

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕРМИНАЦИЯ ТКАНЕВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ПАРОДОНТА И ЗУБНОЙ ЭМАЛИ У НАСЕЛЕНИЯ ОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Горбунова И.Л.<sup>1</sup>, Лукашевич И.К.<sup>2</sup>, Ефименко А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, Омск;

<sup>2</sup>БУЗОО «Городская поликлиника № 10» г. Омска, Омск, e-mail: I.lukashevitch@yandex.ru

Актуальной проблемой фундаментальной стоматологии является поиск принципиально новых подходов к разработке методов ранней донозологической диагностики воспалительных заболеваний пародонта и кариеса зубов. В этом смысле поиск эквивалентов между клиническими показателями тканевой резистентности полости рта, основанных на молекулярно-генетических механизмах регуляции, и выраженностью патологического процесса в пародонте и зубной эмали, атрибутированной посредством общеизвестных клинических индексов, может быть весьма эффективен. Хронический генерализованный пародонтит сопровождается повышением мутантного аллеля G/G гена TNF- $\alpha$  при G(-308)→A, а также полиморфизмов 1/1 и 1/2 генов TLR-2 Arg(-753)→Gly; TLR-4 Asp(-299)→Gly и TLR-6 Ser(-249)→Pro, выбранных в качестве генетических маркеров воспаления в пародонте. Установлены ассоциации клинических показателей тяжести воспаления в пародонте с полиморфизмами изученных генов-кандидатов. Наличие указанных полиморфизмов у больных хроническим генерализованным пародонтитом является иммуно-опосредованной причиной более продолжительного воспалительного ответа. Резистентность зубной эмали определяется уровнем выработки полиморфизма гена *KLK-4*, ферментирующего её созревание. При профилактике кариеса зубов критериями для формирования групп диспансерного наблюдения среди населения Омской области является наличие полиморфизмов «A/A» и G/A, гена *KLK4*. При выявлении указанных полиморфизмов необходимо увеличить кратность и объём профилактических мероприятий с целью предотвращения развития кариеса зубов.

Ключевые слова: хронический генерализованный пародонтит, кариес зубов, резистентность, полиморфизмы генов провоспалительных цитокинов, ген каллекреина-4.

## GENETIC DETERMINING OF PERIODONTIUM TISSUE RESISTANCE AND TOOTH ENAMEL AMONG THE OMSK REGION POPULATION

Gorbunova I.L.<sup>1</sup>, Lukashevich I.K.<sup>2</sup>, Efimenko A.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SEI HPE "Omsk state medical University of the Health Ministry of Russia", Omsk;

<sup>2</sup>BHI "Municipal Polyclinic № 10", Omsk, e-mail: I.lukashevitch@yandex.ru

The urgent problem of the fundamental dentistry is searching the essentially new approaches to develop some early-stage preclinical diagnosis of inflammatory periodontal diseases and dental caries methods. In this sense searching for equivalents between clinical indicators of the oral cavity tissue resistance based on the molecular and genetic mechanisms of regulation, and the severity of the pathological process in periodontium and tooth enamel attributed by the well-known clinical indices is highly likely to be very effective. Chronic generalized periodontitis is followed by increasing the mutant allele G/G of TNF- $\alpha$  gene in G(-308)→A as well as by polymorphisms 1/1 and 1/2 of TLR-2 Arg(-753)→Gly; TLR-4 Asp(-299)→Gly, and TLR-6 Ser(-249)→Pro genes to have been selected as the genetic markers of inflammation in the periodontium. The clinical parameters associations of inflammation severity in periodontium with the polymorphisms of the investigated candidate genes have been established. The presence of these polymorphisms in patients with chronic generalized periodontitis may be considered to be an immune-mediated cause of a prolonged inflammatory response. The resistance of tooth enamel was found to be determined by level of producing the gene *KLK-4* polymorphism to ferment its maturation. In order to prevent dental caries the criteria to be used for setting up dispensary observation groups among the Omsk region population are the "A/A" and G/A polymorphisms of *KLK4* gene presence. By identifying the indicated polymorphisms the volume and multiplicity of preventive measures are necessary to be increased in order to prevent the development of dental caries.

Keywords: chronic generalized periodontitis, dental caries, resistance, genes polymorphisms of proinflammatory cytokines, kallikrein-4 gene.

