

УДК 616.314.- 002 – 003 – 053.2

В.П. Труфанова, О.В. Шешукова, І.П. Кайдашев

**РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА МАТРИКСНОЇ
МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ-20 У ПЕРЕБІГУ КАРІЄСУ ЗУБІВ У ДІТЕЙ
НА ФОНІ ЕНДЕМІЧНОГО ФЛЮОРОЗУ**

Вищий державний навчальний заклад України

«Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Флюороз - це досить поширена хронічна хвороба зубів і скелета людини, пов'язана з надлишковим надходженням фтору в організм переважно з питною водою. Відомо, що Машівський район Полтавської області є біогеохімічним регіоном із високим рівнем фтору в питній воді, вміст фтору в ґрунтових водах коливається з роками від 2,5 до 8,2 мг/л [1].

Високі дози фторидів призводять до подвійного ефекту поширової гіпер- і гіпомінералізації емалі. Надлишок фтору порушує і кальційзалежну активність протеаз, які відповідають за деградацію емалевих протеїнів у процесі первинної біомінералізації емалі [2]. Також відомо, що в патогенез флюорозу емалі залучена матриксна металопротеїназа-20 (ММП-20), яка уповільнено гідролізує амелогеніни на етапах первинної мінералізації [3].

Натепер встановлено, що центральним патогенетичним механізмом карієсу зубів є руйнування органічного матриксу під дією матриксних металопротеїназ, що мають за джерело демінералізований дентин. Імуногістохімічний аналіз виявив ММП-20 у дентинних тубулах каріозних осередків, отже, ММП-20, що вбудована в дентин під час первинного дентиногенезу, може вивільнятися й активуватися під час каріозного процесу [4].

Відомо, що ген ММП-20 може мати поліморфізм g.30 561A>T [5], але його значення в патогенезі карієсу на фоні флюорозу не з'ясоване. Тож

вивчення поширеності та можливого впливу поліморфізму цього гена на патогенез карієсу при флюорозі є важливим, особливо зважаючи на відсутність даних щодо його поширеності.

Мета дослідження - вивчити зв'язок поліморфізму гена ММП-20 із тяжкістю ендемічного флюорозу зубів та активністю карієсу в дітей.

Матеріали і методи. Дослідження проводили у 2011 році на базі кафедри післядипломної освіти лікарів-стоматологів ВДНЗУ «УМСА» і Науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Української медичної стоматологічної академії, м. Полтава. Перед початком дослідження було отримано схвалення комісії з біоетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія».

Ми обстежили 91 дитину середньої загальноосвітньої школи смт. Машівки Полтавської області. У цих дітей визначили поліморфізм гена ММП-20. Усі діти підлягали стоматологічному обстеженню, що складалося з трьох частин, за схемою, рекомендованою ВООЗ [6]. Стан гігієни порожнини рота визначали за допомогою індексів за Ю.В. Федоровим і В.В. Володкіною (1976).

Для оцінки інтенсивності карієсу використовували стандартні індекси: кп, кп+КПВ, КПВ. Компенсовану форму карієсу (КФК) установлювали при індексах інтенсивності від 1 до 3; субкомпенсовану (СФК) – 4-5 ; декомпенсовану (ДФК) – 6 і більше. Також визначали ураженість тимчасових і постійних зубів ускладненим карієсом серед дітей кожної вікової групи.

Форму флюорозу для кожного зуба відмічали в схемі зубної формули в балах за класифікацією, рекомендованою ВООЗ [6]. Дані обстеження фіксували в карті обстеження хворого, рекомендованій ВООЗ.

Для з'ясування концентрації фторидів у питній водопровідній воді смт. Машівки ми використали офіційні дані Машівської районної

санітарно-епідеміологічної станції. За цими даними, протягом 2000-2010 рр. концентрація фтору в зразках водопровідної води цієї місцевості коливалася з роками від 1,7 до 2,9 мг/л (норма – не більше 1,5 мг/л).

