

УДК: [616.248+616.516.5+616.211-002-056.3]-053.2.-06:616.311.2-002

Можливості використання генетичних предикторів гінгівіту у дітей на тлі atopічних захворювань

Possibility of Use of Genetic Predictors of Gingivitis in Children with Atopic Disease

Кривенко Л.С.¹, к.мед.н.,
Назарян Р.С.¹, проф., д.мед.н.,
Волкова Н.Є.², к.біол.н., доц.,
Горенська О.В.², к.біол.н., доц.

¹Харківський національний медичний університет

²Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна

Kryvenko L.S.¹, Nazarian R.S.¹,
Volkova N.Ye.², Horenska O.V.²

¹Kharkiv National Medical University

²V.N. Karazin Kharkiv National University

Адреса для кореспонденції:

Кривенко Людмила Станіславівна

e-mail: milas777@ukr.net

Мета: Проведення генотипування дітей мешканців Харківської області з проявами хронічного гінгівіту на тлі atopічних захворювань за SNP rs1801270 C>A в кодоні 31 гена P21 (CDKN1A). **Методи:** Загалом обстежено 48 дітей віком від 6 до 18 років, з яких 36 осіб увійшли в основну групу (встановлено діагноз «гінгівіт» на тлі бронхіальної астми, алергічного риніту та/або atopічного дерматиту) та 12 осіб становили контрольну групу (без цих діагнозів). Діагноз хронічного гінгівіту встановили за допомогою об'єктивних основних та допоміжних методів дослідження відповідно до класифікації МКХ-10. Для реєстрації змін у тканинах пародонта застосовували індекс SBI. Для встановлення змін у імунній системі провели аналіз рівнів сироваткового імуноглобуліну А (IgA, г/л) та імуноглобуліну G (IgG, г/л). Для проведення генотипування використовували клітини букального епітелію.

Результати: У всіх генотипових підгрупах виявлено прямий зв'язок між індексом кровоточивості ясен та кожним з типів досліджуваних імуноглобулінів. Спостерігали тенденцію до різного формування імунної відповіді (за двома різними імуноглобулінами) у пацієнтів з atopічними захворюваннями та різними генотипами за rs1801270 поліморфізмом, зокрема гомозиготи AA тяжіють до агресивнішого перебігу гінгівіту. **Висновки:** Цей поліморфізм може бути перспективним для подальшого аналізу його асоціації з характером розвитку запальних процесів ясен у таких пацієнтів.

Ключові слова: гінгівіт, бронхіальна астма, алергічний риніт, atopічний дерматит, генетичний предиктор.

Purpose: Genotyping children residents of Kharkiv region with symptoms of chronic gingivitis on a background of atopic diseases by SNP rs1801270 C>A in codon 31 gene P21 (CDKN1A). **Methods:** 48 children aged 6 to 18, of which 36 people included in the study group (diagnosed as «gingivitis» on the background of asthma, allergic rhinitis and/or atopic dermatitis) and 12 individuals in the control group (without comorbidity). The diagnosis of chronic gingivitis was installed using main and additional objective research methods according to the ICD-10 classification. To register changes in periodontal tissues used index SBI. To establish changes in the immune system was analyzed serum immunoglobulin A (IgA, g/l) and immunoglobulin G (IgG, g/l). For the genotyping, buccal epithelium cells were used. **Results:** In all genotypic groups a direct relationship between the index SBI and each type of immunoglobulin was found. There was a trend towards the formation of various immune responses (two different immunoglobulin types) in patients with atopic diseases and different genotypes for rs1801270 polymorphism, including AA homozygotes tend to flow gingivitis that is more aggressive. **Conclusions:** This polymorphism may be promising for further analysis of its association with the character of gum inflammation in these patients.

Key words: gingivitis, asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, genetic predictors.

ВСТУП

Поширеність захворювань пародонта, а саме хронічного гінгівіту, серед дітей та осіб молодого віку постійно зростає [1]. Одним із сучасних підходів до розв'язання подібних завдань є пошук генетичних маркерів,

наприклад, однонуклеотидних поліморфізмів, асоційованих з певними мультифакторними захворюваннями у конкретних популяціях [2]. Мета дослідження – проведення генотипування дітей мешканців Харківської області з проявами хронічного гінгівіту на тлі atopічних захворювань за

SNP rs1801270 C>A в кодоні 31 гена P21 (CDKN1A).