Современный уровень представлений о патогенезе хронического генерализованного

пародонтита и кариеса зубов определяет эти заболевания как результирующую взаимодействия «инфект-хозяин» [3,5,1]. При этом баланс между бактериальной инвазией и локальной резистентностью полости рта рассматривается в качестве основного фактора, определяющего клинические проявления.

Под факторами тканевой резистентности понимают совокупность генетически детерминированных защитных механизмов, обуславливающих невосприимчивость к инфекции, которые выступают в качестве первых защитных «барьеров», при патогенном воздействии микрофлоры. 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).

Тканевые реакции в полости рта, запущенные бактериальной колонизацией и сопровождающиеся изменениями метаболических процессов на уровне клеток-«мишеней» и тканей, лежат в основе клинических проявлений пародонтита. Хорошо известно, что при кариесе зубов также существует генетическая предрасположенность [2,4,10]. Однако до сих пор не изучены какие-либо факторы, напрямую связанные с наследственностью кариеса. С другой стороны, совершенно достоверно, что кариес зубов является типичной болезнью цивилизации и зависит от ряда факторов, связанных с этим явлением [6]. Исходя из этого, генетическую обусловленность кариеса необходимо рассматривать с позиций наследуемости физико-химических, анатомических и морфологических особенностей зубных тканей, количественного и качественного соотношения в них апатитов, состава микроэлементов и т.д. В литературе описано влияние полиморфизмов гена калликреина-4 (*KLK-4*) на формирование физико-химических параметров зубной эмали [7,8].

**Цель** настоящего исследования: обоснование генетической детерминации тканевой резистентности пародонта и зубной эмали у населения Омской области.

#### **Материалы и методы исследования**

В соответствии с поставленной целью нами изучались особенности реализации пародонтита и кариеса среди населения Омской области, сделана попытка найти различия в локальной тканевой резистентности полости рта обследуемых лиц и дать генетическое обоснование возможным различиям. Для этого было проведено клиническое обследование 205 человек в возрасте 25–45 лет. Средний возраст обследованных составил  $34,9 \pm 0,2$  года. Все обследованные были разделены по нозологическому принципу на три исследовательских группы. Первую группу составили лица обоего пола, имеющие патологию пародонта воспалительного характера, но не имеющие кариеса зубов на момент обследования. Всего 76 человек (46 мужчин и 30 женщины). Вторая исследовательская группа включала лиц обоего

пола, имеющих множественный кариес и его осложнения с поражением зубов всех функционально ориентированных групп при интактном пародонте (65 человек: 27 мужчин и 38 женщин). Группу сравнения составили лица, не имеющие на момент обследования кариозных полостей и клинически выраженных признаков воспаления тканей пародонта (отсутствие отёка, гиперемии) – 64 человека: 44 мужчины и 20 женщин. При стоматологическом обследовании использовались общепринятые методы (анамнез, осмотр, зондирование, при необходимости рентгенографический контроль, а также индексы ПМА, кровоточивости SBI, PI и КП).

Молекулярно-генетические исследования выполнены с использованием образцов ДНК, выделенных из венозной крови обследованных индивидов. Использовались праймеры, входящие в стандартный набор «Литех».

Нами была проведена оценка факторов тканевой резистентности полости рта при хроническом генерализованном пародонтите с молекулярно-генетических позиций, путём определения экспрессии генов, регулирующих воспалительную реакцию. Генотипирование проводилось по полиморфизмам A/A; G/A, G/G гена фактора некроза опухоли TNF- $\alpha$  при G(-308) $\rightarrow$ A; 1/1, 1/2 и 2/2 генов рецепторов TLR-2 при Arg(-753) $\rightarrow$ Gly; TLR-4 при Asp(-299) $\rightarrow$ Gly и TLR-6 при Ser(-249) $\rightarrow$ Pro.

Тканевая резистентность зубов определялась путём генотипирования по полиморфизмам -T2664152G,-G2664153A и -G2142G гена каллекреина-4 (*KLK-4*). *KLK-4* является основным ферментом стадии созревания зубной эмали и отвечает за замещение белковой матрицы на минералы и формирование правильной организации кристаллов [8]. Темп минерализации эмали при дефекте *KLK-4* в целом ниже на 25 % [7]. Влияние мутаций гена *KLK-4* проявляется в нарушении минерализации кристаллов гидроксиапатита и увеличении остаточного количества белка в эмали [7].

