

ВОЗНИКНОВЕНИЕ ОДОНТОГЕННОЙ ФЛЕГМОНЫ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ПОЛИМОРФНЫМ ВАРИАНТОМ 896A/G ГЕНА TLR4, НО НЕ 2258G/A ГЕНА TLR2

Ву Вьет Куонг, Д. С. Аветиков, О. А. Шлыкова, О. В. Измайлова, И. П. Кайдашев

Украинская медицинская стоматологическая академия, г. Полтава

INCIDENCE OF ODONTOGENIC PHLEGMON, ASSOCIATED WITH POLYMORPH VARIANT 896A/G OF GENE TLR4, BUT NOT 2258G/A OF GENE TLR2

Vu Vyet Kuong, D. S. Avetikov, O. A. Shlyikova, O. V. Izmaylova, I. P. Kaydashev

Возбудителями одонтогенных воспалительных заболеваний являются микроорганизмы, которые обычно составляют постоянную микрофлору полости рта: стафилококки, стрептококки, энтерококки, диплококки, грамположительные и грамотрицательные палочки *E. coli*, *Proteus* и др. Течение инфекционно–воспалительного процесса зависит не только от видовой принадлежности возбудителя, его культуральных свойств, но и от состояния иммунной реактивности организма [1, 2].

На поверхности клеток, осуществляющих природную защиту (макрофаги, дендритные клетки, эпителиоциты слизистой оболочки, нейтрофильные гранулоциты, эпителиоциты дермы), микроорганизмы распознаются с помощью Toll–подобных рецепторов (TLR) [3, 4], которые инициируют каскад провоспалительных реакций врожденного иммунитета, вследствие чего синтезируются соответствующие цитокины [5]. Генетический полиморфизм TLR изменяет иммунную реактивность в ответ на действие липопротеинов грамположительных (TLR2 полиморфизм 2258G/A) [6] липополисахарида (ЛПС) и грамотрицательных (полиморфизм TLR4 896A/G, замена аспарагина—299 на глицин) микроорганизмов [7].

Зубодесневое прикрепление при периодонтите нарушается под влиянием грамотрицательных анаэробных микроорганизмов, что может быть обусловлено полиморфизмом TLR4 896A/G, поскольку выявлены

Реферат

Актуальность проблемы обусловлена значительным увеличением частоты возникновения воспалительных заболеваний тканей головы и шеи, в первую очередь, абсцессов и флегмон дна полости рта, которые при неадекватном лечении обуславливают тяжелые формы медиастинита. Авторы установили, что Toll–подобные рецепторы (TLR) инициируют каскад провоспалительных реакций врожденного иммунитета, вследствие чего синтезируются соответствующие цитокины, а их генетический полиморфизм изменяет иммунную реактивность организма. Доказана достоверная корреляция полиморфизма 896A/G гена TLR4 (rs4986790) с высоким риском возникновения одонтогенной флегмоны дна полости рта (ОФДПР), что позволит прогнозировать течение заболевания в ранние сроки, оптимизировать схемы его профилактики и лечения.

Ключевые слова: флегмона дна полости рта; Toll–подобные рецепторы; полиморфизм; цитокины.

Abstract

The problem actuality is caused by significant enhancement of the incidence rate for inflammatory diseases of the head and neck tissues, first of all of the oral cavity floor abscesses and phlegmons, which causes severe forms of mediastinitis while inadequate treatment. The authors have had established, that Toll–like receptors (TLR) initiate a cascade of anti–inflammatory reactions of the inborn immunity, followed by synthesis of a certain cytokines, and their genetic polymorphism changes the immune reactivity of the organism. Trustworthy correlation of the gene TLR4 (rs4986790) polymorphism 896A/G was proved with high risk of the odontogenic phlegmon of the oral cavity floor occurrence, what would permit to prognosticate the disease course in early terms, to optimize the schemes of its prophylaxis and treatment.

Key words: phlegmon of the oral cavity; Toll–like receptors; polymorphism; cytokines.

значительные различия частоты его аллельных вариантов у здоровых и больных при всех формах периодонтита [8]. Установлена роль TLR в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта [9, 10].

Учитывая важную роль системы врожденного иммунитета в возникновении воспаления, нарушение передачи импульса через TLR–сигнальный путь может быть одним из звеньев патогенеза многих острых и хронических воспалительных процессов [10], в том числе одонтогенной флегмоны.

Целью исследования было установление корреляции полиморф-

ных вариантов генов TLR 2, TLR 4 с образованием ОФДПР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследованы 50 пациентов в возрасте от 20 до 55 лет по поводу ОФДПР, без сопутствующих заболеваний, госпитализированных в отделение челюстно–лицевой хирургии Полтавской областной клинической больницы. На базе НИИ генетических и иммунологических основ развития патологии и фармакогенетики сформирована группа популяционного контроля, в которую включены 100 практически здо-

ровых жителей Полтавской области. У всех обследованных получено добровольное письменное согласие на участие в научном исследовании, которое проведено с разрешения комиссии по биоэтике.

