

УДК:616.311.2-055.26:57.083.3

Л.Й. Островська, Т.О. Петрушанко, І.П.Кайдашев

ПОЛІМОРФІЗМ Asp299Gly ГЕНА Толл-ПОДІБНОГО РЕЦЕПТОРА 4 У ГЕНЕЗІ ЗМІН ЯСЕН У ВАГІТНИХ

Вищий державний навчальний заклад України

“Українська медична стоматологічна академія”,

Науково-дослідний інститут генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики, м. Полтава

Вступ. Передумови формування та механізми реалізації генетично обумовленої патології в людини потребують усебічного вивчення. Особливо це важливо щодо вродженої та спадкової патології. Ефективна пренатальна діагностика генетично обумовлених хвороб передбачає досконалу їх прекоцепційну профілактику, тобто формування груп ризику щодо відтворення даної патології ще до настання вагітності [1]. На сьогодні особливої актуальності набуває вивчення поліморфізму генів регуляторних молекул запалення [2]. Знання їхньої ролі в патогенезі багатьох хвороб, поряд із досягненнями сучасної геноміки, дозволяє прогнозувати ризик розвитку патології або тяжкість її перебігу та підібрати специфічну терапію або ж відповідну корекцію в схемі лікувально-профілактичних заходів для вагітних. Так, установлено, що відправною точкою запуску запалення при гінгівіті є наявність Toll-подібних (Toll-interleukin-1-receptor) рецепторів у зовнішній мембрані нейтрофілів, макрофагів, кератиноцитів, які забезпечують молекулярну рецепцію патогена із подальшим включенням важливих компонентів спадкового імунітету [3,4].

Метою нашого дослідження було вивчення ролі поліморфізму Asp299Gly гена Toll-подібного рецептора 4 (TLR4) в реалізації схильності до виникнення запальних процесів ясен у I триместрі вагітності.

Об'єкти і методи дослідження. Проведено клініко-лабораторне обстеження в першому триместрі 104 вагітних віком 18-37 років, які перебували на обліку в жіночій консультації м. Полтави. Усі жінки проходили стоматологічний огляд із детальним вивченням пародонтологічного статусу, оцінкою гігієни порожнини рота. Об'єктивізували стан тканин пародонта на основі аналізу папілярно-маргінально-альвеолярного індексу (РМА) в модифікації С.Parma (1960), індексу СРІТN, кровоточивості за Muhlemann-Sax. Отримані показники стоматологічного обстеження реєстрували в спеціально розроблених картах індивідуального спостереження за вагітними.

Забір зразків букальних епітеліоцитів вагітних проводили стерильним одноразовим зондом, який вносили в епандорфи з реактивом “ДНК-експрес”. Геномну ДНК виділяли за допомогою набору “ДНК-експрес” (“ЛитТех”, Москва). Поліморфну ділянку Asp299Gly гена Toll-подібного рецептора 4 ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в 25 мкл реакційної суміші, що містила:

- 2,5 мкл 10 x Bui для ампліфікації;
- 2 мМ хлориду магнію;
- 0,2 мМ кожного dNTP;
- 2,5 од. ДНК-полімерази Tag;
- 20-50 нг. геномної ДНК;
- по 66 нг праймерів для Asp299Gly:

F: 5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3'

R: 5'-GATCAACTTCTGAAAAGCATTCCCAC-3'

У пробірки нашаровували 25 мкл мінерального масла. Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі “Терцик” (“ДНК-Технологія”, Москва). Для

ідентифікації алелей проводили рестрикційний аналіз ампліконів за допомогою ендонуклеази рестрикції Nco I. У результаті рестрикції були отримані фрагменти розміром 263 bp та 222 bp. Продукти розщеплення поліморфної ділянки гена виявили за допомогою електрофорезу в 3% агарозному гелі в 1 x TBE (50 mM трис-Н₃ВО₃ та 2 mM ЕДТА, рН 8.0) (протягом 2 год. при напрузі 2V на 1 см. гелю). У ролі маркера молекулярної ваги ДНК використовували рBR322/BsuRI. Гелі фарбували етидіумом бромідом із подальшою візуалізацією результатів в УФ-світлі.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою критерію χ^2 . Для аналізу взаємозв'язків кількісних параметрів, які вивчалися, визначали коефіцієнт парної кореляції Кендела.