### **Результаты исследования**

При проведении стоматологического обследования населения Омской области было установлено, что частота распространения основных стоматологических заболеваний (кариеса и пародонтита) в возрасте 25–45 лет достаточно высока. Однако при оценке гигиенического состояния полости рта лиц, составляющих исследовательскую когорту, было установлено, что у 97 % обследованных на момент первичного осмотра гигиена полости рта была хорошей. Так, среди больных кариесом средние значения ОНІ-S [9] соответствовали 0,97 баллам, у больных пародонтитом – 1,98 баллам. При этом не удалось выявить статистически значимых отличий по показателю индекса гигиены ОНІ-S между пациентами всех обследуемых групп и лиц, составляющих группу сравнения ( $p > 0,05$ ).

В когорте обследованных был оценён аллельный полиморфизм гена TNF- $\alpha$  в позиции

308. Полученные данные представлены в таблице 1. При генотипировании в позиции -308 были обнаружены все возможные вариации (A/A; G/A, G/G) гена TNF- $\alpha$ . При этом у больных пародонтитом отмечается статистически значимое ( $p < 0,001$ ) увеличение генотипа G/G по отношению к частоте G/G в группе сравнения. Гомозиготный полиморфизм по мутантному аллелю G/G гена TNF- $\alpha$  при G(-308) $\rightarrow$ A у лиц группы сравнения встречается в 1,8 % случаев, а в группе больных пародонтитом этот вариант гена имели 9,7 % пациентов. Кроме того, почти в 3 раза больше среди больных пародонтитом лиц с гетерозиготным сочетанием этого гена. Отсутствие генотипа G/G (гомозигота по мутантному аллелю) гена TNF- $\alpha$  в группе сравнения, по всей видимости, предопределяет резистентность тканей пародонта к развитию воспаления при воздействии равных экзо- и эндогенных факторов.

Анализ полиморфизма молекул TLR-2Arg(-753) $\rightarrow$ Gly; TLR-4 Asp(-299) $\rightarrow$ Gly и TLR-6 Ser(-249) $\rightarrow$ Pro- рецепторов при пародонтите выявил значительное преобладание полиморфизмов 1/1 и 1/2. Были установлены ассоциации данных полиморфизмов с клиническими параметрами, отражающими более высокие значения основных показателей воспаления в пародонте (табл. 2).

Таблица 1

**Распределение генотипов TNF- $\alpha$  среди больных пародонтитом  
и пациентами группы сравнения**

Группа обследуемых	Всего % (численность)	Частота генотипа, % (численность)			Частота аллеля, %	
		G/G	G/A	A/A	G	A
Группа сравнения	100,0 (64)	1,3 (8)	16,1 (23)	3,6 (4)	37,2 (214)	64,9 (286)
Пародонтит	100,0 (76)	82,3 (51)	70,1(63)	1,9 (1)	48,6 (265)	39,9 (224)
Всего:	100,0 (140)	79,0 (218)	19,2 (53)	1,8 (5)	40,7 (233)	57,2 (246)

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. sided .
Pearson C	519	2	.001
Likelihood Ratio	535	2	.001
N of Valid Cases	27		

a. 1 cells (16.7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.88

**Ассоциации полиморфизмов генов TLR-2Arg(-753)→Gly; TLR-4 Asp(-299)→Glyи TLR-6 Ser(-249)→Pro  
с клиническими показателями состояния тканей пародонта**

Некоторые клинические показатели состояния тканей пародонта	Toll-like - рецепторы								
	TLR-2(n=97)			TLR-4(n=117)			TLR-6 (n=124)		
	1/1(n=62)	1/2 (n=21)	2/2 (n=14)	1/1 (n=74)	1/2 (n=33)	2/2 (n=10)	1/1 (n=79)	1/2 (n=32)	2/2 (n=13)
Индекс ПМА (%)	42,17±9,9 6	32,56±7,39	37,34±9,71,	37,19±8,24	33,25±8,85	11,47±6,58, p<0,001	39,43±6,1 6	40,66±7,2 2	9,55±6,13, p<0,001
Индекс кровоточивости (балл)	2,94±0,33	2,69±0,26	2,08±0,41	1,98±0,12	2,06±0,21	0,35±0,07, p<0,001	1,67±0,18	1,88±0,10	0,26±0,04, p<0,001
Индекс PI (балл)	4,28±0,51	3,99±0,35	3,09±0,16	3,65±0,32	3,19±0,24	2,81±0,27	3,87±0,29	3,61±0,14	1,94±0,12 p<0,05
КП Fucsh (балл)	0,59±0,04	0,38±0,05	0,46±0,09	0,64±0,02	0,43±0,08	0,55±0,04	0,43±0,07	0,48±0,03	0,42±0,06