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

ВИБІРКА

Дослідження виконане на базі Харківської обласної дитячої лікарні №1. Зага-

лом обстежено 48 дітей віком від 6 до 18 років, з яких 36 осіб увійшли до основної групи (встановлено діагноз «гінгівіт» на тлі бронхіальної астми, алергічного риніту та/або atopічного дерматиту) та 12 осіб становили контрольну групу (без цих діагнозів). Всі обстежені та їх батьки були поінформовані щодо мети дослідження і методик, що будуть застосовуватись, та надали добровільну письмову згоду на участь. Діагноз хронічного гінгівіту встановили за допомогою об'єктивних основних та допоміжних методів дослідження за протоколом обстеження дітей із захворюваннями пародонта відповідно до класифікації МКХ-10. Для реєстрації змін у тканинах пародонта застосовували шкалу (H.R. Muhlemann та S. Son, 1971) індексної оцінки стану тканин ясен і кровоточивості у балах (SBI). Для встановлення змін в імунній системі провели аналіз рівнів сироваткового імуноглобуліну А (IgA, г/л) та імуноглобуліну G (IgG, г/л). Використовували імуноферментний аналізатор LabLine-90 та комерційні набори компанії «Вектор-Бест» (Росія). Аналіз проводили за доданням до набору методикою.

ГЕНОТИПУВАННЯ. ЗАБІР БІОМАТЕРІАЛУ

Для проведення генотипування використовували клітини букального епітелію. Забір біоматеріалу для дослідження проводили під час стоматологічного обстеження за допомогою стерильного одноразового урогенітального зонда в індивідуальному пакуванні з маркуванням відповідно до методики [3].

ПРОБОПІДГОТОВКА

Для проведення генотипування з клітин букального епітелію виділяли ДНК за допомогою комерційного набору Diatom™ DNA Prep 100 (Росія) відповідно до інструкції виробника. Типування rs1801270 C>A поліморфізму в кодоні 31 гена P21 (CDKN1A)

проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з подальшим аналізом поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Для ампліфікації використовували праймери [3]:

rs1801270 F - 5'-GTCAGAACCGGCTGGGGATG-3'
rs1801270 R - 5'-CTCCTCCCAACTCATCCCGG-3'.

Для проведення ПЛР використовували автоматичний термоциклер Терцик («ДНК-Технологія», Росія) та комерційні набори реагентів GenPak™ PCR Core (0,5 мл) (Росія) відповідно до інструкцій виробників. Умови ПЛР: денатурація протягом 5 хв. при 94 °С; 35 циклів, що складаються з денатурації протягом 20 с при 94 °С, відпал праймерів протягом 20 с при 58 °С, елонгація протягом 20 с при 72 °С; остаточна елонгація протягом 10 хв. при 72 °С [4]. Перед проведенням ПДРФ аналізу всі зразки перевіряли на наявність ампліфікованого фрагмента (272 п.н.). Детекцію результатів ПЛР проводили розділенням продуктів ампліфікації у 2% агарозному гелі при постійній напрузі 70 В протягом 1 години. Для проведення електрофорезу використовували комерційні набори ELA-50 («Неоген», Україна). Візуалізацію фрагментів виконували шляхом обробки гелю етидієм бромідом та подальшим аналізом на тансілюмінаторі в ультрафіолетовому світлі. Розміри фрагментів визначали у порівнянні з маркером молекулярної маси rUC19 DNA/Mspl (HpaII) Marker, 23 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Потім продукти ампліфікації піддавали рестрикції ферментом Bpu1102I (BlnI) («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Реакцію здійснювали відповідно до інструкції виробника. Детекцію результатів рестрикції проводили через розділення продуктів у 2% агарозному гелі при постійній напрузі 70 В протягом 1 години. Наявність сайту рестрикції (2 продукти рестрикції (парануклеотидів, п.н.): 183 п.н. + 89 п.н.)