Для визначення поліморфізму гена ММП-20 g.30 561A>T виділяли геномну ДНК з матеріалу епітеліального зіскрібка слизової поверхні щоки за допомогою стерильного одноразового шпателя. ДНК виділяли за допомогою набору «ДНК-експресс» (ООО НПФ «Литех», Росія). Ампліфікацію гена ММП-20 проводили на ампліфікаторі детектуючому «ДТ-322» (ООО «НПО ДНК-технология», Росія) в режимі реального часу. Продукти ампліфікації гена ММП-20 ідентифікували за допомогою флуоресцентної реєстрації накопичення ДНК за каналами флуоресценції. Статистичну обробку результатів проводили методом Ст'юдента, непараметричну кореляцію - методами Тау Кендалла і Гамма.

Результати дослідження та обговорення

Усі обстежені нами діти (91 особа) народилися в смт. Машівці Полтавської області та проживали тут безвиїзно. За джерело водопостачання 73 із 91 особи використовували водопровідну воду, 18 – колодязну.

Частина обстежених дітей (81 особа, 89%) скаржилися на наявність каріозних порожнин у зубах; короткочасний біль від солодкого в цих зубах; на косметичний дефект у вигляді темних плям та інших дефектів фронтальних зубів. Частина дітей (10 осіб, 11%), із яких 3 особи не мали флюорозу і 7 дітей із легкою формою флюорозу, скарг не пред'являли.

Інтенсивність карієсу і флюорозу постійних зубів залежить від кількості зубів, що прорізувалися, тому ми розподілили всіх обстежених на вікові групи (табл. 1).

Таблиця 1

Розподіл обстежених дітей за віком

№п/п	Групи дітей	Кількість дітей
1	6 - 7 років	30
2	8 - 9 років	42
3	10 - 11 років	19
	Усього	91

Поширеність карієсу постійних зубів зростає з 66,6% у дітей 6 років до 85% у дітей 8 – 9 років. У дітей віком 6-7 років карієсом були уражені перші постійні моляри, в більш старшому віці (9-11 років) часто зустрічалися каріозні ураження, як молярів так і премолярів (табл. 2).

З віком зменшувався відсоток здорових дітей - із 33,3% у 6- річних до 26, 3% у 11-річних і таких, які мали компенсовану форму карієсу (з 46,7% до 26,3% відповідно). Натомість нами виявлено зростання відсотка дітей, які мали субкомпенсовану форму карієсу, – від 20% у 6- річних до 47,4% у 10- річних.

Таблиця 2

Ураженість карієсом постійних зубів у дітей 6-11 років смт. Машівки

Вік пацієнтів	6- 7 років	8- 9 років	10 - 11 років	6-11 років
Кількість пацієнтів усього	30 (100%)	42 (100%)	19 (100%)	91 (100%)
Кількість пацієнтів із карієсом	20 (66,6%)	34 (85%)	14 (73,7%)	68 (74,72%)
Здорові	10 (33,33%)	8 (19,05%)	5 (26,32%)	23 (25,27%)
КФК	14 (46,67%)	21 (50%)	5 (26,32%)	40 (43,96%)
СФК	6 (20%)	13 (30,95%)	9 (47,37%)	28(30,77%)
ДФК	0	0	0	0

Привертають також увагу і високі показники ускладненого карієсу. Так, за даними обстеження майже третина обстежених дітей мають

пульпіти і періодонтити тимчасових зубів, причому ураженість зростає з віком (табл. 3.)

Таблиця 3

**Ураженість ускладненим карієсом тимчасових зубів у дітей 6-11 років
сmt. Машівки**

Вік пацієнтів	6- 7 років	8- 9 років	10 - 11 років	6-11 років
Кількість пацієнтів	30 (100%)	42 (100%)	19 (100%)	91 (100%)
Поширеність ускладненого карієсу тимчасових зубів	5 (16,7%)	16 (38,1%)	9 (47,4%)	30 (32,97%)

Визначено, що поширеність ендемічного флюорозу в обстежених дітей склала 97%. Нами було з'ясовано, що флюороз відсутній усього в 3-х дітей (3,29%), сумнівний ступінь флюорозу не виявлений, дуже слабкий ступінь виявлений у 7 дітей (7,69%), слабкий ступінь – у 16 дітей (17,58%), помірний ступінь визначено в 19 дітей (20,88%). Тяжкий ступінь флюорозу визначений у 46 дітей, тобто в половини обстежених осіб (50,55%) (табл. 4).