Примечание: ДляTLR-2: 1/1 - Arg753Arg; 12 -Arg753Gly; 22 -Gly753Gly;

Для TLR-4: 11 – Asp299Asp; 12 -Asp299Gly; 22 - Gly299Gly;

ДляTLR-6: 11 – Ser249Ser; 12 -Ser249Pro; 22 -Pro249Pro.

Коэффициент значимости р- рассчитан по отношению к гомозиготному (2/2) полиморфизму гена TLR-2.

Выявлено, что частота встречаемости 1/1 и 1/2 генотипов генов TLR-2Arg(-753)→Gly; TLR-4 Asp(-299)→Gly и TLR-6 Ser(-249)→Pro сопряжена с повышенными значениями индексов РМА и SBI (табл. 2). Полиморфизм 2/2 ассоциирован с повышенными значениями указанных индексов только при генотипировании по TLR-2Arg(-753)→Gly. Анализ полученных результатов показал, что пациенты с полиморфизмами 1/1 и 1/2 генов TLR-2Arg(-753)→Gly; TLR-4 Asp(-299)→Gly и TLR-6 Ser(-249)→Pro имеют более высокие значения основных показателей воспаления в пародонте. Представленные данные свидетельствуют о влиянии полиморфизмов 1/1 и 1/2 генов TLR-2Arg(-753)→Gly; TLR-4 Asp(-299)→Gly и TLR-6 Ser(-249)→Pro на фенотипические проявления пародонтита. Наибольшее количество больных пародонтитом имело сочетание полиморфизмов 1/1 генов TLR-2, TLR-4 и TLR-6 (97,4%). Комбинация 1/1 TLR-2 + 1/1 TLR-4 + 1/2 TLR-6 наблюдалась у 68,7 % больных пародонтитом. Вариант 1/1 TLR-2 + 1/2 TLR-4 + 1/1 TLR-6 имел место у 54,3 % больных пародонтитом. Больные пародонтитом, являющиеся носителями 1/1 TLR-2 + 1/2 TLR-4 + 1/2 TLR-6, встречались в 47,1 %. Наименьшее количество больных пародонтитом имело сочетание генотипов 1/2 TLR-2 + 1/1 TLR-4 + 1/1 TLR-6 (38,2%). Пациенты с комбинацией 1/2 TLR-2 + 1/2 TLR-4 + 1/2 TLR-6 были обнаружены лишь 2,3 % и не имели статистически значимой разницы с популяционным контролем.

При анализе генотипов аллельного полиморфизма гена *KLK4* среди больных, имеющих кариес при клинически интактном пародонте, в мутационной точке 2 (G2664153A) было зафиксировано статистически значимое ( $p < 0,01$ ) повышение частот генотипов А/А по отношению к генотипам G/G и G/A, а также значимое ( $p < 0,05$ ) преобладание патологического аллеля А, в то время как в группе сравнения была значимо ( $p < 0,01$ ) выше частота генотипа G/G (нормальная гомозигота) и преобладание нормального аллеля G ( $p < 0,05$ ).

В мутационной точке 3 (G2142A) аллельного полиморфизма гена *KLK4* у больных, имеющих кариес при клинически интактном пародонте, также отмечается статистически значимое ( $p < 0,001$ ) увеличение не только патологических гомозигот А/А по сравнению с группой сравнения, но и значительное преобладание патологического аллеля А. В группе сравнения, напротив, отмечается статистически значимое увеличение полиморфизма G/G (нормальная гомозигота) по сравнению с полиморфизмами G/A и А/А.