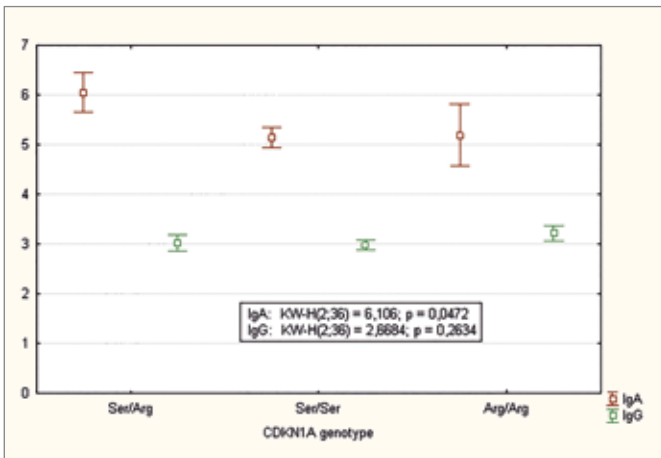
свідчила про алель С у третій позиції кодону 31 гена P21 (Ser у 31 позиції поліпептидного ланцюга). Відсутність сайту рестрикції (один фрагмент 272 п.н.), відповідно, – про алель А (Arg у 31 позиції поліпептидного ланцюга). Отже, гомозиготи СС (Ser/Ser) характеризувались наявністю двох фрагментів ДНК розміром 183 п.н. та 89 п.н.; гомозиготи АА (Arg/Arg) – наявністю одного фрагмента розміром 272 п.н.; гетерозиготи СА (Ser/Arg) – наявністю трьох фрагментів розміром 272 п.н., 183 п.н. та 89 п.н. [3].

МЕТОДИ СТАТИСТИЧНОГО АНАЛІЗУ ДАНИХ

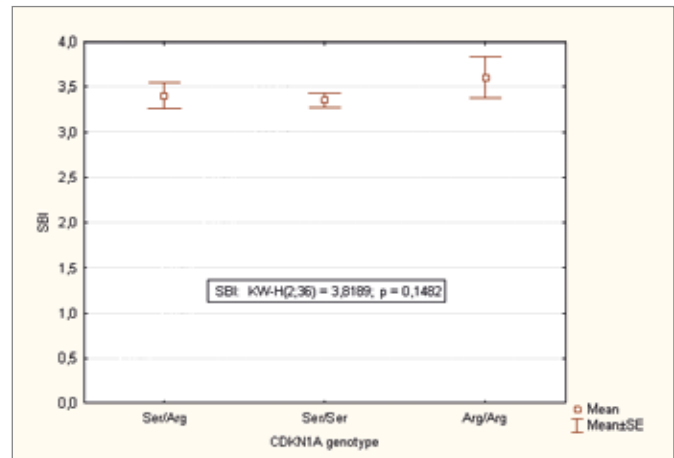
Порівняння контрольної та основної груп здійснювали за допомогою критерію Краскела–Волліса. Вибіркові частки порівнювали за допомогою F-критерію. Порівняння теоретично очікуваних та фактичних частот генотипів здійснювали за допомогою критерію χ^2 . Для розрахунків використовували програмне забезпечення Statistica 8.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

