

УДК: [616.248+616.516.5+616.211-002-056.3]-053.2.-06:616.311.2-002-07:57.088.7

*Л.С.Кривенко*Харківський національний медичний  
університетДОСВІД ГЕНОТИПУВАННЯ ДІТЕЙ  
МЕШКАНЦІВ ХАРКІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ З  
ПРОЯВАМИ ГІНГІВІТУ НА ТЛІ  
АТОПІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ЗА SNP  
RS1801270**Ключові слова:** хвороби пародонту,  
генотипування, поліморфізм, діти.**Резюме.** Метою даного дослідження - проведення генотипування дітей мешканців Харківської області з проявами гінгівіту на тлі atopічних захворювань за SNP rs1801270 C>A в кодоні 31 гена P21 (CDKN1A). У ході дослідження прогенотиповано 48 осіб за поліморфізмом rs1801270. Розраховані частоти генотипів та алелів за даним поліморфізмом загалом та в контрольній та основній (з діагнозом гінгівіт на тлі atopічних захворювань) групах окремо. Частота алелю C становила в середньому 0,76, частота алелю A - 0,24, що відповідає частотам алелів за цим поліморфізмом, які розраховані за даними різних світових досліджень, але відрізняються від частот алелів, встановлених для європейських популяцій (за рахунок підвищеної частоти алелю A). Установлено, що в основній групі частоти генотипів відхиляються від очікуваних за законом Харді-Вайнберга. Також спостерігається тенденція до різного формування імунної відповіді у пацієнтів основної групи з різними генотипами за rs1801270 поліморфізмом, зокрема гомозиготи AA з atopічними захворюваннями тяжіють до більш агресивного протікання гінгівіту.**Вступ**

Хвороби пародонта (гінгівіт, пародонтит) - це запальні процеси, що зумовлені розвитком пародонтопатогенної мікрофлори, накопиченням екзотоксинів на тлі зниження імунологічної реактивності організму [1]. Одним із сучасних підходів до розв'язання подібних завдань є пошук генетичних маркерів, наприклад, одонуклеотидних поліморфізмів, асоційованих з певними мультифакторними захворюваннями у конкретних популяціях.

**Мета дослідження**

Провести генотипування дітей мешканців Харківської області з проявами гінгівіту на тлі atopічних захворювань за SNP rs1801270 C>A в кодоні 31 гена P21 (CDKN1A).

**Матеріал і методи**

Вибірка. Дане дослідження виконане на базі Харківської обласної дитячої лікарні №1. Усього обстежено 48 дітей віком від 6 до 18, з яких 36 осіб увійшли до основної групи (встановлено діагноз "гінгівіт" на тлі бронхіальної астми, алергічного риніту та/або atopічного дерматиту) та 12 осіб - до контрольної групи (не мають даних діагнозів). Усі обстежені та їх батьки були проінформовані щодо мети даного дослідження та мето-

дик, що будуть застосовуватись, та надали добровільну письмову згоду на участь.

Діагноз "гінгівіт" встановлений за допомогою об'єктивних основних та допоміжних методів дослідження за протоколом обстеження дітей з захворюваннями пародонту. Для реєстрації змін у тканинах пародонту 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 проведений аналіз рівнів секреторного імуноглобуліну A (sIg A, нг/мл), сироваткового імуноглобуліну A (Ig A, г/л) та імуноглобуліну G (Ig G, г/л). Використовували імуноферментний аналізатор "Лаблайн-90" та комерційні набори "Вектор-Бест" (Росія). Аналіз проводили за доданою 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 [2].

Пробопідготовка. Для проведення генотипування з клітин букального епітелію виділяли ДНК за допомогою комерційного набору Diatom™ DNA Prep 100 (Росія) відповідно до інструкції ви-

робника.

