

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ивановско Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Ивановско, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матриксных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).



Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ивановско Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Ивановско, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матриксных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-



служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

**Таблиця 4**  
*Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита*

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.



14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневой кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).



Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

**Таблиця 4**  
*Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита*

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ивановско Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Ивановско, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelnin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.



## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie piobakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневой кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матриксных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).



Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-



служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матриксных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.



14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).



Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матриксных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.



## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).



Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневой кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-



служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матриксных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

**Таблиця 4**  
*Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита*

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотика поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матриксных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.



14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневой кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).



Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.



## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).



Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

**Таблиця 4**  
*Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита*

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневи кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-



служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матриксных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.



14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневой кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ивановско Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Ивановско, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).



Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневой кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

**Таблиця 4**  
*Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита*

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.



## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневой кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневой кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).



Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневой кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-



служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

**Таблиця 4**  
*Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита*

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.



14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матриксных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневой кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).



Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

**Таблиця 4**  
*Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита*

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ивановско Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Ивановско, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневой кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.



## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневой кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

**Таблиця 4**  
*Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита*

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матриксных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).



Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-



служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

**Таблиця 4**  
*Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита*

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.



14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матриксных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневой кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).



Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотика поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

**Таблиця 4**  
*Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита*

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontal Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.



## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).



Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневой кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матриксных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-



служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможные генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

**Таблиця 4**  
*Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита*

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневого кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

**Таблиця 4**  
*Распределение частот генотипов полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита*

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние Lys/Lys гена TNFRSF11B у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена IL-1β и Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1β и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1β inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.



14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976-1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.

## СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.314.17-008.1-036.12:575.174.015.3

Желнин Е.В.

### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-1 $\beta$ И TNFRSF11B В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА

Харьковский национальный медицинский университет

*В реализации механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита (ХП) с тяжелыми формами осложнений участвуют многообразные факторы, из которых менее всего изучены генетические. Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП. Материалы и методы. В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола и 60 здоровых добровольцев (контроль). ДНК выделяли из ротовой жидкости. Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B. Результаты. Частота встречаемости генотипа CC, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контроль (6,7 %) в 4,3 раза ( $p < 0,05$ ). Частоты встречаемости генотипа TT и генотипа TC гена IL-1 $\beta$  в группе пациентов ХП достоверно не отличаются от контроля. Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, в контроле – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 %, генотипа Asp/Asp у 14,3 % пациентов ХП и достоверно не отличается от контроля. Выводы. 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B в группе больных с ХП. 2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B, обуславливающих повышенный генетический риск развития ХП, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.*

Ключевые слова: ген интерлейкина-1 $\beta$ , ген остеопротегерина, хронический периодонтит.

*Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Харьковского национального медицинского университета «Усовершенствование и разработка новых индивидуализированных методов диагностики и лечения стоматологических заболеваний у детей и взрослых» (№ гос. регистрации 0112U002382).*

Развивающееся хроническое воспаление в периодонте при нормальном иммунном статусе следует рассматривать как защитный барьер, предотвращающий распространение и попадание продуктов распада тканей, микроорганизмов и их токсинов в общую крово-лимфоциркуляцию из зоны инфекционного воспаления около верхушки корня зуба. Однако формирование этого защитного барьера может быть нарушено как в результате повышения вирулентности микрофлоры, так и в связи с недостаточностью функционирования иммунной системы.

Недостаточное образование противовоспалительных барьеров и снижения регенерации костной ткани сопровождается формированием и распространением очагов деструкции в периапикальной области. Течение хронического периодонтита может проходить с формированием корневой кисты зуба, что сопровождается прогрессирующим разрушением костной стенки.

В реализации патогенетических механизмов прогрессирования периодонтита участвуют многообразные клеточные элементы крови, соединительной ткани, иммунной системы и много-

численные гуморальные факторы, в том числе цитокины, представляющие собой чрезвычайно сложную клеточно-медиаторную систему [1-4].

Поиск механизмов развития и прогрессирования хронического периодонтита с тяжелыми формами осложнений, с деструкцией костной альвеолярной ткани обращает внимание исследователей на изучение генетической природы большинства хронических заболеваний органов ротовой полости, в том числе и периодонтита.

