

М.А. Гавриленко, О.М. Камишний

## Зміни експресії мРНК TLR II і IV типу, ядерного фактора κВ і прозапальних цитокінів ІЛ-1β і ІЛ-17А епітелію ротової порожнини в дітей з особливими потребами

Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, Україна

**Мета:** оцінити відносний рівень мРНК прозапальних цитокінів ІЛ-1β і ІЛ-17А, толл-подібних рецепторів II та IV типів і NF-κВ епітелію ротової порожнини в дітей з особливими потребами.

**Об'єкт і методи.** Проведено молекулярно-генетичне дослідження експресії толл-подібних рецепторів епітелію ротової порожнини 93-х дітей з особливими потребами та 25-ти здорових дітей віком від 12 до 18 років.

**Результати:** підвищення рівню експресії прозапальних цитокінів ІЛ-1β і ІЛ-17А у дітей із захворюваннями ЦНС у 8,9 і 7,7 разу ( $p < 0,05$ ) відповідно. У дітей із психічними захворюваннями рівень ІЛ-17А підвищився у 2,2 разу ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. Експресія ІЛ-1β підвищилась у 6,5 і 2,9 разу ( $p < 0,05$ ) відповідно, ІЛ-17А – у 3,8 і 3 рази ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем.

**Висновки.** Установлено, що в дітей з особливими потребами всіх груп суттєво збільшений відносний рівень мРНК прозапального цитокіну ІЛ-17А та NF-κВ в епітелії ротової порожнини.

**Ключові слова:** діти з особливими потребами, генералізований пародонтит, прозапальний цитокін, рецептори вродженого імунітету, ядерний фактор κВ, ІЛ-1β, ІЛ-17А.

Наукові дослідження останніх років підтверджують, що запальні процеси тканин пародонту тісно пов'язані із системними захворюваннями. Зокрема, групою ризику розвитку хронічних генералізованих пародонтитів є діти з особливими потребами, які мають важкі захворювання центральної нервової системи, органів дихання, захворювання крові та психічні розлади [1, 2]. Ці хвороби дітей знижують загальну імунологічну реактивність організму, призводять до порушення механізмів резистентності слизової оболонки порожнини рота, що сприяє прогресуванню запальних процесів у тканинах пародонту [1, 2, 3]. Тому для оцінки тяжкості системних запальних захворювань актуальним є проведення комплексного клінічного та імунологічного дослідження [2, 4].

**Мета** дослідження – оцінити відносний рівень мРНК прозапальних цитокінів ІЛ-1β і ІЛ-17А, толл-подібних рецепторів II та IV типів і NF-κВ епітелію ротової порожнини в дітей з особливими потребами.

### Матеріали та методи дослідження

Проведено молекулярно-генетичне дослідження експресії толл-подібних рецепторів епітелію ротової порожнини 93-х дітей з особливими потребами та 25-ти здорових дітей віком від 12 до 18 років. Першу групу (I) склали діти з особливими потребами із захворюваннями центральної нервової системи (ЦНС) (21 особа), другу групу (II) – діти із психічними розладами (24 особи), у третю групу (III) ввійшли діти з особливими потребами із хворобами крові (25 осіб), четверта група (IV) – діти із захворюваннями системи органів дихання (25 осіб). Діти

цих чотирьох груп регулярно проходили лікування основного захворювання на базі КУ «Запорізька обласна дитяча клінічна лікарня» та мали генералізований пародонтит I, II, III ступенів тяжкості. П'ята група (V) (група порівняння) – 25 практично здорових дітей віком від 12 до 18-ти років з генералізованим пародонтитом I, II, III ступенями тяжкості (табл. 1).

Для оцінки відносного рівня мРНК використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР). Об'єктом дослідження був епітелій ротової порожнини. Забір букального епітелію проводився вранці, до цього мінімум протягом 4-х годин був виключений прийом їжі. Перед забором проводилось ретельне полоскання порожнини рота водою або фізіологічним розчином. Забір епітелію проводився скребком клітин із внутрішньої сторони щоки разовим зондом із синтетичним ворсом. У стерильну одноразову пробірку типу «Еппендорф» (0,5 мл) із транспортним середовищем занурювалась відрізана робоча частина зонду. Дана процедура абсолютно безболісна, безкровна й не травматична. Для визначення рівня експресії використовували ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, США). Специфічні пари праймерів для аналізу досліджуваних і референсного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення Primer-BLAST (NIN, США) та виготовлені фірмою «Metabion» (Німеччина) (табл. 2).

Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США). Підібрано оптимальні умови ЗТ-ПЛР для

Таблиця 1

Розподіл дітей за ступенями тяжкості перебігу генералізованого пародонтиту

Генералізований пародонтит	I група n = 21	II група n = 24	III група n = 25	IV група n = 23	V група n = 25
I ступеня тяжкості	13	15	15	13	19
II ступеня тяжкості	6	8	7	8	6
III ступеня тяжкості	2	1	3	2	–

досягнення лінійної залежності між числом циклів і кількістю продуктів ПЛР. В експеримент були включені негативні контролю: без додавання в ДНК матриці в реакції ПЛР, без додавання РНК матриці при синтезі в ДНК, без додавання ферменту при синтезі в ДНК. Усі реакції ампліфікації повторювали три рази.

**Результати дослідження**

Результати дослідження експресії мРНК IL-1β, IL-17A, TLR2, TLR4 та NF-κB у дітей із психічними захворюваннями та захворюваннями центральної нервової системи наведено в таблиці 3. ЗТ-ПЛР-аналіз букального епітелію показав підвищені рівні експресії прозапальних цитокінів IL-1β і IL-17A в дітей із захворюваннями ЦНС у 8,9 і 7,7 разу (p < 0,05) відповідно. У дітей із психічними захворюваннями рівень IL-17A підвищився у 2,2 разу (p < 0,05) у порівнянні з контролем (рис. 1-а, 1-б).

Аналіз ЗТ-ПЛР продемонстрував 5,6 та 1,6-кратне (p < 0,05) зростання транскрипційної активності мРНК гену TLR2 та TLR4 у букальному епітелії дітей із захво-

рюваннями центральної нервової системи та психічними розладами відповідно (рис. 1-с, d). Нарешті, 7,5-кратне та 13,6-кратне (p < 0,05) зростання експресії NF-κB було продемонстровано в дітей із захворюваннями ЦНС і психічними захворюваннями відповідно (рис. 1-е).

Результати дослідження експресії мРНК IL-1β, IL-17A, TLR2, TLR4 та NF-κB дітей із захворюваннями дихальних шляхів і системи крові наведено в таблиці 4. ЗТ-ПЛР-аналіз букального епітелію показав підвищення рівня експресії прозапальних цитокінів IL-1β і IL-17A в дітей із захворюваннями дихальних шляхів і системи крові. Експресія IL-1β підвищилась у 6,5 і 2,9 разу (p < 0,05) відповідно, IL-17A – у 3,8 і 3 рази (p < 0,05) у порівнянні з контролем (рис. 2-а, 2-в). Аналіз ЗТ-ПЛР продемонстрував 8,5 і 2,4-кратне (p < 0,05) зростання транскрипційної активності мРНК гену TLR2 та TLR4 у букальному епітелії дітей із захворюваннями дихальних шляхів і 7,8 та 16,6-кратне (p < 0,05) – у дітей із захворюваннями системи крові (рис. 1С, D). Нарешті, 3,6-кратне та 6,1-кратне (p < 0,05) зростання експресії