Таблиця 4

Ураженість флюорозом постійних зубів у дітей сmt. Машівки

Вік	Кількість пацієнтів	Флюороз відсутній, абс. (%)	Флюороз 1ст., абс. (%)	Флюороз 2 ст., абс. (%)	Флюороз 3ст., абс. (%)	Флюороз 4ст., абс. (%)	Флюороз 5ст., абс. (%)
6 – 7 років	30 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3,33%)	5 (16,67%)	10 (33,33%)	14 (47,78%)
8 – 9 років	42 (100%)	3 (8,28%)	0 (0%)	4 (9,52%)	9 (21,43%)	7 (16,67%)	19 (45,24%)
10 – 11 років	19 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (10,53%)	2 (10,53%)	2 (10,53%)	13 (68,42%)

Порушення формування структури емалі залежить не лише від зовнішніх факторів, а і значною мірою від індивідуальних особливостей

організму. Індивідуальні особливості розвитку і будови емалі зубів визначаються епігенетичними факторами і генетичною мінливістю організму. Формування емалі зуба, як показують сучасні дослідження, регулюється рядом ферментів, які на різних стадіях беруть участь у морфогенезі. Серед таких ферментів виділяють матриксну металопротеїназу-20 (енамелізин), калікреїн – 4, а також ряд структурних білків – енамелін, амелобластин, тафтелін, які мають різні генетичні варіанти [7].

Посилену увагу привертає MMP-20, яка має досить обмежені паттери експресії. У тканинах здорових індивідумів MMP-20 спостерігаються в емалевому і пульповому органах зубів, що розвиваються, і наявні лише як активовані ферменти. MMP-20 має унікальну субстратну специфічність, зокрема до колагену V типу [8].

Ураховуючи такий унікальний розподіл у тканинах і субстратну специфічність, MMP-20 є важливим геном – кандидатом для вивчення природи аплазії, гіпоплазії і дисплазії емалі [9]. Отримані результати, які свідчать, що при аутосомно-рецесивному розвитку емалі спостерігаються мутації MMP-20 с.102 G>A, q.102 G>A, pW34X (заміна кодону триптофану на кодон закінчення трансляції). Фенотипічно це проявляється потоншенням емалі, її гіпомінералізацією і схильністю до сколювання [10]. Опубліковані дані про інші мутації MMP-20, які призводять до порушення (ослаблення) ферментативних властивостей і проявляються пігментним недорозвиненням емалі та іншими порушеннями її розвитку [11]. Такий стан проблеми й зумовив вивчення поліморфізму гена MMP-20 у групі обстежених нами дітей, які проживають у регіоні ендемічного флюорозу.

Отримані нами результати молекулярно-генетичного аналізу дозволили встановити «дикий тип» алелів гена MMP-20 у 88 пацієнтів, мутантний тип алелів гена MMP-20 виявили в 3 пацієнтів, що складає 96,7% і 3,3% відповідно. Частота виявлення поліморфізму гена MMP-20

g.30 561A>T у смт. Машівці становить 3,3%. Отже, нами вперше встановлена поширеність поліморфізму g.30 561A>T гена MMP – 20 серед дітей із флюорозом.

Пацієнти, в яких виявлено генетичний поліморфізм MMP-20, клінічно характеризувалися флюорозом емалі 5-го ступеня тяжкості. Щодо ступеня активності карієсу (КПУ + кп), то у двох пацієнтів він відповідав компенсованій формі карієсу, один пацієнт був із декомпенсованою формою карієсу за показниками кп+КПВ.

Результати непараметричного кореляційного аналізу з визначенням коефіцієнтів Тау Кендалла і Гамма не показали достовірних взаємозв'язків між ступенем тяжкості флюорозу і ступенем активності карієсу як тимчасових, так і постійних зубів у осіб цієї категорії. Хоча відомо, що прогресування карієсу дентину на фоні флюорозу перевищує глибину ураження в зубах без флюорозу [12]. Разом з іншими карієсогенними факторами флюороз призводить до інтенсивнішого перебігу каріозного процесу. Це підтверджено і даними літератури, де вказується, що каріозний процес у дентині на фоні ендемічного флюорозу інтенсивніший і проявляється більшою глибиною ураження в порівнянні із зубами без флюорозу, як показано *in vitro* [13].