Уровни иммунореактивности закреплены генетически, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов. При развитии периодонтита изменяется уровень экспрессии генов иммунного ответа, генов интерлейкинов [2]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. По мере выздоровления экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Обнаружена прямая связь между накоплением цитокинов и степенью дегенеративно-деструктивных поражений альвеолярной кости при периодонтите [5, 6]. Особого внимания за-

служивают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) [7-9]. Считается, что преимущественно эти медиаторы ответственны за резорбцию твердых и мягких структур пародонта [10-12]. IL-1 $\beta$  индуцирует продукцию матричных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает продукцию RANKL и функциональную активность остеокластов. Также установлено, что IL-1 $\beta$  тормозит миграцию остеобластов [13]. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  вовлечены в различные патогенетические звенья деструкции костной ткани: с одной стороны, активируя деятельность остеокластов, с другой – функциональную активность остеобластов.

Ключевая роль в формировании, дифференцировке и функционировании остеокластов принадлежит цитокинам семейства TNF – RANK, RANKL и OPG как молекулярным посредникам других медиаторов обновления костной ткани. RANKL, лиганд рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B, экспрессируется на остеобластах и стромальных клетках, а также Т-лимфоцитах и других клетках. Он связывается с RANK, находящимся на предшественниках остеокластов, стимулируя их дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз остеокластов. OPG – остеопротегерин, растворимый «ложный» рецептор RANKL, конкурентно тормозит связывание RANKL с RANK, чем блокирует образование остеокластов и таким образом способствует повышению массы костной ткани. Система RANKL/RANK/OPG, точнее, баланс между продукцией RANK и OPG занимает центральное место в регуляции резорбтивной активности остеокластов как первого необходимого звена в обмене костной ткани [5,14]. Ген TNFRSF11B (OPG), который картирован на длинном плече 8 хромосомы в области q23-24, содержит 5 экзонов протяженностью 29 Кб, является мощным ингибитором активации и дифференциации остеокластов.

Рассматривать хроническое заболевания периодонта необходимо с позиций активно происходящих резорбции/репарации альвеолярной кости под влиянием системы цитокинов, как индуцирующих остеокластогенез IL-1 $\beta$ , так и лимитирующих его – TNFRSF11B (OPG). Равновесный баланс регуляторных пептидов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B (OPG) обеспечивает постоянный процесс резорбции-репарации костной ткани.

Для развития хронического периодонтита (ХП) важны такие факторы внешней среды как патогенная одонтопатогенная микрофлора. Полиморфный вариант генов, которые контролируют развитие тканей периодонта, могут являться факторами риска периодонтита.

Цель исследования: изучить распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров

генов иммунорегуляторных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNFRSF11B при ХП.

### **Материалы и методы**

В исследовании приняли участие 35 человек с диагнозом ХП в возрасте от 27 до 77 лет обоего пола, которые составили 1 группу. Контрольную или 2 группу составили 60 человек без признаков деструктивно-воспалительных заболеваний органов ротовой полости.

Генетические исследования проведены с учетом информированного согласия пациентов обеих групп. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из биологического материала (ротовой жидкости) с помощью реагента «ДНК-экспресс» НПФ ЛИТЕХ (Россия). Использовали диагностические тест-системы «ДНК-экспресс» T-31C гена IL-1 $\beta$  и Lys3Asp гена TNFRSF11B производства НПФ ЛИТЕХ (Россия). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в реальном времени с последующей визуализацией по кривым плавления. Амплификацию проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Австралия).

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6. Частоту каждого из полиморфизмов определяли с помощью анализа таблиц сопряженности (критерий  $\chi^2$ ), различия количественных показателей между группами определяли посредством дисперсионного анализа (F-крит) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Ассоциации аллелей и генотипов с признаками ХП оценивали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле:  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  - частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  - частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [15].

### **Результаты и обсуждения**

Результаты генетического анализа показали, что в обеих группах обследуемых лиц были выявлены все три возможных генотипа — ТТ, ТС и СС с разной частотой встречаемости (табл.1). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов гена IL-1 $\beta$  в группе обследованных лиц с диагнозом ХП и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частота встречаемости генотипа СС, сопряженного с увеличением синтеза провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , составила 28,6 %, превышая контрольные значения (6,7 %) в 4,3 раза и являясь статистически достоверным ( $p=0,009$ ).