### **Обсуждение полученных результатов**

Выявлено, при генотипах «G/G» гена цитокина TNF- $\alpha$ , 1/1 и 1/2 генов рецепторов TLR-2; TLR-4 и TLR-6 увеличиваются значения показателей индексов РМА, SBI, PI и КП по Fucsh, отражающих процессы воспаления в тканях пародонта. В мутационной точке 2 (G2664153A) гена *KLK4* статистически значимо повышается частота генотипов А/А по

отношению к генотипам G/G и G/A, а также отмечается значимое преобладание патологического аллеля А у больных кариесом, в то время как при отсутствии кариозных полостей была значимо выше частота генотипа G/G (нормальная гомозигота) и преобладание нормального аллеля G. В мутационной точке 3 (G2142A) гена *KLK4* у больных кариесом также отмечается статистически значимое увеличение не только патологических гомозигот A/A по сравнению с лицами, не имеющими кариозных поражений, но и значительное преобладание патологического аллеля А. У лиц с интактными зубами, напротив, отмечается статистически значимое увеличение полиморфизма G/G (нормальная гомозигота) по сравнению с полиморфизмами G/A и A/A. Всё вышеперечисленное свидетельствует о том, что указанные полиморфизмы могут служить маркерами пародонтита и кариеса соответственно, что необходимо учитывать при планировании профилактических мероприятий.

### **Выводы**

1. Для персонализированного подхода к диагностике, лечению и профилактике хронического генерализованного пародонтита необходимо проведение комплексной клинико-лабораторной оценки состояния полости рта с обязательным определением полиморфизмов генов TNF- $\alpha$  G(-308) $\rightarrow$ A, TLR-2 Arg(-753) $\rightarrow$ Gly, TLR-4 Asp(-299) $\rightarrow$ Gly и TLR-6 Ser(-249) $\rightarrow$ Pro.
2. Резистентность зубной эмали определяется уровнем выработки полиморфизма гена *KLK-4*, ферментирующего её созревание. Полиморфизмы A/A и G/A гена *KLK-4* в мутационных точках G2664153A и G2142A формируют фенотип высокого риска развития кариеса зубов.
3. Критериями для формирования групп диспансерного наблюдения по кариесу зубов являются наличие полиморфизмов «A/A» и G/A, гена *KLK4*; по пародонтиту – генотипа G/G и G/A гена TNF- $\alpha$ , а также полиморфизмов 1/1 и 1/2 генов рецепторов TLR-2; TLR-4 и TLR-6. При выявлении указанных полиморфизмов необходимо увеличить кратность и объём профилактических мероприятий с целью предотвращения развития кариеса зубов и пародонтита соответственно.

### **Список литературы**

1. Боровский Е.В. Биология полости рта / Е.В. Боровский, В.К. Леонтьев. – М.: Медицина, 1991. – 302 с.
2. Волкова А.Н. Значение полиморфизма генов человека, участвующих в амелогенезе и формировании микросреды ротовой полости для развития кариеса зубов / А. Н. Волкова, Л.

- Ю. Лошакова // Мед. генетика. – 2011. – № 2. – С. 12-16.
3. Вольф Г. Пародонтология. / Г. Вольф, Э. Ратейцхак, К. Ратейцхак. Пер. с нем. под ред. проф. Г.М. Барера. – 2-е изд. – М., 2014. – 548 с.
  4. Наследственная патология эмали и дентина. Обзор молекулярно-генетических исследований / Ю.А. Беляков [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 1. – С. 8-9.
  5. Национальное руководство по пародонтологии / под ред. П.А. Дмитриева. – М., 2014. – 712с.
  6. Пахомов Г.Н. Кариес зубов и его профилактика / Г.Н. Пахомов. – Рига: Зинатне, 1976. – 126 с.
  7. Enamel proteins and proteases in Mmp20 and Klk4 null and double-null mice / Y. Yamakoshi [et al.] // Eur J Oral Sci. – 2011. – Vol.1, №119. – P.206-216.
  8. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation / Y. Lu [et al.] // Biol Chem. – 2008. – Vol. 389, № 6. – P. 695-700.
  9. Green I.C. The simplified oral hygiene index / I.C. Green, I.R. Vermillion // Amer.Dent.Ass. – 1964. – Vol.68, № 1. – P.7-13.
  10. Lau E. C. Analysis of human enamel genes: Insights into genetic disorders of enamel / E.C. Lau, H.C. Slavkin, M.L. Snead // Cleft. Palate J. – 1990. – Vol. 27, № 2. – P. 121-130.