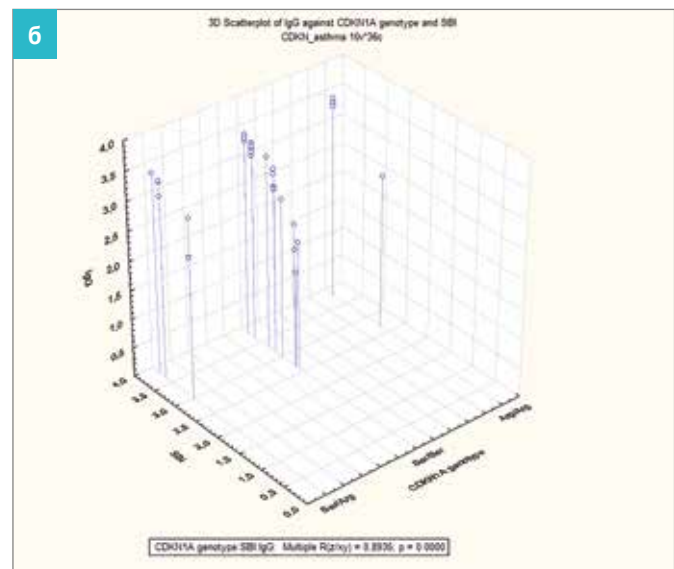
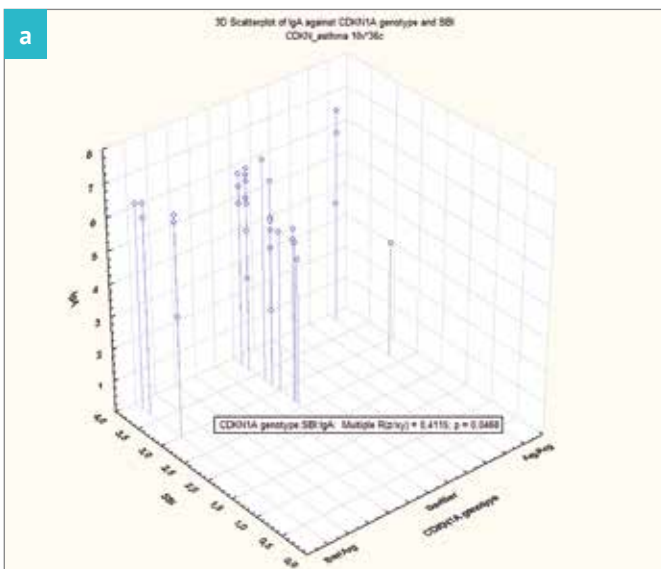
У дослідженні провели порівняльний аналіз рівня імуноглобулінів А та G (мал. 1). Найбільші значення показника сироваткового імуноглобуліну А характерні для гетерозигот СА. Статистично вірогідно від них відрізняються гомозиготи СС (критерій Краскела–Волліса з поправкою на множинні парні порівняння: $H=6,106$; $p=0,0472$; $z'=2,47$; $p=0,04$), при чому нижчими значеннями. Водночас гомозиготи АА характеризуються найбільшою варіабельністю цього показника з тенденцією до нижчих значень. Щодо рівня імуноглобуліну G (мал. 1), гомозиготи СС та гетерозиготи СА не відрізняються між собою за середніми значеннями показника, але



Мал. 1. Характеристика пацієнтів основної групи за рівнями сироваткових імуноглобулінів А та G залежно від генотипу за rs1801270 поліморфізмом



Мал. 2. Характеристика пацієнтів основної групи за показником кровоточивості ясен залежно від генотипу за rs1801270 поліморфізмом



Мал. 3. Розподіл пацієнтів основної групи з різними генотипами за rs1801270 поліморфізмом за індексом кровоточивості ясен та рівнями сироваткових імуноглобулінів А (а) та G (б)

гетерозиготи є варіабельнішими. Гомозиготам AA властива тенденція до більшого рівня цього імуноглобуліну. Аналогічним розподілом характеризується показник кровоточивості ясен (мал. 2). Незважаючи на те, що статистично вірогідного впливу генотипу (за rs1801270) доведено не було ($N=3,8189$; $p=0,1482$), досить чітко виражена тенденція до більших значень цього показника в гомозигот AA. Отже, доцільним є продовження генотипування хворих на atopічні захворювання, ускладнені гінгівітом, за поліморфізмом rs1801270, щоб під-

твердити або спростувати асоціацію AA гомозиготності за досліджуваним поліморфізмом із агресивнішим перебігом гінгівіту.

У всіх генотипових підгрупах виявили прямий зв'язок між індексом кровоточивості ясен та кожним із типів досліджуваних імуноглобулінів (мал. 3, 4). Найсильнішим (мал. 3, б) цей зв'язок є із рівнем імуноглобуліну G ($R(z/y)=0,89$; $p<0,001$). Імуноглобулін G (IgG) – основний ізотип сироватки людини. У кількісному співвідношенні він домінує серед усіх видів імуноглобулінів. До цього класу належать

основні антитіла, які забезпечують тривалий гуморальний імунітет людини до інфекцій. Імуноглобуліни класу G виробляються у відповідь під час вторинного контакту з антигеном.