Результати дослідження. Клінічне обстеження вагітних у стоматолога виявило, що основними скаргами були кровоточивість ясен, неприємний запах із порожнини рота, біль у яснах під час чищення зубів. Більшість жінок указували на появу зазначених скарг під час вагітності, але деякі обстежені вказували на їх наявність ще до появи вагітності.

За результатами об'єктивних досліджень зміни тканин пародонта зареєстровано в жінок уже в I триместрі вагітності, при цьому реєстрували переважно генералізований катаральний гінгівіт (85,2%), що збігається з даними С.М. Толмачевої [5], а також папіліт (13%) та пародонтит (1,8%); індекс гігієни в середньому склав $0,47 \pm 0,03$, що, загалом, відповідає рівню доброго стану гігієни порожнини рота; середні показники індексу кровоточивості за Muhlemann-Sax склали $1,02 \pm 0,13$. Аналізуючи результати індексу CPITN, можна зазначити, що 42 жінки (40,3%) потребували застосування заходів професійної гігієни порожнини рота.

Переважає більшість хвороб тканин пародонта мала запальний (папіліт, гінгівіт) та запально-дистрофічний характер (пародонтит). Мікробного генезу гінгівіт виникає внаслідок запальної відповіді макроорганізму на скупчення мікробів, що контактують із тканинами ясен.

З самого початку відповідь організму спрямована винятково на факультативну мікрофлору порожнини рота, що утворює основу зубного нальоту, в якому превалюють грампозитивні бактерії [6,7]. По мірі прогресування запалення та включення в процес періодонтальної зв'язки, кісткової тканини в зубному нальоті з'являються, а потім превалюють грамнегативні штами [8]: *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.), *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* та ін. [9]. Захисна функція здорових ясен забезпечується системою імунокомпетентних клітин, дисфункція яких розглядається як основа запуску та розвитку гінгівіту і пародонтиту. Останнім часом у науковій літературі, в тому числі і з пародонтології, помітна зацікавленість дослідженнями молекулярного рівня, зокрема більш ранньої системи захисту організму від патогенів – уродженої імунної відповіді [2-4,10,11,14,15].

Слід зазначити, що найчастішою причиною відмінностей у структурі генів є точкові мутації – заміни одиничних нуклеотидів, так званий поліморфізм одиничних нуклеотидів (SNP-single-nucleotide polymorphism), який за рахунок формування специфічних алелей генів посилено впливає на особливості розвитку захисних реакцій та схильність до низки захворювань [10,11]. Захист на місцевому рівні після потрапляння в тканини патогена розвивається шляхом формування типової запальної реакції з її класичними проявами: гіперемія, набряк, поява больового синдрому та порушення функції. Епітеліальні клітини ясен першими за допомогою мембранного рецепторного апарату починають реагувати на скупчення бактеріальних продуктів у складі мікробної біляшки генерацією сигналів. Початок розвитку цієї реакції пов'язують із первинним з'єднанням TLR4 із молекулярними патернами (PAMP) бактерій, вірусів, грибів, що є пусковим механізмом розвитку запального процесу. Сигнал, що передається в клітину через цей рецептор, функціонально близький до

рецептора інтерлейкіну-1 та є одним із головних у системі антибактеріального захисту організму. Толл-подібні рецептори активуються різними лігандами, що, головним чином, є структурними компонентами бактерій, вірусів та грибів. Після зв'язування ліганда та активації рецептора останній зв'язується в цитоплазмі з TIR-домен-улісними адаптерними білками. TLR4 може взаємодіяти з MyD88 або TIRAP, індукуючи синтез протизапальних цитокінів, або з TICAM-1 і TICAM-2, що приводить до синтезу інтерферонів. Адаптерні білки зв'язуються зі специфічними ферментами-кіназами, що значно підсилюють сигнал та приводять до індукції певних генів, які визначають запальну відповідь клітини.

За результатами проведених полімеразних ланцюгових реакцій для визначення алеля G TLR4 у букальних епітеліоцитах 104 вагітних виявили його наявність у $17,3 \pm 3,7$ % обстежених (18 жінок), у яких клінічно також діагностовано наявність запальних змін у тканинах пародонта. У анамнезі хвороби 10 ($9,6 \pm 2,9,8\%$) із 18 вищезазначених вагітних відмітили наявність кровоточивості ясен, больових відчуттів у них, а також виразного запального процесу задовго до настання вагітності.