Геномную ДНК пациентов экстрагировали из периферической крови с помощью набора реагентов "ДНК—экспресс—кровь" (ООО "НПО ДНК—Технология", Россия). Аллели полиморфных участков 2258G/A гена TLR 2 (rs5743708) и 896A/G гена TLR 4 (rs4986790) определяли по данным цепной реакции с полимеразой (ЦРП) с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров, последующим рестрикционным анализом и электрофоретической детекцией продуктов рестрикции в 3% агарозном геле. ЦРП проводили с помощью детектирующего амплификатора "Терцик" (ООО "НПО ДНК—Технология", Россия).

Статистическая обработка проведена с использованием программы "Statistica for Windows 7.0" (StatSoft Inc, США) и электронных таблиц MS Excel. С помощью критерия χ^2 проверяли распределение генотипов в исследованных группах на соответствие равновесию Харди — Вайнберга (РХВ). Для сравнения частот аллелей в группах использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса на непрерывность при числе степеней свободы равной 1. Путем анализа таблиц сопряженности 3×2 сравнивали частоту генотипов в исследованных группах с помощью точного теста Фишера. Рассчитывали отношение шансов (ОШ) с определением 95% доверительного интервала (ДИ) для сравнения частоты вариантов в несвязанных группах. Для всех видов анализа достоверными считали различия при $p < 0,05$, при $0,05 < p < 0,1$ отмечали тенденцию к достоверности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования изучено распределение генотипов полиморфного участка 2258G/A гена TLR2 (rs5743708) в контрольной группе и у больных при наличии

ОФДПР, рассчитана теоретически ожидаемая частота генотипов и аллелей этого гена в исследованных группах в соответствии с РХВ.

В контрольной группе обнаружены два генотипа — гомозиготный GG и гетерозиготный GA с частотой соответственно 97,0 и 3,0%.

При ОФДПР также наблюдали только два генотипа — GG и GA с частотой соответственно 92 и 8%. Гомозиготный генотип AA в исследованных группах не обнаружен.

Достоверные различия частоты генотипов в контрольной группе и у больных с ОФДПР не выявлены ($p = 0,22$).

При анализе внутригруппового распределения частоты генотипов и аллелей полиморфного варианта 2258G/A гена TLR2 (rs5743708) она соответствовала теоретически ожидаемой при РХВ как в контрольной группе ($\chi^2 = 0,00$, $df = 2$; $p = 1,0$), так и у больных ($\chi^2 = 0,09$, $df = 2$; $p = 0,96$) (табл. 1).

В обеих группах отмечено неравномерное распределение аллелей, поскольку показатель адекватного учета редких аллелей меньше 2 ($\mu < 2$), что подтверждается значением доли редких аллелей больше 0 ($h > 0$). Отрицательное значение коэффициента инбридинга свидетельствует об избытке гетерозигот.

При изучении частоты аллелей полиморфного варианта 2258G/A гена TLR2 (rs5743708) установлено, что в контрольной группе частота аллеля G составила 98,5%, аллеля А — 1,5%; у больных при ОФДПР частота аллелей G и А составила соответственно 96 и 4% и достоверно не различалась в группах ($\chi^2 = 0,90$, $df = 1$, $p = 0,344$). При определении склонности к возникновению ОФДПР у лиц, которые являются носителями аллеля А, значимая зависимость не выявлена (табл. 2).

Следующим этапом исследования было изучение распределения генотипов полиморфного варианта 896A/G гена TLR4 (rs4986790) в группах обследованных. Гомозиготный генотип AA выявлен в контрольной группе у 91% обследованных, гетерозиготный генотип AG — у 9%, гомозиготный генотип GG не

обнаружен. У больных при ОФДПР частота выявления генотипа AA составила 76%, генотипа AG — 20%, генотипа GG — 4%. При сравнении частоты генотипов в исследованных группах выявлены достоверные различия. Уровень значимости по данным точного теста Фишера составил 0,0001.

При внутригрупповом анализе распределения частоты генотипов и полиморфных аллелей гена TLR4 (rs4986790) установлено, что распределение генотипов в обеих группах соответствовало теоретически ожидаемому согласно РХВ. Однако наблюдали неравномерное распределение аллелей, о чем свидетельствовали показатели адекватного учета редких аллелей ($\mu < 2$) и доли редких аллелей ($h > 0$) (табл. 3).

У больных при ОФДПР положительный коэффициент инбридинга свидетельствовал о недостатке гетерозигот при условии случайного скрещивания и отклонениях от панмиксии, в отличие от контрольной группы, где этот показатель был отрицательным, что свидетельствовало об избытке гетерозигот.

Частота аллелей А и G полиморфного варианта 896A/G гена TLR4 (rs4986790) в контрольной группе составляла соответственно 95,5 и 4,5%, у больных при ОФДПР — 88 и 12%. При сравнении частоты аллелей в группах отмечено, что аллель G достоверно чаще выявляли у больных при ОФДПР, чем в контрольной группе ($\chi^2 = 4,67$, $p = 0,031$).

Установлена достоверная зависимость между наличием аллели G и повышенным риском возникновения ОФДПР (ОШ = 2,89, 95% ДИ = 1,18 — 7,12).