Ми встановили достовірний прямий кореляційний зв'язок між ступенем тяжкості флюорозу і поліморфізмом гена MMP-20 g.30 561A>T (Тау Кенделла 0,16; $p < 0,05$), що відображає вплив поліморфізму гена MMP-20 на обтяження розвитку ендемічного флюорозу. Таким чином, поширеність розвитку флюорозу емалі значною мірою визначається зміненою органічною матрицею емалі, що надалі викликає порушення мінералізації.

Отримані нами дані дозволяють припустити, що при формуванні зубів в умовах з оптимальним умістом фтору в питній воді дикий тип алеля гена MMP-20 видаляє амелогенін зі сформованої емалі, а в умовах

підвищеної концентрації фтору в питній воді амелогенін видаляється не повністю або уповільнено, що призводить до утворення дефектів у емалі. Відомо, що фтор може інгібувати активність деяких ферментів, зокрема гідролаз, серинових протеаз і т. д. [14]. Водночас отримані нові дані про те, що фторид дозами 0-10 мг/л не інгібує активність протеаз емалі. Ці дані передбачають, що фториди впливають не на активність MMP-20, а на її секрецію, внаслідок чого розвивається флюороз вищих ступенів тяжкості.

З огляду на отримані дані, подальші дослідження в цьому напрямі перспективні з точки зору вибору методів профілактики і лікування карієсу на фоні флюорозу.

Висновки

1. При концентрації фторидів у питній воді 1,7-2,9 мг/л поширеність флюорозу в дітей віком 6-11 років становить 97%, тяжкий ступінь розвивається в 50,5% користувачів цієї води.
2. 3-5 ступені ендемічного флюорозу є фактором ризику розвитку ускладнень карієсу постійних зубів - пульпіту і періодонтиту зубів у дітей.
3. Поширеність поліморфізму гена MMP-20 у популяції смт. Машівки Полтавської області становить 3,3%. Поліморфізм гена MMP-20 пов'язаний зі ступенем тяжкості ендемічного флюорозу зубів і відіграє роль у патогенезі карієсу в дітей.

Література

1. Проблема фтора в подземных водах Харьковского региона в связи с их эксплуатацией / В.В. Яковлев, В.Д. Лищина, И.Н. Литвиненко [и др.] // Вісник Харківського національного університету.- 2009. - № 864. - С.224-250.

2. Fluoride incorporation into apatite crystals delays amelogenin hydrolysis / P.K. DenBesten , L. Zhu , W. Li [et al.] // Eur. J. Oral Sci. – 2011.- Vol.119.- Suppl 1.- P.3-7.
3. Jun signaling pathway mediates the fluoride-induced down-regulation of MMP-20 in vitro /Y. Zhang, W. Li, H.S. Chi [et al.] //Matrix Biol. - 2007. – Vol. 26(8).- P. 633-641.
4. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth / M. Sulkala, M. Larmas, T. Sorsa [et al.] // J. Dent. Res.-2002.-Vol.81, N 9.-P.603-607.
5. Premature stop codon in MMP20 causing amelogenesis imperfecta / P. Papagerakis, H.K. Lin, K.Y. Lee [et al.] // J. Dent. Res. – 2008. - Vol.87(1).- P.56-59.
6. World Health Organisation. Fluorides and oral health. Report Expert Committee on oral health status and fluoride use // WHO Technical Report Series №846.- Geneva: WHO, 1994. – 58 p.
7. Exclusion of known gene for enamel development in two Brazilian families with amelogenesis imperfecta / M. Santos, S. Hart, M. Ramaswami [et al.] // Head & Face Medicine. – 2007. – Vol. 3. – P. 8.
8. MMP-20 is predominately a tooth – specific enzyme with a deep catalytic pocket that hydrolyzes type V collagen / B.E. Turk, D. Lee, Y. Yamakoshi [et al.] // Biochemistry. – 2006. – Vol. 45 (12). – P. 3863-3874.
9. Human and mouse enamel phenotypes resulting from mutation or altered expression of AMEL, ENAM, MMP 20 and KLK 4 / T.M. Wright, T.C. Hart, S.P. Hart [et al.] // Cells Tissues Organs. – 2009. – Vol. 189. – P. 224 -229.
10. Kim J.W. MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta / J.W. Kim, J.P. Simmer, T.C. Hart // J. Med. Genet. – 2005. – Vol. 42. – P. 271 – 275.

