

УДК 616.314-001.4 -084-08

І.М. Ткаченко

ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СХИЛЬНОСТІ ПАЦІЄНТІВ ДО НАДМІРНОЇ СТЕРТОСТІ ТВЕРДИХ ТКАНИН ЗУБІВ

Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

За результатами сучасних клініко-епідеміологічних досліджень як вітчизняних, так і закордонних науковців, надмірна стертість зубів є патологією, поширеність якої становить від 8 до 30% у пацієнтів різних вікових груп [1], наближаючись до показників поширеності карієсу. При цьому патологічний процес характеризується злоякісним перебігом і підвищенням інтенсивності ураження, що за відсутності своєчасного адекватного лікування призводить до суттєвих розладів у зубощелепному апараті, які проявляються не тільки естетичними, а й функціональними порушеннями. Ми вважаємо, зниження рівня захворюваності на підвищене стирання зубів можна досягти за рахунок адекватної лікарської допомоги, спрямованої на раннє виявлення патології, а також призначення адекватних формі захворювання методів профілактики і лікування.

Імовірним шляхом розв'язання проблеми покращення ефективності діагностики і лікування надмірної стертість зубів ми вважаємо поглиблене вивчення механізмів виникнення і розвитку захворювання в контексті його клінічних проявів і попереднього виявлення кореляційних зв'язків між клінічними і лабораторними показниками.

Згідно з Міжнародною класифікацією стоматологічних хвороб (МКХ-С), яка розроблена на базі МКХ-10, патологічні стани твердих тканин зубів підрозділяють на 2 великі групи: «Порушення розвитку і прорізування зубів» (клас - К 00) і «Хвороби твердих тканин зубів» (клас - К 03), які своєю чергою входять до розділу «Хвороби органів травлення» в підрозділ «Хвороби порожнини рота, слинних залоз та щелеп» [2].

Патологія, яка нас цікавить, має кілька форм. Наше дослідження стосується надмірної стертість зубів (К 03.0), яка характеризується зменшенням товщини твердих тканин зубів унаслідок впливу механічних сил зубів протилежної щелепи або зубів, які контактують між собою проксимальними боками. У зв'язку з цим патологія підрозділяється на надмірну стертість проксимальну й оклюзійну. Ця патологія розглядається як поліетіологічний прогресуючий процес без можливості регенерації, який супроводжується цілою низкою морфологічних, естетичних та функціональних порушень, здатний значно знижувати якість життя хворих [3].

У вітчизняній літературі відсутні відомості

щодо дослідження питання про те, що морфологія зубів переважно зумовлена спадковими факторами, а процес дентиногенезу регулюється багатьма генами. На нашу думку, саме дефекти генетичної ланки при закладці епітеліального органа можуть бути головними чинниками, які зумовлюють генетичну схильність пацієнтів до надмірної стертість. Порушення білкової компоненти надалі призводить до зміни в укладці мінералів кристалічної решітки, а отже, до зміни або порушення структури емалевих призм. Саме цей процес ми вважаємо головним етіологічним фактором виникнення надмірної стертість.

Після закінчення морфогенезу тверді тканини зуба протягом усього життя не оновлюються, біоценоз їхнього внутрішнього середовища підтримується за рахунок пульпи зуба, клітинного цементу, періодонтальних волокон і слини. Тому надмірна стертість зубів може бути проявом порушення закладки насамперед емалі, що можливе внаслідок генних мутацій саме на етапах первинної мінералізації.

У матриці емалі зубів, які розвиваються, виділяються два типи протеаз: на початку - протеаза енамелізин (MMP-20), наприкінці формування емалі - протеаза калікреїн-4 (KLK4). Мутації в MMP20 і KLK4, які є причиною аутосомно-рецесивного недосконалого амелогенезу, призводять до клінічної презентації м'якої (за фізичними характеристиками), пористої емалі, яка не здатна витримувати функціональні навантаження за рахунок умісту залишкової кількості білка.

MMP-20 проявляється разом з емаллю білків секреторної стадії амелобластів. В емалі продукти розщеплення білків накопичуються в просторі між кристалами гідроксилапатиту, допомагаючи підтримувати їх. MMP-20 пошарово розщеплює накопичені білки емалі, тому їхня концентрація знижується з глибиною. Енамелізин (MMP-20) - це основний фермент емалевої матриці. Його концентрація і прояв ініціюється перед початком мінералізації дентину і триває протягом секреторної стадії амелогенезу. Таким чином, діяльність цього ферменту має вирішальне значення для правильного формування емалі. Його наявність помітна тільки на стадії первинної мінералізації в межах поверхневих шарів емалі, а продукти розщеплення зосереджені в центральній та білядентинній частинах емалі. Емалеві білки накопичуються протягом секреторної стадії, але зникають на початку дозрівання.