Детальний аналіз результатів генетичного дослідження показав, що 16 вагітних із діагностованими змінами тканин пародонта мали фрагменти розміром 263 bp (AA/AG - гетерозигота), а ще 2 жінки - фрагменти розміром 222 bp (GG/GG – гомозигота мутантного типу). Більш виражені клінічні прояви запальних змін у тканинах пародонта спостерігали в жінок із наявністю гомозиготи мутантного типу (GG/GG). “Дикий тип” (AA/AA) генотипу Asp299Gly (нормальний розподіл алелей) загалом склав у групі 104 обстежених $82,7 \pm 3,7\%$ (табл. 1).

Таблиця 1

Розподіл мутантних алелей Asp299Gly TLR4 у вагітних залежно від стану тканин пародонта

Характеристика обстежених	Гомозигота (AA/AA)	Гетерозигота (AA/AG)	Гомозигота (GG/GG)	Алель А	Алель G
Вагітні з інтактним пародонтом (50 жінок)	50(100%)	0(0%)	0(0%)	50(100%)	0(0%)
Вагітні зі змінами тканин пародонта (54 жінки)	36(66,7%)	16(29,6%)	2(3,7%)	52(75%)	18(25%)

Літературні дані свідчать, що поліморфізм гена TLR4 має зв'язок із характером розвитку запальної патології, особливо при хворобах, викликаних грамнегативними мікроорганізмами, що повною мірою обґрунтовується їхньою ключовою роллю в розпізнаванні та розвитку запальної відповіді на ЛПС, а носії цього поліморфізму характеризуються схильністю до тяжкого перебігу хвороби, що збігається з літературними даними [12,13].

За результатами статистичного аналізу критерію χ^2 отримані дані щодо виявлення алеля G винятково в групі вагітних, які мають запальні зміни тканин пародонта (33,3%), та не зустрічається в групі обстежуваних з інтактним пародонтом. Так, у пацієнтів, які мають мутантні алелі, відсутня резистентність до розвитку запалення пародонта (вірогідність відмінностей, $p < 0,001$). Натомість у 36 жінок (66,7%) не підтверджено наявність зазначених виявлених мутантних алелей генів, але зареєстровано клінічні прояви хвороб тканин пародонта, що, можливо, обумовлено впливом комплексу місцевих патогенних чинників та гормональних змін у період вагітності [13], що призводить до появи чи посилює перебіг

патологічних реакцій у тканинах пародонта. Необхідно зазначити наявність достовірного прямого кореляційного зв'язку за Кенделом ($p < 0,05$) алеля G в I триместрі з показниками, що характеризують запалення тканин пародонта вагітних, зокрема, індекс РМА, індекс кровоточивості за Muhlemann-Sax, індекс СРІТН та негативного зв'язку зі швидкістю саливації.

Епітелій порожнини рота перебуває під впливом змін як при стоматологічній, загальносоматичній патології, так і під час вагітності. Адгезія кандидозних клітин та патогенної флори знаходить своє відображення в низькому рівні гігієни порожнини рота, високому рівні запальних процесів у яснах, що може бути пов'язане з підсиленням кератинізації клітин та збільшенням адгезивних властивостей букальних епітеліоцитів під дією естрогенних гормонів протягом вагітності, що є додатковим причинним фактором у реалізації схильності до виникнення запальних процесів ясен у I триместрі вагітності. При цьому після взаємодії бактеріальних ліпополісахаридів (ЛПС) із мембранними патерн-розпізнавальними рецепторами (ППР) запускається внутрішньоклітинний каскад передачі сигналу, що, в свою чергу, призводить до експресії генів цитокінів, ферментів, регуляторних молекул запалення, підсилення функціональної активності лейкоцитів [14,15]. Загалом толл-подібні рецептори є одним із найсильніших клітинних модуляторів.

Отже, виявлені результати свідчать про виявлення алеля G, який достовірно пов'язаний із виникненням запалення в тканинах пародонта. Тому нині виникає необхідність урахування діагностики поліморфізму генів, а саме Asp299Gly TLR4, з метою прогнозування виникнення і розвитку запальних хвороб тканин пародонта, що важливо для обґрунтування та розробки профілактично-лікувальних заходів у вагітних.