При анализе полученных данных отмечена достоверная корреляция между наличием полиморфизма 896A/G гена TLR4 (rs4986790) и повышенным риском возникновения ОФДПР, что подтверждают данные литературы, свидетельствующие о влиянии полиморфизма гена TLR4 на связывание молекулярных паттернов патогенов и изменение ответа на ЛПС, что нарушает защитные реакции организма на отноше-

Таблица 1. Распределение частоты генотипов и аллелей гена TLR2 2258G/A в группах

Генотипы в группах обследованных	Распределение генотипов		Сравнение частоты генотипов наблюдаемой и ожидаемой (df = 2)		Коэффициент инбридинга популяции (F)	Адекватный учет редких аллелей (μ)	Доля редких аллелей (h)
	наблюдаемое	ожидаемое	χ^2	p			
ОФДПР (n = 50)			0,09	0,96	-0,04	1,39	0,30
GG	46	46,08					
GA	4	3,84					
AA	-	-					
Контрольная (n = 100)			0,00	1,0	-0,02	1,24	0,38
GG	97	97,00					
GA	3	3,00					
AA	-	-					

Таблица 2. Распределение частоты аллелей полиморфного варианта гена TLR2 в группах

Алель	Количество аллелей в группах				χ^2 Пирсона (df=1)	ОШ (95% ДИ)	p
	контрольной		ОФДПР				
	абс.	%	абс.	%			
G	96	96	197	98,5	0,90	2,74 (0,60 – 12,47)	0,344
A	4	4	3	1,5			

Таблица 3. Распределение частоты генотипов и полиморфных аллелей гена TLR4 896A/G в группах

Генотипы в группах обследованных	Распределение генотипов		Сравнение частоты генотипов наблюдаемой и ожидаемой (df = 2)		Коэффициент инбридинга популяции (F)	Адекватный учет редких аллелей (μ)	Доля редких аллелей (h)
	наблюдаемое	ожидаемое	χ^2	p			
ОФДПР (n = 50)			2,94	0,23	0,24	1,65	0,18
AA	40	38,72					
AG	8	10,56					
GG	2	0,72					
Контрольная группа (n = 100)			2,02	0,36	-0,05	1,42	0,29
AA	91	91,20					
AG	9	8,60					
GG	-	2,00					

нии граммотрицательных микроорганизмов и способствует возникновению различных бактериальных инфекций.

Установление корреляции полиморфизма 896A/G гена TLR4 с повышением риска возникновения

ОФДПР позволит прогнозировать течение заболевания и оптимизировать схемы профилактики и лечения.

В последующих исследованиях планируется разработка алгоритма предупреждения возникновения

ОФДПР и консервативного лечения больных при полиморфизме 896A/G гена TLR4 с использованием современных нанотехнологий (наночастиц фосфатидилхолина).

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусов В. А. Микробная флора полости рта: пути заселения, распространения, распределения по биотопам полости рта в норме и патологии / В. А. Белоусов // *Стоматол. обозрение*. — 2004. — № 1. — С. 7 — 10.
2. Васильев А. К. О влиянии различных микроорганизмов на течение и степень тяжести заболеваний полости рта / А. К. Васильев // *Там же*. — № 27. — С. 1 — 3.
3. Imler J. L. Toll receptors in innate immunity / J. L. Imler, J. A. Hoffmann // *Trends Cell Biol.* — 2001. — Vol. 11, N 7. — P. 304 — 311.
4. Симбирцев А. С. Толл—белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета / А. С. Симбирцев // *Иммунология*. — 2005. — № 6. — С. 368 — 377.
5. Akira S. Toll—like receptor signalling / S. Akira, K. Takeda // *Nat. Rev. Immunol.* — 2004. — Vol. 4, N 7. — P. 499 — 511.
6. Байракова А. Л. Роль и биологическое значение Толл—подобных рецепторов в антиинфекционной резистентности организма / А. Л. Байракова, Е. А. Воропаева, С. С. Афанасьев // *Вестн. РАМН*. — 2008. — № 1. — С. 45 — 54.
7. Иванов А. М. Полиморфизм рецепторов врожденного иммунитета / А. М. Иванов, А. В. Апчел, Т. А. Камилова // *Вестн. Рос. воен.—мед. акад.* — 2009. — № 1 (25). — С. 172 — 184.
8. Brett P. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis / P. Brett, F. D'Alto, M. Tonetti // *J. Dent. Res.* — 2005. — Vol. 84, N 12. — P. 1149 — 1153.
9. Островська Л. Й. Поліморфізм Asp299Gly гена Toll—подібного рецептора 4 у генезі змін ясен у вагітних / Л. Й. Островська, Т. О. Петрушанко, І. П. Кайдашев // *Укр. стоматол. альманах*. — 2009. — № 6. — С. 17 — 19.
10. Шинкевич В. І. Роль Toll—рецепторів у патогенезі захворювань слизової оболонки порожнини рота / В. І. Шинкевич, І. П. Кайдашев // *Пробл. екології та медицини*. — 2010. — Т. 14, № 3—4. — С. 12 — 16.