KLK4 виділяється на перехідних і завершальній стадіях дозрівання амелобластів. KLK4 агресивно впливає на органічну матрицю після припинення секреції емалевих білків і вважається переважним ферментом деструкції, який очищає емаль білків із матриці під час дозрівання. KLK4 концентрується на поверхні емалі, коли матриця емалі зникає, і знищує амелогенін. Під час розвитку зубів протеїнази, що виділяються в міжклітинний простір, розщеплюють білки емалі та каталізують гідроліз пептидних зв'язків [8-12].

Для нашого дослідження були визначені 2 типи протеїназ, що безпосередньо беруть участь в утворенні емалі: енамелізин (MMP20) і калікреїн 4 (KLK4) [4,5].

Метою нашого дослідження стало визначення поліморфізму генів калікреїну і матричної металопротеїнази-20 у пацієнтів із надмірною стертістю зубів.

Матеріали і методи дослідження.

Ми спостерігали за 170 пацієнтами контрольної та дослідних груп, із яких пацієнти контрольної групи не мали проявів надмірної стертості зубів і мали інтактні зубні ряди, а пацієнти дослідних груп мали I - III ступінь стертості зубів (за класифікацією надмірної стертості А.Н. Бушан). Із усього загалу пацієнтів із надмірною стертістю I-III ступеня методом вибіркової сукупності обрали 72 осіб для дослідження щодо виявлення наявності поліморфізмів генів: чоловіків - 30, жінок - 42. Вік пацієнтів - від 20 до 62 років. Дослідження проводили з наданої письмової згоди пацієнтів на проведення обстеження та за ухвалою комісії з етичних питань та біоетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія».

Для проведення дослідження на виявлення поліморфізму генів у пацієнтів, які брали участь у дослідженні, брали кров із пальця. Отримані результати переправляли в науково-дослідну лабораторію для досліджень.

У дослідженні для визначення поліморфізму генів калікреїну-4 в екзоні g.2142 G>A AF228497 (KLK4) і матричної металопротеїнази-20 (MMP-20) у 5 екзоні g.16250 T>A NT033899.6 проводили виділення геномної ДНК за допомогою набору «ДНК-експрес» (ООО НПФ «Литех», Росія).

Мутантні та «дикі» типи алелів генів KLK4 і MMP-20 ампліфікували за допомогою алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції в 35 мкл реакційної суміші, що містила: 2,5 мкл 10 x Буф для ампліфікації; 2 мМ хлориду магнію; 0,2 мМ кожного dNTP; 2,5 од. ДНК-полімерази Tag із до-

даванням по 5 пкмоль специфічних праймерів та по 5 пкмоль специфічних проб, мічених флуоресцентними барвниками FAM і R6G з 5'-кінця і BHQ-1, BHQ-2 з 3'-кінця, відповідно. До суміші додавали 20-50 нг геномної ДНК обстежуваних. Ампліфікацію генів KLK4 і MMP-20 проводили на детектувальному ампліфікаторі ДТ-322 (ООО «НПО ДНК-Технологія», Росія) в режимі реального часу таким чином:

- перший цикл - 95°C/3 хвилини;
- 40 циклів - 95°C/15 секунд;
- 63°C/40 секунд.

Продукти ампліфікації генів KLK4 і MMP-20 ідентифікували за допомогою флуоресцентної реєстрації накопичення ДНК за каналами флуоресценції: 1 канал – барвник FAM; 2 – канал барвник R6G, безпосередньо в ході реакції.

Математичну обробку отриманих даних проводили за допомогою стандартного методу варіаційного аналізу на персональному комп'ютері IBM PC Pentium IV. Отримані в процесі обстеження пацієнтів кількісні показники обробляли методами математичної статистики з розрахунком середніх вибірових значень (M) та помилки середніх значень (m) у групах обстежених осіб. Результати дослідження аналізували з використанням програм "Microsoft Excel 2003", "Statistica for Windows. Version 5.0", "NCSS 2004" та "SPSS for Windows. Release 13.0". Вірогідність відмінностей отриманих результатів для різних груп визначали за допомогою t-критерію надійності Ст'юдента. Відмінності вважали вірогідними при загальноприйнятій у медико-біологічних дослідженнях імовірності помилки $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення.