Література

1. Заставна Д.В. Імуногенетичні фактори реалізації генетично обумовленої патології : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора мед. наук: 03.00.15 / Д.В. Заставна. – К., 2004. – 16 с.
2. Симбирцев А.С. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления / А.С.Симбирцев, А.Ю. Громова // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т.4, №1. – С. 3-10.
3. Симбирцев А.С. Толл-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета / А.С. Симбирцев // Иммунология. – 2005. - №6. – С. 368-376.
4. Байракова О.Л. Роль и биологическое значение толл-подобных рецепторов в антиинфекционной резистентности организма / О.Л.Байракова, Е.А.Воропасва, С.С.Афанасьев [и др.] // Вестник Российской АМН. – 2008. - №1.- С. 45-54.
5. Толмачева С.М. Стоматологические заболевания в период беременности и их профилактика / С.М. Толмачева, Л.М. Лукиних. – М.: Медицинская книга, 2005. – 150 с.
6. Перова М.Д. Новый взгляд на развитие и репарацию поврежденных тканей пародонта с позиций молекулярной медицины (аналитический обзор). Ч. I. Механизмы рецепции патогенов и передачи сигналов о функциональном состоянии тканей / М.Д.Перова, М.Г.Шубич, В.А.Козлов // Стоматология. - 2007 - №3. – С.76-80.
7. Bainbridge B.W. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system / B.W. Bainbridge, R.P. Darveau // Acta Odontol. Scand. – 2001. - N 59. – P. 131-138.
8. Darveau R.P. The microbial challenge in periodontitis / R.P. Darveau, A. Tanner, R.C. Page // Periodontol. - 2003. – Vol. 14. – P. 12-32.
9. Jassens S. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition / S. Jassens, R. Beyaer // Clin. Microbiol. Rev. – 2003. – Vol. 16. – P. 637 – 646.

10. Sandor F. Toll-like receptors. Biological significance and impact for human medicine / F. Sandor, M. Buc // *Folia Biol. (Praha)*. – 2005. – Vol. 51. – P. 198 – 203.
11. Human toll-like receptor 4 mutation but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infection / D. Agness, J. Calvano, S. Nahm [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2002. – Vol.186. – P. 1522-1528.
12. Сапронова Е.А. Сравнительная морфологическая характеристика десневого и буккального эпителия у женщин в разные фазы менструального цикла / Е.А. Сапронова, Б.Я. Рыжавский, И.Ф.Служаев // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2008. - №8. – С.34-37.
13. Schnare M. Toll-like receptors: sentinels of host defence against bacterial infection / M. Schnare, M. Rollinghoff, S. Qureshi // *J.Allergy Immunol.* – 2006. – Vol.139.- P.75-85.
14. Toll-like receptors 4 polymorphisms and atherogenesis / S. Kiechl, E. Lorenz, M. Reindl M. [et al.] // *N. Engl. J. Meed.* – 2002. – Vol.347. – P.185-192.
15. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population / E. Lorenz, M. Hallmam, R. Marttila [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2002. – Vol. 52. – P. 373 – 376.

Стаття надійшла

3.10.2009 р.

Резюме

Проведено изучение роли полиморфизма Asp299Gly гена Toll-видного рецептора 4 (TLR4) в реализации склонности к возникновению воспалительных процессов десен в I триместре беременности. Представлен анализ взаимосвязей аллеля G с обнаруженными изменениями в тканях пародонта у беременных путем статистической обработки и обнаружены корреляционные связки аллеля G с показателями, которые характеризуют воспаление десен у беременных, в частности,

индекс РМА, индекс кровоточивости за Muhlemann-Sax, индекс CPitn и со скоростью саливации.

Ключевые слова: беременность, пародонт, Toll-видный рецептор 4, аллели A, G.

Summary

The role of polymorphism of a gene of Toll-like receptor 4 (TLR4) in the realization of inclination to inflammatory processes occurrence in gums in women in the first trimester of pregnancy has been studied. The analysis of interrelations of allele G with determined changes in parodontium tissues in pregnant women has been represented. The correlated connections of allele G with indices, which characterize the inflammation of gums in pregnant women, PMA index, index of bleeding according to Muhlemann-Sax, index CPITN, and with rate of salivation have been estimated.

Key words: pregnancy, parodontium, Toll-like receptor 4, alleles A,G.