Типування rs1801270 C>A поліморфізму в кодоні 31 гена P21 (CDKN1A) проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним 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" (Росія) та комерційні набори реагентів GenPak™ PCR Core (0,5 мл) (Росія) відповідно до інструкцій виробників. Умови ПЛР: денатурація протягом 5 хв. при 94°C; 35 циклів, що складаються з денатурації протягом 20 с при 94°C, відпал праймерів протягом 20 с при 58°C, елонгація протягом 20 с при 72°C; остаточно елонгація протягом 10 хв при 72°C [3]. Перед проведенням ПДРФ аналізу всі зразки перевіряли на наявність ампліфікованого фрагмента (272 п.н.). Детекцію результатів ПЛР проводили шляхом розділення 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 проводили шляхом обробки гелю етидієм бромідом та подальшим аналізом на тансілюмінаторі в ультрафіолетовому світлі. Розміри фрагментів визначали у порівнянні з маркером молекулярної маси pUC19 DNA/Mspl (HpaII) Marker, 23 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Продукти ампліфікації піддавали рестрикції ферментом Bpu1102I (B1pI) (Thermo Fisher Scientific Inc.). Реакцію проводили відповідно до інструкції виробника. Детекцію результатів рестрикції проводили шляхом розділення продуктів у 2 % агарозному гелі при постійній напрузі 70 В протягом 1 години. Наявність сайту рестрикції (2 продукти рестрикції: 183 п.н. + 89 п.н.) засвідчила про С алель у третій позиції кодону 31 гена P21 (Ser у 31 позиції поліпептидного ланцюга). Відсутність сайту рестрикції (один фрагмент 272 п.н.), відповідно, про А алель (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) характеризувались наявністю одного фрагмента розміром 272 п.н.; гетерозиготи СА (Ser/Arg) характеризувались 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 Красскелла-Уолліса.

Порівняння вибірових часток проводили за допомогою F-критерію. Порівняння теоретично очікуваних та фактичних частот генотипів здійснювали за допомогою критерію  $\chi^2$ . Розрахунки здійснювали за допомогою програмного забезпечення Statistica 8.0.

### Результати та їх обговорення

За результатами ПДРФ аналізу прогенотиповано 48 осіб за поліморфізмом rs1801270. Установлено гомозиготність за алелем С в 31 особи, гетерозиготність - в 11 осіб та гомозиготність за алелем А - в 6 осіб. Розраховані частоти генотипів та алелів за даним поліморфізмом (Табл.).

Слід зазначити, що частоти алелів досліджуваного поліморфізму як за вибіркою в цілому, так і у межах контрольної та основної груп не відрізняються. Вони також можуть бути зіставлені з частотами алелів за цим поліморфізмом, що були розраховані за даними різних досліджень [4]. Окремо слід зазначити, що отримані нами частоти алелів відрізняються від аналогічних, розрахованих для європейських популяцій [4], та характеризуються підвищеною частотою мутантного алелю (А). Саме це, імовірно, є причиною відхилення досліджуваної вибірки від стану рівноваги.

Аналіз частот генотипів та алелів у контрольній та основній групах окремо показав, що розподіл у контрольній групі відповідає теоретично очікуваному за законом Харді-Вайнберга, а у основній - відхиляється від нього. Спостерігаємо збільшення кількості гомозигот за алелем А у основній групі. Але порівняння вибірових часток гомозигот АА показало, що ці зміни є тенденційними ( $F=1,74$ ;  $p>0,05$ ), імовірно, внаслідок невеликої чисельності порівнюваних груп.

На наступному етапі дослідження в основній групі більш детально аналізували показники, що характеризують стан імунної відповіді та ступінь розвитку гінгівіту залежно від генотипу та носійства того чи іншого алелю в третій позиції кодону 31 гена P21. Установлено, що всі пацієнти основної групи характеризувались підвищеним (порівняно із віковим специфічними фізіологічними нормами) рівнем секреторного імуноглобуліну А (Рис.), що підтверджує наявність дисбалансу у місцевому захисті слизових оболонок, напруженості місцевого імунітету та формування компенсаторних реакцій. Однак особи, різні за генотипом, стосовно поліморфізму rs1801270 за даним показником не відрізнялись. Тим не менш, слід відзначити, що гомозиготи за С алелем (Ser/Ser) демонструють найменшу варіабельність за даним показником (Рис. 1); для гетерозигот характерна тенденція до більш низьких значень показника, а

