

© Ткаченко І.М., Шликова О.А., Кайдашев І.П.  
УДК 616.314-001.4 -084-08

## ВИЗНАЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ КАЛЕКРЕЙНУ-4 ТА МАТРИКСНОЇ МЕТАЛОПРОТЕІНАЗИ-20 У ПАЦІЄНТІВ З ПІДВИЩЕНОЮ СТЕРТІСТЮ ЗУБІВ

Ткаченко І.М., Шликова О.А., Кайдашев І.П.

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава.

*Еластин являється основним компонентом екстрацелюлярного матрикса (ЕЦМ) кожи. Любые структурные, наследственные или приобретенные дефекты и / или нарушения обмена веществ в ЭЦМ могут вызвать клеточные и тканевые изменения, приводящие к развитию или прогрессированию заболевания. С целью определения участия генетических факторов в процессе патологического рубцевания ран изучали полиморфизм g28197A>G в 20 экзоне гена эластина в группах больных, склонных к образованию патологических рубцов, расположенных в функционально активных зонах лица и шеи, и не склонных к образованию патологических рубцов. Обследовано 38 пациентов в возрасте от 18 до 65 лет, находившихся на стационарном и амбулаторном лечении после плановых хирургических вмешательств по поводу различных заболеваний, первичной хирургической обработки ран в разных топографо-анатомических областях головы и шеи. По анамнестическими данными и клиническими наблюдениями за процессом рубцевания ран больные были разделены на группы: больные с наличием патологических рубцов (основная группа (n = 18)), что чаще всего расположены в функционально активных зонах лица и шеи, и больные, не имеющие патологических рубцов (группа сравнения (n = 20)). Анализ аллельных частот показал, что аллель G достоверно чаще встречалась в группе больных, склонных к образованию патологических рубцов ( $\chi^2 = 5,19, p = 0,023$ ). Выявлено достоверную зависимость между наличием полиморфного аллеля G и повышенным риском образования патологических рубцов (ВШ = 3,58, 95% ДИ = 1,3-9,87, p = 0,023). Рассматривая полученные результаты возможно предположить, что наличие у больного дунными и клиническими факторами развития склонности к образованию патологических рубцов в процессе рубцевания ран.*

Ключові слова: мінералізація емалі, підвищена стертість зубів, поліморфізм, матриксні металопротеази, калекреїн.

Підвищена стертість зубів, за даними багатьох науковців, є патологією, поширеність якої складає від 8 до 30% у пацієнтів різних вікових груп [1-3].

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 [4.5].

В вітчизняній літературі не зустрічається відомостей, 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 органу можуть бути головними чинниками, які зумовлюють порушення структури зубів, що, в свою чергу, провокує розвиток підвищеного стирання зубів на тлі додаткових чинників.

По закінченню морфогенеза тверді тканини зуба на протязі всього життя не оновлюються, біоценоз їхнього внутрішнього середовища підтримується за рахунок пульпи зуба, клітинного цементу, періодонтальних волокон та слини. Тому підвищена стертість зубів може бути проявом порушення закладки насамперед емалі, що можливо в результаті генних мутацій, саме на етапах первинної мінералізації [6].

В матриці емалі зубів, що розвиваються виділяються два типи протеаз. На початку протеаза ена멜ізин (MMP-20), наприкінці формування емалі протеаза калекреїн 4 (KLK4). Мутації в MMP20 і KLK4, які є причиною аутосомно-рецесивного недосконалого амелогенезу, приводять до клінічної презентації м'якої (за фізичними характеристиками), пористої емалі, яка не в змозі витримувати функціональні навантаження за рахунок вмісту залишкові кількості біл-

ка. Під час розвитку зубів, протеїнази, що виділяються у міжклітинний простір, розщеплюють білки емалі, і каталізують гідроліз пептидних зв'язків [7-11].

Метою нашого дослідження стало визначення поліморфізму генів калекреїну 4 та матриксної металопротеїнази 20 у пацієнтів з підвищеною стертістю зубів.