Таблица 1  
Распределение полиморфизмов гена IL-1β в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
ТТ	14	40	25	41,7	≥0,05 (p=0,95)
ТС	11	31,4	31	51,7	≥0,05 (p=0,09)
СС	10	28,6	4	6,7	≤0,05 (p=0,009)

Учитывая важную роль, которую IL-1β играет в патогенезе воспалительно-костной, вполне доказанным является предположение, что полиморфный деструктивных заболеваний пародонта и его индуцирующем влиянии на резорбцию альвеолярной кости гена -31T>C IL-1β обуславливает агрессивное течение хронического периодонтита, сопровождающееся активной резорбцией альвеолярной кости. Генотип СС гена -31T>C IL-1β сопровождается увеличением экспрессии гена в 5 раз и 2-3-кратным увеличением продукции провоспалительного цитокина IL-1β [16].

Частоты встречаемости генотипа ТТ гена IL-1β в группе пациентов ХП и в контрольной группе имели практически одинаковые значения 40 % и 41,7 %, соответственно. Для распреде-

ления частот встречаемости генотипа ТС гена IL-1β характерным являлось снижение до 31,4 % в группе с ХП по сравнению с 51,7 % в контроле. Такое перераспределение сопряжено с выраженным увеличением числа пациентов с генотипом СС в группе с ХП.

Носительство генотипа СС (OR = 5,6, ДИ 1,602 - 19,58) является фактором повышенного риска развития патологии, а носительство генотипа ТТ (OR = 0,93, ДИ 0,399 - 2,181) и ТС (OR = 0,43, ДИ 0,179 - 1,029) коррелируют со сниженным риском развития ХП (табл.2). Полиморфный вариант СС гена IL-1β связан с его гиперэкспрессией и активным синтезом провоспалительного цитокина, что является индуцирующим фактором в развитии ХП.

Таблица 2  
Распределение частот генотипов полиморфизма -31T>C гена IL-1β и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	χ <sup>2</sup>	p (χ <sup>2</sup> )
	n	%	n	%				
ТТ	14	40	25	41,7	0,933	0,399 - 2,181	9,260	0,01
ТС	11	31,4	31	51,7	0,429	0,179 - 1,029		
СС	10	28,6	4	6,7	5,600	1,602 - 19,58		

Исследование частоты полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B в группе пациентов с ХП и контроле показало, что были выявлены все

три возможные генотипа – Lys/Lys, Lys/Asp и Asp/Asp с разной частотой встречаемости (табл.3).

Таблица 3  
Распределение полиморфизмов гена TNFRSF11B в исследуемых группах

Генотипы	1 группа		Контроль		χ <sup>2</sup>
	N (n=35)	%	N (n=60)	%	
Lys/Lys	18	51,4	16	26,7	≤0,05 (p=0,015)
Lys/Asp	12	34,3	29	48,3	≥0,05 (p=0,18)
Asp/Asp	5	14,3	15	25,0	≥0,05 (p=0,22)

Частота генотипа Lys/Lys в группе с ХП составила 51,4 %, а в контрольной группе – 26,7 %, различия достигали уровня статистической значимости (χ<sup>2</sup>=5,9; p=0,015). Гетерозиготный вариант полиморфизма Lys/Asp представлен у 34,3 % пациентов 1 группы, так в контрольной группе 48,3 %, различия статистически недостоверны (χ<sup>2</sup>=1,78; p=0,18). Генотип Asp/Asp в группе с ХП встречался с частотой 14,3 %, а в группе контроля – 25 %, что не имело статистической достоверности (χ<sup>2</sup>=1,53; p=0,22).

Таким образом, генотип Lys/Lys оказался протективным для пациентов ХП. Данный полиморфный вариант гена TNFRSF11B связан с активным синтезом остеопротегерина (OPG), бел-

ка, связывающего RANK – специфический рецептор мембраны прешествеников остеокластов, тем самым, препятствуя соединению RANK с RANK-лигандом и последующей трансформации и дифференцировке остеокластов и, в конечном итоге, блокируя остеокластогенез, тормозит костную резорбцию.

Изучение степени ассоциации полиморфизма Lys3Asp гена TNFRSF11B и развития ХП показало, что генотип Lys/Lys связан с повышенным риском развития ХП (OR = 2,9, ДИ 1,213 - 6,99) (табл.4). Тогда как носительство Lys/Asp и Asp/Asp, напротив, со сниженной вероятностью развития заболевания (OR = 0,56, ДИ 0,235 - 1,321 и OR = 0,5, ДИ 0,164 - 1,521, соответственно).