Таблиця

## Частоти генотипів та алелів за поліморфізмом rs1801270 у досліджуваній вибірці

	Частоти генотипів (%)			Частоти алелів		$\chi^2$
	CC	CA	AA	C	A	
Загалом за всією вибіркою						
Фактичні (n=48)	64,58 (n=31)	22,92 (n=11)	12,5 (n=6)	0,76	0,24	6,46
Теоретично очікувані для панміктичної популяції	57,71 (n=27,7)	36,47 (n=17,5)	5,83 (n=2,8)			
Тільки контрольна група						
Фактичні (n=12)	58,34 (n=7)	33,33 (n=4)	8,33 (n=1)	0,755	0,245	0,399
Теоретично очікувані для панміктичної популяції	56,25 (n=6,75)	37,50 (n=4,5)	6,25 (n=0,75)			
Тільки основна група						
Фактичні (n=36)	66,67 (n=24)	19,44 (n=7)	13,89 (n=5)	0,764	0,236	7,636

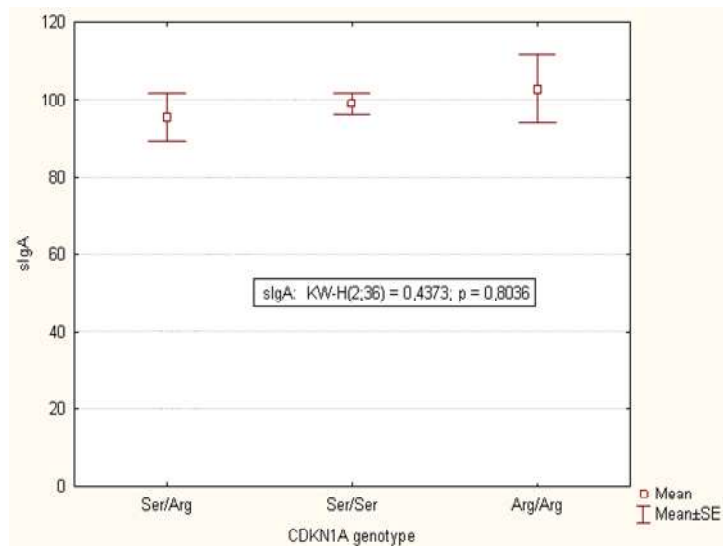


Рис. Характеристика пацієнтів основної групи за рівнем секреторного імуноглобуліну А залежно від генотипу за rs1801270 поліморфізмом

в гомозигот за алелем А спостерігається тенденція до більших значень показника. Отже, доцільним є продовження генотипування хворих на atopічні захворювання, ускладненими гінгівітом, за поліморфізмом rs1801270, щоб з'ясувати, чи АА гомозиготність може бути маркером більш агресивного протікання в них запальних процесів. Отримані дані корелюють з даними інших дослідників, які виявили, що збільшення рівня sIgA є маркером розвитку адаптивної імунної відповіді на стрес та зміну зовнішніх умов [5].

## Висновки

У ході дослідження прогенотиповано 48 осіб за поліморфізмом rs1801270. Розраховані частоти генотипів та алелів за даним поліморфізмом загалом та в контрольній та основній (з діагнозом гінгівіт на тлі atopічних захворювань) групах ок-

ремо. Частота алелю С становила в середньому 0,76, частота алелю А - 0,24, що відповідає частотам алелів за цим поліморфізмом, які розраховані за даними різних світових досліджень, але відрізняються від частот алелів, встановлених для європейських популяцій (за рахунок підвищеної частоти алелю А). Встановлено, що у основній групі частоти генотипів відхиляються від очікуваних за законом Харді-Вайнберга. Також спостерігається тенденція до різного формування імунної відповіді у пацієнтів основної групи з різними генотипами за rs1801270 поліморфізмом, зокрема гомозиготи АА з atopічними захворюваннями тяжіють до більш агресивного протікання гінгівіту.

## Перспективи подальших досліджень

Вважаємо даний поліморфізм перспективним для подальшого аналізу асоціації з характером розвитку запальних процесів ясен у пацієнтів з астмою, алергічним ринітом чи атопічним дерматитом.