За ступенем тяжкості захворювання в пацієнтів виявлено: I ступінь тяжкості у 27 пацієнтів, що становить 30,8%; II ступінь тяжкості виявлено в 39 пацієнтів (54,2%), III ступінь – в 6 осіб (8,3%). Для контролю виділили 10 пацієнтів без наявних ознак надмірної стертості, що становило 7,2%. Вік пацієнтів - від 20 до 55 років.

У ході дослідження проводили виділення мутантних (A) і «диких» (G) типів алелів генів KLK4 та MMP-20 ампліфікували за допомогою алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції. Щодо виділених алелів отримали генотипи з різними типами проявів мутацій: GG, GA та AA відповідно з домінантним і рецесивним репрезентуванням.

Дані, отримані нами в дослідженні, представлено в таблицях 1 і 2.

Таблиця 1
Розподіл частот генотипів поліморфізму g.2142 G>A гена KLK у групі пацієнтів із патологічною стертістю зубів

Ступінь стертості	Генотипи			p		
	GG, %(n)	GA, %(n)	AA, %(n)	(I-II)	(II-III)	(I-III)
I (n=27)	85,2 (23)	14,8 (4)	0 (0)	0,328	0,163	0,031
II (n=39)	74,8 (28)	23,0 (9)	5,2 (2)			
III (n=6)	33,3 (2)	50,0 (3)	16,7 (1)			

p – порівняння між генотипами GG і GA+AA.

Таблиця 2

Розподіл частот алелів поліморфізму *g.2142 G>A* гена *KLK* у групі пацієнтів із патологічною стертістю зубів

Ступінь стертості	Алелі		p		
	G, %(n)	A, %(n)	(I-II)	(II-III)	(I-III)
I (n=27)	92,6 (50/54)	7,4 (4/54)	0,195	0,103	0,008
II (n=39)	83,3 (65/78)	16,7 (13/78)			
III (n=6)	58,3 (7/12)	41,7 (5/12)			

p_1 – порівняння між алелями G і A.

У пацієнтів із II ступенем генотип GG зустрічався з частотою 74,8% (n=28), генотипи GA та AA - з частотою 23,0% (n=9) і 5,2% (n=2) відповідно.

У 6 пацієнтів із III ступенем надмірної стертості зубів частота генотипів гена *KLK-4* була такою: GG – 33,3% (n=2), GA - 50% (n=2), AA – 16,7% (n=2).

Наведені дані доводять, що в групі з I ступенем надмірної стертості зубів превалюють пацієнти з «диким типом» генотипу GG, а в групі з III ступенем – пацієнти з генотипами GA та AA. Отже, між частотами генотипів GG і генотипів GA та AA гена *KLK-4* даних груп була виявлена різниця на рівні статистичної значущості ($\chi^2=4,64$; $p=0,031$).

При дослідженні гена *MMP-20* алель G у групах пацієнтів із I та II ступенем підвищеної стертості зубів зустрічався з частотою 92,6% та 83,3% відповідно, а алель A – 7,4% і 16,7% відповідно, що не мало статистично значущої відмінності.

У групі пацієнтів із III ступенем надмірної стертості зубів алель A зустрічався достовірно частіше в порівнянні з групою пацієнтів із I ступенем надмірної стертості зубів ($\chi^2=4,64$; $VШ=8,93$; ДІ (95%)=1,92-41,41; $p=0,008$). Отже, тяжкість прояву надмірної стертості в групах дослідження корелює з генотипами GG і GA.

Аналізуючи таблицю, можна помітити, що в усієї когорти досліджуваних пацієнтів (n=72) генотип GG зустрічається з частотою 73,6% (53 особи), генотип GA – у 22,2% обстежених (16 пацієнтів), яких можна вважати групою ризику. AA становить 4,2% (3 пацієнти) і повністю складає мутантний генотип. Саме ці пацієнти мають III, найтяжчий прояв надмірної стертості зубів. Отже, між частотами генотипів із I і II ступенем тяжкості статистично достовірної різниці не виявлено - як по фенотипах GG, так і GA+AA. Не виявлено також достовірної різниці між пацієнтами II і III груп по фенотипах GG і GA+AA. Але по розподілу частот генотипів поліморфізмів по фенотипах GG і GA+AA між групою пацієнтів із відсутністю стертості емалі, I ступенем та пацієнтів із III ступенем стертості встановлено достовірні показники, $p<0,05$.