Таблиця 4  
Распределение частот генотипов полиморфизма *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* и степень ассоциации с признаками хронического периодонтита

Генотипы	1 группа (N=35)		Контроль (N=60)		OR	95% ДИ	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
	n	%	n	%				
Lys/Lys	18	0,514	16	0,267	2,912	1,213 - 6,99	6,003	0,05
Lys/Asp	12	0,343	29	0,483	0,558	0,235 - 1,321		
Asp/Asp	5	0,143	15	0,250	0,500	0,164 - 1,521		

Гомозиготное состояние *Lys/Lys* гена *TNFRSF11B* у пациентов с ХП связано с гиперпродукцией белка OPG и остеопротективным действием при костно-резорбтивном процессе периодонта воспалительного генеза.

Таким образом, подтверждается тот факт, что кость является высокодинамичной тканью с активно протекающими в ней метаболическими процессами, в которых задействовано множество молекулярных регуляторных факторов.

### Выводы

1. Изучено распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров -31T>C гена *IL-1 $\beta$*  и *Lys3Asp* гена *TNFRSF11B* в группе пациентов с хроническим периодонтитом. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B* в группе больных с хроническим периодонтитом.

2. Выявление аллельных вариантов полиморфных маркеров генов-кандидатов *IL-1 $\beta$*  и *TNFRSF11B*, обуславливающих повышенный генетический риск развития хронического периодонтита, позволяет прогнозировать возникновение и течение заболевания.

### Литература

1. Беляева О.В. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом / О.В. Беляева, Н.Н. Кеворков // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Булгакова А.И. Влияние пробиотического поливалентного и интерферона на лечение хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев, Т.О. Чемикосова и др. // Иммунол., аллергол., инфектол. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Иванюшко Т.П. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите / Т.П. Иванюшко, Л.В. Ганковская, Л.В. Ковальчук [и др.] // Стоматология. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Зайцева Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с использованием линимента циклоферона : автореф. дисс. канд. мед. наук. – Саратов, 2007. – 24 с.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.

10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, [et al.] // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.
14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // Hum Genet. – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D.G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### References

1. Belyaeva O.V. Vliyanie kompleksnoy terapii na pokazateli mestnogo immuniteta bolnykh parodontitom / O.V. Belyaeva, N.N. Kevorkov // Tsitokiny i vospalenie. – 2002. – № 4. – С. 24–28.
2. Bulgakova A.I. Vliyanie probakteriofaga polivalentnogo i interferona na lechenie khronicheskogo generalizovannogo parodontita / A.I. Bulgakova, Yu.A. Medvedev, T.O. Chemikosova [i dr.] // Immunol., allergol., infektol. – 2000. – № 2. – С. 2–4.
3. Ivanyushko T.P. Kompleksnoe izucheniye mekhanizmov razvitiya khronicheskogo vospaleniya pri parodontite / T.P. Ivanyushko, L.V. Gankovskaya, L.V. Kovalchuk [i dr.] // Stomatologiya. – 2000. – № 4. – С. 19–22.
4. Holla L.I. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in czech patients with chronic periodontitis / L.I. Holla, A. Fassmann, A. Stejskalová [et al.] // J. Periodontol. – 2004. – Vol. 75. – P. 1320–1347.
5. Hofbauer L.C. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs [et al.] // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – P. 4382–4389.
6. Richards J.B. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study / J.B. Richards, F. Rivadeneira, M. Inouye [et al.] // Lancet. – 2008. – V. 371. – P. 1505–1512.
7. Zaytseva E.M. Kliniko-mikrobiologicheskie paralleli i tsitokinovyy profil u bolnykh parodontitom na fone kompleksnogo lecheniya s ispolzovaniem linimenta tsikloferona : avtoref. diss. kand. med. nauk. – Saratov, 2007. – 24 s.
8. Ertugrul A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis / A. Ertugrul, H. Sahin, A. Dikilitas [et al.] // J.Periodontol Res. – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 44–51.
9. Yin L. IL-1 beta mRNA and TNF-alpha mRNA expression in gingival tissues of patients with adult periodontitis / L. Yin, L. Li, Y. Pan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2001. – Vol. 19, № 5. – P. 318–321.
10. Graves D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // J. Periodontol. – 2003. – Vol. 74., № 3. – P. 391–401.
11. Polak D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response / D. Polak, A. Wilensky, L. Shapira [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol. 36., № 5. – P. 406–410.
12. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. Bhongade // Dent Today. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 60–62.
13. Hengartner N. IL-1 $\beta$  inhibits human osteoblast migration / N. Hengartner, J. Fiedler, A. Ignatius, R. Brenner // Mol. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 36–42.