### Матеріали і методи дослідження

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 - K 00) та «Хвороби твердих тканин зубів» (клас - K 03), які в свою чергу входять до розділу «Хвороби органів травлення» у підрозділ «Хвороби порожнини рота, слинних залоз та щелеп» [12,13]. Для визначення наявності поліморфізмів генів калекреїну 4 в 4 екзоні g.2142 G>A AF228497 (KLK4) та матриксної металопротеїнази - 20 (MMP-20) в 5 екзоні g.16250 T>A NT033899.6 із всієї кагорти обстежених пацієнтів (n=170), методом вибіркової сукупності, обрали 72 пацієнта зі стертістю зубів I-III ступеня: чоловіків 30, жінок 42. Вік пацієнтів складав від 20 до 62 років. Дослідження проводили з наданої письмової згоди пацієнтів на проведення обстеження та ухвали комісії з етичних питань та біоетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». Дослідження проведені на базі науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія».

Матеріалом для дослідження слугувала капілярна кров. Геномну ДНК виділяли за допомогою набору

«ДНК-експрес» згідно інструкції фірми виробника (ООО НПФ «Литех», Росія).

Мутантні та «дикі» типи алелей генів *KLK4* та *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 Таг з додаванням по 5 пкмоль специфічних праймерів та по 5 пкмоль специфічних проб мічених флуоресцентними барвниками FAM і R6G з 5'-кінця і ВНQ-1, ВНQ-2 з 3'-кінця, відповідно (табл.1).

Таблиця 1  
Послідовність специфічних праймерів та специфічних проб

Ген		Послідовність
<i>MMP-20</i> NT033899.6	Праймери	up 5'- GCTCTCTCATATTGTCTAGGTTT-3' low 5'-CTGATGGGTCTGTGGAATGGG-3'
	Проби	wt (FAM) CTGCTCATGAATTTGGCCAT-(ВНQ1) m (R6G) TGCTCAAGAATTTGGCCATG-(ВНQ2)
<i>KLK4</i> AF228497	Праймери	up 5'-ТТАCTTCGCAGTGCCCT-3' low 5'-GGCAGACACACACCCCGTGA-3'
	Проби	wt (FAM) CTGCTCATGAATTTGGCCAT-(ВНQ1) m (R6G) TGCTCAAGAATTTGGCCATG-(ВНQ2)

До суміші додавали 20-50 нг геномної ДНК обстежуваних. Ампліфікацію генів *KLK4* та *MMP-20* проводили на детектуючому ампліфікаторі ДТ-322 (ООО „НПО ДНК-Технология”, Росія) в режимі реального часу, наступним чином: перший цикл - 95°C/3 хвилини; 40 циклів - 95°C/15 секунд; - 63°C/40 секунд.

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

Математична обробка отриманих даних проводилась за допомогою стандартного методу варіаційного аналізу на персональному комп'ютері IBM PC Pentium IV. Аналіз результатів дослідження здійснювався з використанням програм “Microsoft Excel 2003”, “Statistica for Windows. Version 5.0”. Результати генетичних досліджень оброблені статистично з використанням критерію  $\chi^2$  з визначенням вірогідності точним методом Фішера. Відмінності вважали вірогідними при

загальноприйнятій у медико-біологічних дослідженнях імовірності помилки  $p < 0,05$ .

#### Результати досліджень та їх обговорення

Проведені дослідження показали, що з 72 обстежених пацієнтів з підвищеною стертістю зубів 27 осіб мали I ступінь тяжкості захворювання (37,5%), II ступінь тяжкості - 39 пацієнтів (54,2%), III ступінь тяжкості спостерігалась у 6 пацієнтів (8,3%).

При аналізі наявності поліморфізму гену матричної металопротеїнази 20 (*MMP-20*) в 5 екзоні g.16250 T>A гетерозиготний генотип ТА було виявлено лише у 1 пацієнта з усієї категорії досліджених, частота зустрічаємості - 1,4%, не виявлено пацієнтів з гомозиготним варіантом генотипу за мутантною алеллю.

Розподіл частот генотипів та алелей гену *KLK4* у пацієнтів з підвищеною стертістю зубів в залежності від тяжкості захворювання наведено в таблиці 2 та 3.

Таблиця 2  
Розподіл частот генотипів поліморфізму g.2142 G>A гену *KLK4* в залежності від ступеня тяжкості захворювання в групі пацієнтів з підвищеною стертістю зубів.