Аналізуючи алелі, можна помітити, що G алель

наявний у 84,7% пацієнтів, мутантний A алель - у 15,3%.

За результатами проведених досліджень не встановлено достовірної різниці генотипів при виникненні надмірної стертості I і II ступенів тяжкості, що можна пояснити різними етіологічними факторами, на які вказують більшість авторів у дослідженнях виникнення надмірної стертості зубів: це й особливості місцевості, де народився та проживає пацієнт із надмірною стертістю, умови життя та праці, наявність загальносоматичних хвороб, порушення процесів мінерального обміну речовин, підвищене функціональне навантаження, хвороби ендокринної та шлунково-кишкової систем, порушення функції статевих гормонів, патології прикусу, зменшення кількості антагонуючих зубів, хронічна травма зубів, пов'язана зі шкідливими звичками, чи професійна травма, гіпертонус жувальних м'язів центрального походження, професійні чинники (вібрація, фізичне напруження). Тому досі було неможливо встановити сильний кореляційний зв'язок між прогресуючою втратою твердих тканин зубів і будь-яким одним ендо - чи екзогенним фактором.

Прямі, середньої сили зв'язки з низкою чинників указують на поліетіологічність патологічного стирання твердих тканин зубів. При цьому місцеві чинники, як фізіологічні, так і патологічні, в ролі абразивного фактора, діючи на ерозійну поверхню зубів, унаслідок розладів у окремих системах організму здатні призвести до надмірної втрати твердих тканин.

При достатньо вираженій втраті тканин зубів (III ступінь) встановлена пряма залежність ($p<0,005$) надмірної стертості від превалювання мутантного генотипу, що на пряму пов'язане з генетичною схильністю пацієнтів до надмірної стертості.

Ця особливість розподілу генотипів співвідноситься з даними щодо європейців та інших рас, отриманими закордонними вченими (рис.1) [6-10].