14. Hsu Y.H. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men / Y.H. Hsu, T. Niu, H.A. Terwedow [et al.] // *Hum Genet.* – 2006. – V. 118. – P. 568–577.
15. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA / O.Yu. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2003. – 312 s.
16. Hall S.K. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein / S.K. Hall, D. G. Perregaux, C. A. Gabel [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50 (6). – P. 1976–1983.

### Реферат

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМОВ ГЕНІВ IL-1 $\beta$  ТА TNFRSF11B В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДОНТИТУ

Желнін Є.В.

Ключові слова: ген інтерлейкіну-1 $\beta$ , ген остеопротегерину, хронічний періодонтит.

У реалізації механізмів розвитку і прогресування хронічного періодонтиту (ХП) з важкими формами ускладнень беруть участь численні чинники, з яких найменше вивчені генетичні. Мета дослідження: вивчити розподіл алелей та генотипів поліморфних маркерів генів імунорегуляторних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B при ХП. Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 35 пацієнтів з діагнозом ХП у віці від 27 до 77 років обох статей і 60 здорових добровольців (контроль). ДНК виділяли з ротової рідини. Використовували діагностичні тест-системи «ДНК-експрес» T-31C гена IL-1 $\beta$  і Lys3asp гена TNFRSF11B. Результати. Частота зустрічаності генотипу CC, пов'язаного із збільшенням синтезу прозапального цитокіну IL-1 $\beta$ , склала 28,6 %, перевищуючи контроль (6,7 %) в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ). Частоти зустрічаності генотипу TT і генотипу TC гена IL-1 $\beta$  у групі пацієнтів ХП достовірно не відрізняються від контролю. Частота генотипу Lys/lys в групі з ХП склала 51,4 %, у контролі – 26,7 % ( $p < 0,05$ ). Варіант поліморфізму Lys/asp представлений в 34,3 %, генотипу Asp/asp в 14,3 % пацієнтів ХП і достовірно не відрізняється від контролю. Висновки. 1. Виявлена асоціація поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B в групі хворих з ХП. 2. Виявлення алельних варіантів поліморфних маркерів генів-кандидатів IL-1 $\beta$  та TNFRSF11B, що обумовлюють підвищений генетичний ризик розвитку ХП, дозволяє прогнозувати виникнення і перебіг захворювання.

### Summary

ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1 $\beta$  AND TNFRSF11B IN CHRONIC PERIODONTITIS

Zhelinin Ye. V.

Key words: gene IL-1 $\beta$ , gene osteoprotegerin, chronic periodontitis.

A number of factors are involved in the implementation of the mechanisms of development and progression of chronic periodontitis (CP) with severe complications involving, but genetic ones are the least studied. Objective: to study the distribution of genotypes and alleles of polymorphic markers of genes of immunoregulatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in CP. Materials and methods. The study involved 35 patients aged 27 to 77 years of both sexes who were diagnosed to have CP and 60 healthy volunteers who made up a control group. DNA was taken from the oral fluid. We used diagnostic test systems "DNA Express" T-31 C gene IL-1 $\beta$  gene and Lys3asp TNFRSF11B. Results. Frequency of genotype CC occurrence, associated with increasing synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , was 28.6%, exceeding the control (6.7%) in 4.3 times ( $p < 0.05$ ). The frequencies of TT genotype and TC genotype of the gene IL-1 $\beta$  in patients CP were not significantly different from the control. The frequency of genotype Lys / lys in the group with CP was 51.4%, while in the control it was 26.7% ( $p < 0.05$ ). Variant of polymorphism Lys / asp was represented in 34.3%, while Asp / asp genotype was observed in 14.3% of CP patients and was not significantly different from the controls. Conclusions. 1. There has been found out the association of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B in the patients with CP. 2. There are allelic variants of polymorphic markers of candidate genes IL-1 $\beta$  and TNFRSF11B, causing increased genetic risk of CP, that enables to predict the occurrence of the disease.