Ступінь тяжкості Стертості зубів	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	<b>0,031</b>
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 та GA+AA

Як видно з таблиці 2, при дослідженні поліморфізму g.2142 G>A гену *KLK4* у пацієнтів з I ступенем підвищеної стертості зубів частота «дикого типу» генотипу GG складала 85,2% (n=23), гетерозиготного генотипу GA - 14,8% (n=4), мутантний генотип AA – не виявлений. У пацієнтів з II ступенем генотип GG зустрічався з частотою 74,8% (n=28), генотипи GA та AA з частотою 23,0% (n=9) та 5,2% (n=2), відповідно. У 6 пацієнтів з III ступенем підвищеної стертості зубів ча-

стота генотипів гену *KLK4* була наступною: GG – 33,3% (n=2), GA - 50% (n=2), AA – 16,7% (n=2). Наведені дані доводять, що в групі з I ступенем підвищеної стертості зубів превалюють пацієнти з «диким типом» генотипу GG, а в групі з III ступенем – пацієнти з генотипами GA та AA. Тобто, між частотами генотипів GG та генотипів GA та AA гену *KLK4*, даних груп, була виявлена різниця на рівні статистичної значущості ( $\chi^2 = 4,64$ ;  $p = 0,031$ ).

Таблиця 3

Розподіл частот алелів поліморфізму g.2142 G>A гену *KLK4* в залежності від ступеня тяжкості захворювання в групі пацієнтів з підвищеною стертістю зубів.

Ступінь тяжкості стертості зубів	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 (3/78)			
III (n=6)	58,3 (7/12)	41,7 (5/12)			

p – порівняння між алелями G та A.

Алель G в групах пацієнтів з I та II ступенем підвищеної стертості зубів зустрічалась з частотою 92,6% та 83,3%, відповідно, а алель A – 7,4% та 16,7%, відповідно, що не мало статистично значущої відмінності. В групі пацієнтів з III ступенем підвищеної стертості зубів алель A зустрічалась достовірно частіше в порівнянні з групою пацієнтів з I ступенем підвищеної стертості зубів ( $\chi^2 = 4,64$ ; ВШ=8,93; ДІ(95%)=1,92-41,41; p=0,008) (табл.3).

Таким чином, між частотами генотипів груп пацієнтів з I та II ступенем тяжкості статистично вірогідної різниці не виявлено, при порівнянні генотипів GG та GA+AA гену *KLK4* [14,15]. Не виявлено також вірогідної різниці між пацієнтами II та III груп за даними генотипами. Але по розподілу частот генотипів GG та GA+AA та алелів G та A між групою пацієнтів з I ступенем та пацієнтів з III ступенем підвищеної стертості зубів встановлено вірогідні відмінності, при p<0,05. Саме у носіїв алелі A поліморфізму g.2142 G>A гену *KLK4* спостерігаються більш тяжкі прояви підвищеної стертості зубів.

З усієї когорти досліджених, незалежно від ступеня тяжкості підвищеної стертості зубів, в 98,6% зустрічається «дикий тип» генотипу гену *MMP-20* та лише у 1 пацієнта, саме з тяжким III ступенем підвищеної стертості зубів, спостерігається наявність мутантної алелі A поліморфізму g.16250 T>A гену *MMP-20*. Отримані дані співпадають з даними літератури про досить низьку частоту зустрічаємості даної мутації та її асоціації з деструктивними змінами тканин зубів [16].

До теперішнього часу неможливо встановити сильного кореляційного зв'язку між прогресуючою втратою твердих тканин зубів і будь-яким одним ендо - чи екзогенним фактором. Прямі, середньої сили зв'язки з низькою 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.

Таким чином, отримані нами дані підтверджують зв'язок між наявністю поліморфної алелі A гену *KLK4* з підвищеною стертістю зубів. Ці дані дозволяють розглядати даний поліморфізм в якості додаткового прогностичного показника надмірної втрати твердих тканин зубів.

Отже, виявлення мутантної алелі A гену *KLK4* дає змогу цілеспрямовано проводити профілактику та лікування пацієнтів з підвищеною стертістю зубів.

### Література

1. Каламкарров Х.А. Ортопедическое лечение патологической стираемости твердых тканей зубов / Х.А. Калам-

каров - М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 176 с.

2. Кобелева В.И. Распространенность некоторых некариозных поражений зубов у взрослого городского населения / В.И. Кобелева // Основные стоматологические заболевания. - М., 1981. - С.70-72.

3. Лебедева Г.К. Повышенное истирание зубов у людей старшей возрастной группы / Г.К. Лебедева, А.Н. Пак // Стоматология. -1991. - № 3. - С.13-15.