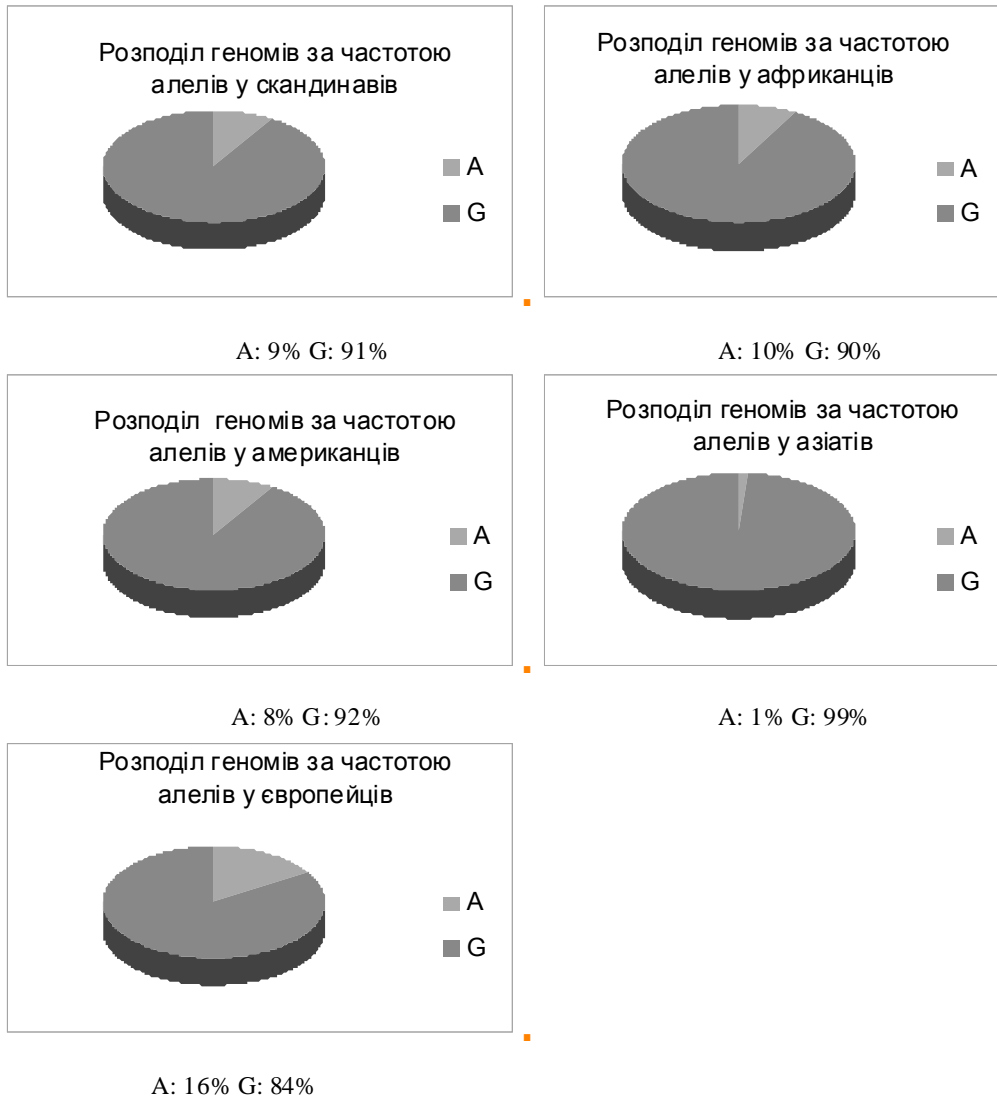


Рис. 1. Розподіл генотипів за частотою алелів у представників різних рас

За розподілом частот генотипів GG і GA+AA та алелів G та A між групою пацієнтів із I ступенем та пацієнтів із III ступенем надмірної стертості зубів встановлено вірогідні відмінності при $p < 0,05$. Саме в носіїв алеля A поліморфізму g.2142 G>A гена KLK-4 спостерігаються тяжчі прояви надмірної стертості зубів.

Отже, важливим ланцюгом патогенезу надмірної стертості є порушення процесів, які відбуваються на етапах закладки емалі та пов'язані з генетичними особливостями функціонування протеїназ, що відповідають за білкову матрицю і подальшу укладку мінеральної компоненти, тобто структура емалі має генетичну зумовленість будови, яка призводить у певних умовах, наведених вище, до її надмірного стирання. Чим більша кількість додаткових чинників до основної компоненти, тим активніше і з більшою часткою ускладнень розвивається досліджувана патологія.

Підкреслимо, що виявлення мутантних алелів дає можливість навіть на етапах передхвороби цілеспрямовано проводити профілактику і лікування пацієнтів із надмірною стертістю.

Література

1. Каламкаров Х.А. Ортопедическое лечение патологической стираемости твердых тканей зубов / Х.А. Каламкаров. - М.: Медицинское информационное агентство, 2004. - 176 с.
2. Международная классификация стоматологических болезней на основе МКБ 10 // ВОЗ. - Женева, 1997. - 81с. Методы и программы профилактики основных стоматологических заболеваний // ВОЗ. - Женева, 1989. - 47с.
3. Мустагаева М.Т. Обоснование общих принципов стандартизации; клинических вариантов диагностики и лечения заболеваний в стоматологии / М.Т. Мустагаева, О.М. Мирзабеков, Т.К. Сужеев // Проблемы стоматологии. - 2001. - №3(13).
4. Koussoulakou D.S. A Curriculum Vitae of Teeth: Evolution, Generation, Regeneration / Koussoulakou D.S., Margaritis L.H., Koussoulakos S.L. // Int. J. Biol. Sci.- 2009. - Vol.5, N 3. - P. 226-243.
5. The genetic basis of inherited anomalies of the teeth. Part 2: syndromes with significant dental involvement / I. Bailleul-Forestier, A. Berdal, F. Vinckier [et al.] // Eur. J. Med. Genet. - 2008. - Vol.51, N 5. - P.383-408.

6. Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta / Hart P.S., Hart T.C., Michalec M.D. [et al.] // J. Med. Genet. – 2004.- Vol.41.- P. 545–549. [PMC free article][PubMed].
7. Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein KLK) locus on proximal 19q13.4 // Harvey T.J., Hooper J.D., Myers S.A. [et al.] // J. Biol. Chem. – 2000.- Vol.275.- P.37397–37406. [PubMed].
8. Enamelysin and kallikrein-4 mRNA expression in developing mouse molars // Hu J.C., Sun X., Zhang C. [et al.] // Eur. J. Oral Sci. – 2002.- Vol.110.- P.307–315. [PubMed].
9. Hypomaturation Enamel Defects in Klk4 Knock-out/LacZ Knockin Mice /James P. Simmer, Yuanyuan Hu, Rangsiyakorn Lertlam [et al.] // J. Biol. Chem. – 2009, July 10.- Vol.284(28).- P. 19110–19121.
10. Processing of ameloblastin by MMP-20 / Iwata T., Yamakoshi Y., Hu J.C. [et al.] // J. Dent. Res. – 2007.- Vol.86.- P.153–157. [PubMed].

