Астраханский ГМУ Минздрава России», г. Астрахань.