**Список літератури.** 1. *Gingival Diseases - Their Aetiology, Prevention and Treatment* / Edited by Fotinos S. Panagakos and Robin M. Davies / InTech. - 2011. - 246 p. 2. Claire Mulot, Isabelle Stucker, Jacqueline Clavel, Philippe Beaune, Marie-Anne Lorient Collection of Human Genomic DNA From Buccal Cells for Genetics Studies: Comparison Between Cytobrush, Mouthwash, and Treated Card // *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2005:3 (2005) 291-296. 3. Bau D. T., Tsai M. H., Lo Y. L., Hsu C. M., et al. Association of p53 and p21(CDKN1A/WAF1/CIP1) polymorphisms with oral cancer in Taiwan patients. // *Anticancer Res.* 2007 May-Jun;27(3B):1559-1564. 4. Bronwen L. Aken, Sarah Ayling, Daniel Barrell, Laura Clarke, et al. The Ensembl gene annotation system. Database 2016, baw093 doi: 10.1093/database/baw093 5. Секреторный иммуноглобулин А - маркер адаптации организма человека к внешним воздействиям / Г.В. Виха // *ЛАБОРАТОРИЯ № 3*, 2013

#### ОПЫТ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ДЕТЕЙ ЖИТЕЛЕЙ ХАРЬКОВСКОЙ ОБЛАСТИ С ПРОЯВЛЕНИЯМИ ГИНГИВИТА НА ФОНЕ АТОПИЧЕСКИМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ ПО SNP RS1801270

*Л. С. Кривенко*

**Резюме.** Целью данного исследования было проведение генотипирования детей жителей Харьковской области с проявлениями гингивита на фоне атопических заболеваний с SNP rs1801270 C> A в кодоне 31 гена P21 (CDKN1A). В ходе исследования прогенотиповано 48 человек за полиморфизмом rs1801270. Рассчитаны частоты генотипов и аллелей по данному полиморфизму в целом и в контрольной и основной (с диагнозом гингивит на фоне атопических заболеваний) группах отдельно. Частота аллеля С составила в среднем 0,76, частота аллеля А - 0,24, что соответствует частотам аллелей по этому полиморфизму, рассчитанным по данным различных мировых исследований, но отличаются от частот аллелей, установленных для европейских популяций (за счет повышенной частоты аллеля А). Установлено, что в основной группе частоты генотипов отклоняются от ожидаемых по закону Харди-Вайнберга. Также наблюдается тенденция к

разному формированию иммунного ответа у пациентов основной группы с разными генотипами по rs1801270 полиморфизму, в частности гомозиготы АА с атопическими заболеваниями тяготеют к более агрессивному протеканию гингивита.

**Ключевые слова:** болезни пародонта, генотипирование, полиморфизм, дети.

#### EXPERIENCE OF GENOTYPING CHILDREN IN THE KHARKIV OBLAST RESIDENTS WITH GINGIVITIS MANIFESTATIONS AGAINST A BACKGROUND OF ATOPIC DISEASES WITH SNP RS 1801270

*L.S. Kryvenko*

**Abstract.** The aim of this study was to conduct children's genotyping, the residents of Kharkiv region, with manifestations of gingivitis against a background of atopic diseases with SNP rs1801270 C> A in codon 31 of gene P21 (CDKN1A). In the study, 48 people were genotyped for polymorphism rs1801270. Frequency of genotypes and alleles for this polymorphism was calculated in general and in the control and basic (with gingivitis diagnosis against a background of atopic diseases) groups separately. The frequency of allele C constituted on average 0.76, the frequency of allele A - 0.24 corresponding to allele frequencies of this polymorphism, which were calculated according to various international studies, but different from the allele frequencies established for the European populations (due to high frequency of allele A). Genotype frequencies have been established to deviate from the expected ones according to Hardy-Weinberg law in the main group. There is also a tendency to the formation of different immune response in patients of the main group with different genotypes for rs1801270 polymorphism, in particular AA homozygotes with atopic diseases have propensity to the formation more aggressive gingivitis.

**Key words:** periodontal diseases, genotype, polymorphism, children.

**HSEE of Ukraine "Kharkiv national medical university",  
Kharkiv**

*Clin. and experim. pathol.* - 2017. - Vol.16, №2 (60), p.2.-P.33-36.

*Надійшла до редакції 20.04.2017*

*Рецензент – доц. Н.Б. Кузняк*

*© Л. С. Кривенко, 2017*