**Стаття надійшла
18.03.2015 р.**

Резюме

Определение полиморфизма генов калликреина и матричной металлопротеиназы-20 у пациентов с чрезмерной стертостью зубов позволило выявить предрасположенность пациентов к чрезмерной стираемости даже на этапах отсутствия проявлений заболевания.

Ключевые слова: минерализация эмали, чрезмерная стираемость зубов, полиморфизм, матричные металлопротеазы, мутации в MMP-20 и KLK-4.

Резюме

Визначення поліморфізму генів калікреїну і матричної металопротеїнази-20 у пацієнтів із надмірною стертістю зубів дозволило виявити схильність пацієнтів до надмірної стертості навіть на етапах відсутності проявів захворювання.

Ключові слова: мінералізація емалі, надмірна стертість зубів, поліморфізм, матричні металопротеїнази, мутації в MMP-20 і KLK-4.

UDC 616.314-001.4 -084-08

DEFINITION OF PATIENTS GENETIC PREDISPOSITION TO INCREASED WEAR OF DENTAL HARD TISSUES

I.M. Tkachenko

Higher State Educational Establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy"

Summary

In literature the information about research issues that the morphology of the teeth mainly caused by hereditary factors and the process of dentinogenesis regulated by many genes is not found. In our view, the genetic defect level in laying the epithelial authority may be the main factors that determine genetic susceptibility of patients to high abrasion. Violation of the protein components further leads to a change in the conclusion mineral crystal lattice and thus to change or violation of the structure of enamel prisms. It is process we believe the main etiological factor of high abrasion. After the morphogenesis of dental hard tissue throughout life not updated their biocenose internal environment is maintained by the dental pulp, cellular cement, periodontal fibers and saliva. In the matrix of tooth enamel developing there are two types of proteases. Early enamelzlyn protease (MMP-20), at the end of enamel formation protease kallikrein 4 (KLK4). Mutations in MMP20 and KLK4 which cause autosomal recessive imperfect of amelogenesis lead to clinical presentation of soft (for physical characteristics) porous enamel which is unable to withstand functional stress due to trace amounts of protein content.

There was a monitoring of 170 patients under the supervision at experimental groups, of which those of the control group had no manifestations of increased abrasion of teeth and tooth rows were intact, and study groups, patients had a degree of wear of the teeth and in the third degree (according to the classification AN relatively Bushan high abrasion). Of all patients with high weariness and third-degree method chosen sample of 72 men for the study to detect the presence of polymorphisms of genes: 30 men, 42 women.

The mutant selection (A) and "wild" (G) allele types KLK4 genes and MMP-20 was amplified using allele-specific polymerase chain reaction. Regarding alleles were selected genotypes with different types of displays mutations: GG, GA and AA in accordance with the dominant and recessive representation. Patients with genotype GG degree II met with a frequency of 74,8% (n = 28), GA and AA genotypes - with a frequency of 23,0% (n = 9) and 5,2% (n = 2), respectively. In 6 patients with III degree of abrasion of teeth increased frequency of genotypes KLK-4 gene was as follows: GG - 33,3% (n = 2), GA - 50% (n = 2) AA - 16,7% (n = 2). These data show that in the group with stage I high abrasion of teeth prevalent patients with "wild-type" genotype GG, and a group of III degree - patients with genotypes AA and GA. So, between the frequencies of genotypes GG and GA genotypes AA and gene KLK-4 data groups difference was found at the level of statistical significance ($\chi^2 = 4,64$; $p = 0.031$).

In the study of gene MMP-20 G allele in patients with I and II degree of increased wear of the teeth met with

a frequency of 92.6% and 83.3%, respectively, and allele A - 7.4% and 16.7%, respectively, which are not had a statistically significant difference.

The results of the studies found no significant difference genotypes in the event of increased abrasion and second degrees of severity, which can be explained by various etiological factors noted by many authors in the study of the emergence of increased wear of teeth: this is where the terrain was born and lives of patients at increased weariness, living and working conditions, the presence of somatic diseases.

Key words: enamel mineralization, increased wear of the teeth, polymorphism, matrix metalloprotease, mutations in MMP20 and KLK4.