11. Caries susceptibility of human fluorosed enamel and dentine / T. Nikaido, D.D. Weerasinghe, K.A. Wettasinghe [et al.] // J. Dent. 2007. – Vol. 35(4). – P. 343-349.
12. Why does fluorosed dentine show a higher susceptibility for caries: an ultra-morphological explanation / K. Waidyasekera, T. Nikaido, D. Weerasinghe [et al.] // J. Med. Dent Sci. – 2010. – Vol. 57(1). – P. 17-23.
13. Sulfonyl fluoride inhibitors of Fatty Acid amide hydrolase / S.O. Alapafuja, S.P. Nikas, I.T. Barathan [et al.] // J. Med. Chem. – 2012. – Vol. 55 (22). – P. 10074 – 10089.
14. Tye C.E. Fluoride does not inhibit enamel protease activity / C.E. Tye, J.V. Antone, J. D. Bartlett // J. Dent Res. – 2011. – Vol. 90 (4). – P. 489 – 494.

Стаття надійшла
30.07. 2013 р.

Резюме

Досліджено роль поліморфізму гена матриксної металопротеїнази - 20 у перебігу карієсу зубів у дітей на фоні ендемічного флюорозу. При карієсі дентину органічний матрикс руйнується під дією матриксних металопротеїназ (ММП) макроорганізму, які після демінералізації практично контролюють прогресування карієсу. Активність ММП при флюорозі емалі пригнічена під дією надлишку фтору, внаслідок чого може уповільнюватися деградація емалевих протеїнів у ході первинної біомінералізації. Разом з іншими карієсогенними факторами флюороз призводить до інтенсивнішого перебігу каріозного процесу. Отримані дані дозволяють припустити, що при формуванні зубів в умовах з оптимальним вмістом фтору в питній воді дикий тип алеля гена ММП-20 видаляє амелогенін зі сформованої емалі, а в умовах підвищеної концентрації фтору в питній воді амелогенін видаляється не повністю або уповільнено, що призводить до утворення дефектів у емалі.

Ключові слова: матриксні металопротеїнази, карієс, флюороз.

Резюме

Изучена роль полиморфизма гена матриксной металлопротеиназы-20 в течении кариеса зубов у детей на фоне эндемического флюороза. При кариесе дентина органический матрикс разрушается под воздействием матриксных металлопротеиназ (ММП) макроорганизма, которые после деминерализации практически контролируют прогрессирование кариеса.

Активность ММП при флюорозе эмали угнетена из-за избытка фтора, вследствие чего может замедляться деградация эмалевых протеинов при первичной биоминерализации. Наряду с другими кариесогенными факторами флюороз способствует более интенсивному течению кариозного процесса.

Полученные данные позволяют допустить, что при формировании зубов в условиях с оптимальным содержанием фтора в питьевой воде дикий тип аллеля гена ММП-20 удаляет амелогенин из сформированной эмали, а в условиях повышенной концентрации фтора в питьевой воде амелогенин удаляется не полностью или замедленно, что приводит к образованию дефектов в эмали.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы, карієс, флюороз.

Summary

This article is devoted to study of the role of polymorphism's gene of matrix metalloproteinase - 20 in the course of dental caries in children on a background of endemic dental fluorosis. At dentin caries destruction of the organic matrix is influenced by matrix metalloproteinase (MMP) microorganism that after demineralization controls the progression of caries. MMP activity is depressed of enamel due to exposure of excess fluoride at fluorosis, therefore the degradation of enamel proteins decelerates during initial biomineralization.

Along with other cariesgenic factors, fluorosis promotes more intensive course of caries process.

This information suggests that the formation of teeth in optimal fluoride content in drinking water wild type of allele of the gene of MMP-20 removes amelogenin of formed enamel, and in high concentrations of fluoride in drinking water amelogenin is not fully purged, or slowly, that can lead to the formation of enamel defects.

Key words: matrix metalloproteinase, caries, fluorosis.