4. Баля Г. Н. Степень нарушения в жевательном аппарате при генерализованных формах патологического истирания зубов, осложненных дефектами зубных рядов / Г. Н. Баля // Украинский стоматологичний альманах. – 2006. – № 1. – С. 11–14.

5. Рубежова Н.В. Особенности клинического лечения и лечения больных с эрозиями, клиновидными дефектами и повышенной стираемостью зубов: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.21 / Н.В. Рубежова; Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования. – Санкт-Петербург, 2000. – 21с.

6. Ткаченко І.М. Структурні особливості емалі при підвищеній і фізіологічній стертіості зубів / І.М. Ткаченко // Український стоматологичний альманах. – 2011. - №6. – С.15-21.

7. 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.

8. Mouse models of tooth abnormalities / J. Fleischmannova, E. Matalova, A.S. Tucker , P.T. Sharpe // Eur J Oral Sci. - 2008. - Vol.116, N 1. - P.1-10.

9. Mostowska A. Molecular basis of non-syndromic tooth agenesis: mutations of MSX1 and PAX9 reflect their role in patterning human dentition / Mostowska A., Kobiela A., Trzeciak W.H. // Eur J Oral Sci. - 2003. - Vol. 111, N 5. - P.365-370.

10. 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.

11. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. / Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC, Bartlett JD, Simmer JP. // Biol Chem. 2008 Jun;389(6):695-700.

12. Международная классификация стоматологических болезней на основе МКБ 10 // ВОЗ. - Женева, 1997. - 81с. Методы, и программы профилактики основных стоматологических заболеваний // ВОЗ. - Женева, 1989. - 47с.

13. Мустатаева, М.Т. Обоснование общих принципов стандартизации; клинических вариантов диагностики и лечения заболеваний в стоматологии / М.Т. Мустатаева, О.М. Мирзабеков, Т.К. Сужеев и др. // Проблемы стоматологии. - 2001. - №3(13).

14. Expression, structure, and function of enamel proteinases. /Simmer JP, Hu JC.// Connect Tissue Res. 2002. – Vol. 43(2-3) - P.441-9.

15. Kallikrein-related peptidase 4, matrix metalloproteinase 20, and the maturation of murine and porcine enamel. / Hu Y, Hu JC, Smith CE, Bartlett JD, Simmer JP.// Eur J Oral Sci. 2011 Dec;119 Suppl 1:217-25. doi: 10.1111/j.1600-0722.2011.00859.

16. Ozdemir D. MMP20 Active-site Mutation in Hypomaturation Amelogenesis Imperfecta /, P.S. Hart, O.H. Ryu, S.J. Choi, M. Ozdemir-Karatas, E. Firatli, N. Piesco, and T.C. Hart //J Dent Res. – 2005. – Vol. 84, N11. – P. 1031–1035.

### Summary

GENE POLYMORPHISM KALEKREIN-4 AND MATRIX METALLOPROTEINASES-20 WAS ASSOCIATED WITH INCREASED WEAR OF THE TEETH

I.M. Tkachenko, O. A. Shlykova, I. P. Kaidashev

Key words: enamel mineralization, increased stertist teeth, polymorphism, matrix metalloproteinase, kalekrein.

Increased wear of the teeth, according to many scientists, is the pathology, the prevalence of which is 8 to 30% in patients of different age groups. This pathology is seen as polietologichesky progressing process, without the possibility of regeneration, which is accompanied by a number of morphological, aesthetic and functional disorders and is able to significantly reduce the quality of life of patients. Investigated the presence of polymorphisms of genes kallekreina 4 (KLK4) in exon 4 g.2142 G> A (AF228497) and matrix metalloproteinase - 20 (MMP-20) in exon 5 g.16250 T> A (NT033899.6) in 72 patients with abrasion teeth I-III degree: men 30, women 42. The patients' ages ranged from 20 to 62 years. Significant difference frequency distribution of genotypes GG and GA + AA and A and G alleles between the group of patients with Grade I and III patients with a high degree of abrasion of teeth ( $p < 0.05$ ). It is in the carriers of allele A polymorphism g.2142 G> A gene KLK4 observed more severe manifestations of increased abrasion of teeth. These data allow us to consider this polymorphism as an additional predictor of excessive loss of dental hard tissues.

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

*Матеріал надійшов до редакції 21.11.2012 р.*