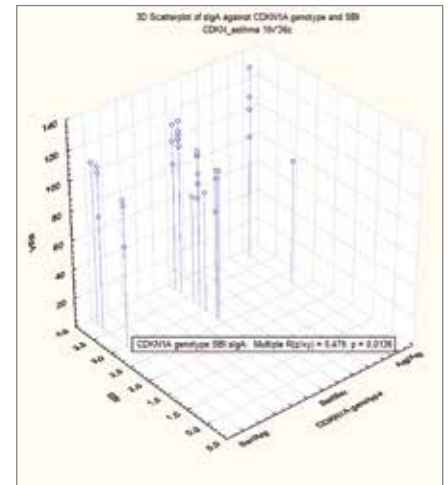
Отже, спостерігається тенденція до різного формування імунної відповіді (за двома різними імуноглобулінами) у пацієнтів з atopічними захворюваннями та різними генотипами за rs1801270 поліморфізмом, зокрема гомозиготи AA тяжіють до агресивнішого перебігу гінгівіту. Тобто цей поліморфізм може бути перспективним для подальшого аналізу (на більших

вибірках) його асоціації з характером розвитку запальних процесів ясен у таких пацієнтів.

ВИСНОВКИ

Під час дослідження прогенотиповано 48 осіб за поліморфізмом rs1801270. Розраховані частоти генотипів та алелів за вказаним поліморфізмом загальною та в контрольній та основній (з діагнозом гінгівіт на тлі atopічних захворювань) групах окремо. Частота алелю С становила в середньому 0,76, частота алелю А – 0,24, що відповідає частотам алелів за цим поліморфізмом, розрахованими за даними різних світових досліджень, але відрізняються від частот алелів, встанов-

лених для європейських популяцій (внаслідок підвищеної частоти алелю А). Встановлено, що в основній групі частоти генотипів відхиляються від очікуваних за законом Харді–Вайнберга. Також спостерігається тенденція до різного формування імунної відповіді (за двома різними імуноглобулінами) у пацієнтів основної групи з різними генотипами за rs1801270 поліморфізмом, зокрема гомозиготи АА з atopічними захворюваннями тяжіють до агресивнішого перебігу гінгівіту. Вважаємо цей поліморфізм перспективним для подальшого аналізу асоціації з характером розвитку запальних процесів ясен у пацієнтів з астмою, алергічним ринітом чи atopічним дерматитом.



Мал. 4. Розподіл пацієнтів основної групи з різними генотипами за rs1801270 поліморфізмом за індексом кровоточивості ясен та рівнем секреторного імуноглобуліну А

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Хоменко Л.А. Заболевания пародонта у лиц молодого возраста: проблема риска и диагностики / Л.А. Хоменко, Н.В. Биденко, Е.И. Остапко // *Стоматолог*. – 2006. – №1–2. – С. 54–57.
2. *Gingival Diseases – their aetiology, prevention and treatment* / Ed. by Fotinos S. Panagakos and Robin M. Davies / InTech. – 2011. – 246 p.
3. Claire M. Collection of human genomic DNA from buccal cells for genetics studies: comparison between cytobrush, mouthwash, and treated card / M. Claire, S. Isabelle, J. Clavel et al // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2005. – №3. – P. 291–296.
4. Bau D.T. Association of p53 and p21(CDKN1A/WAF1/CIP1) polymorphisms with oral cancer in Taiwan patients / D.T. Bau, M.H. Tsai, Y.L. Lo et al // *Anticancer Res*. – 2007. – Vol. 27. – P. 1559–1564.

REFERENCES

1. Homenko, L.A., Bidenko, N.V., & Ostapko, E.I. (2006). Zabolevaniya parodonta u lits mladogo vozrasta: problema riska i diagnostiki. *Stomatolog*, no. 1–2, pp. 54–57 (in Russian).
2. S. Panagakos F., & Robin M (ed.) (2011). *Davies Gingival Diseases – their aetiology, prevention and treatment*. InTech, 246 p. (in English).
3. Mulot, C., Stucker, I., Clavel, J., & et al. (2005). Collection of human genomic DNA from buccal cells for genetics studies: comparison between cytobrush, mouthwash, and treated card. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 3, pp. 291–296 (in English).
4. Bau, D.T., Tsai M.H., Lo, Y.L., Hsu, C.M., & et al. (2007). Association of p53 and p21(CDKN1A/WAF1/CIP1) polymorphisms with oral cancer in Taiwan patients. *Anticancer Res*. May-Jun;27(3B):1559-1564 (in English).

Стаття надійшла в редакцію 16 березня 2017 року