Таблиця 2

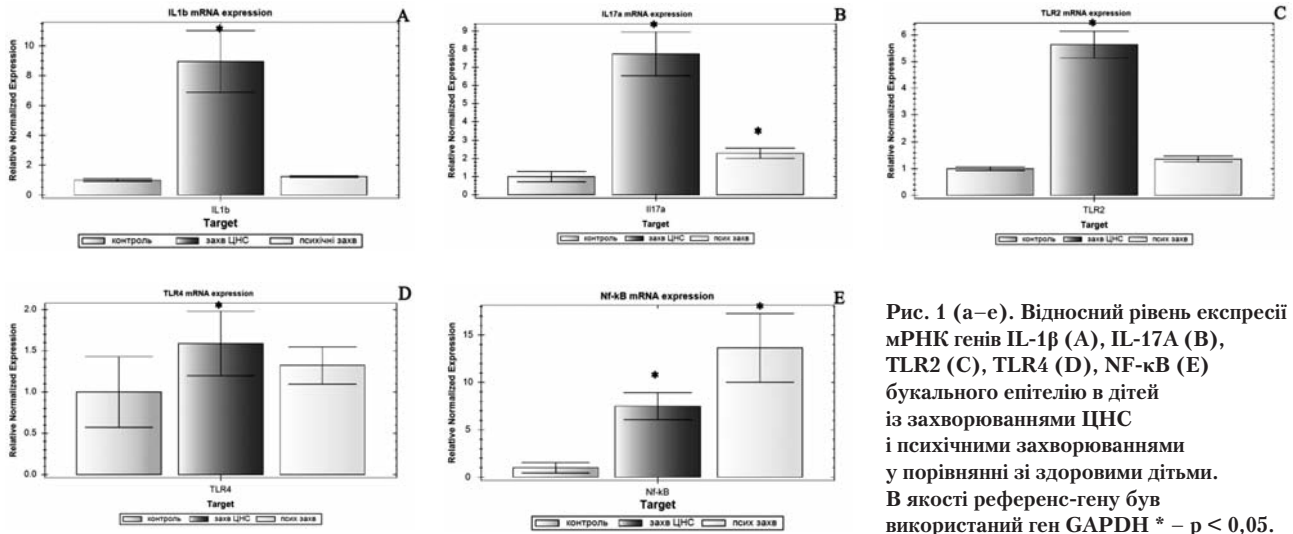
Gene	Primer	Temperature melting (°C)	Product length (bp)	Exon junction
TLR II	F: 5'-TTCTCTCAGGTGACTGCTCG-3'	59.12	46	72/73
	R: 5'-TGCAACACCAAACACTGGGA-3'	60.32		
TLR IV	F: 5'-TGCGTGAGACCAGAAAGCTG-3'	60.6	46	391/392
	R: 5'-TAGGAACCACCTCCACGCAG-3'	61.54		
IL1β	F: 5'-CCACCTCCAGGGACAGGATA-3'	60.03	41	553/554
	R: 5'-AGAACACCCTTGTGTGCTCCA-3'	60.06		
IL17a	F: 5'-TACAACCGATCCACCTCACC-3'	59.1	43	275/276
	R: 5'-CCTCATGCGGTGGAGATTC-3'	58.7		
NFKB1	F: 5'-AACAGCAGATGGCCCATACC-3'	60.11	63	626/627
	R: 5'-CGGAAACGAAATCCTCTCTGT-3'	58.04		
GAPDH	F: 5'-CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC-3'	59.83	63	165/166
	R: 5'-CGATGTGGCTCGGCTGG-3'	60.58		

Таблиця 3

**Рівень експресії мРНК генів GAPDH, TLR2, TLR4, NF-κB, IL-1β та IL-17A у дітей із захворюваннями центральної нервової системи (ЦНС) і психічними захворюваннями, хворих на генералізований пародонтит**

Мішень	Група	Рівень експресії M±m
TLR II	захворювання ЦНС	5,63651±0,68820*
	психічні захворювання	1,36016±0,23535
	контроль	1,00000±0,23167
TLR IV	захворювання ЦНС	1,58701±0,31023*
	психічні захворювання	1,32159±0,75234
	контроль	1,00000±0,24251
NF-κB	захворювання ЦНС	7,49826±1,11301*
	психічні захворювання	13,64252±2,19969*
	контроль	1,00000±0,19350
IL-1β	захворювання ЦНС	8,95672±1,35216*
	психічні захворювання	1,23213±0,25078
	контроль	1,00000±0,14247
IL-17A	захворювання ЦНС	7,74437±1,04164*
	психічні захворювання	2,29443±0,19519*
	контроль	1,00000±0,19598

Примітки: TLR2 – Toll-like рецептор другого типу; TLR4 – Toll-like рецептор четвертого типу; NF-κB – ядерний фактор κB; IL-1β – інтерлейкін 1β; IL-17A – інтерлейкін 17A; GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase \* – p < 0,05.

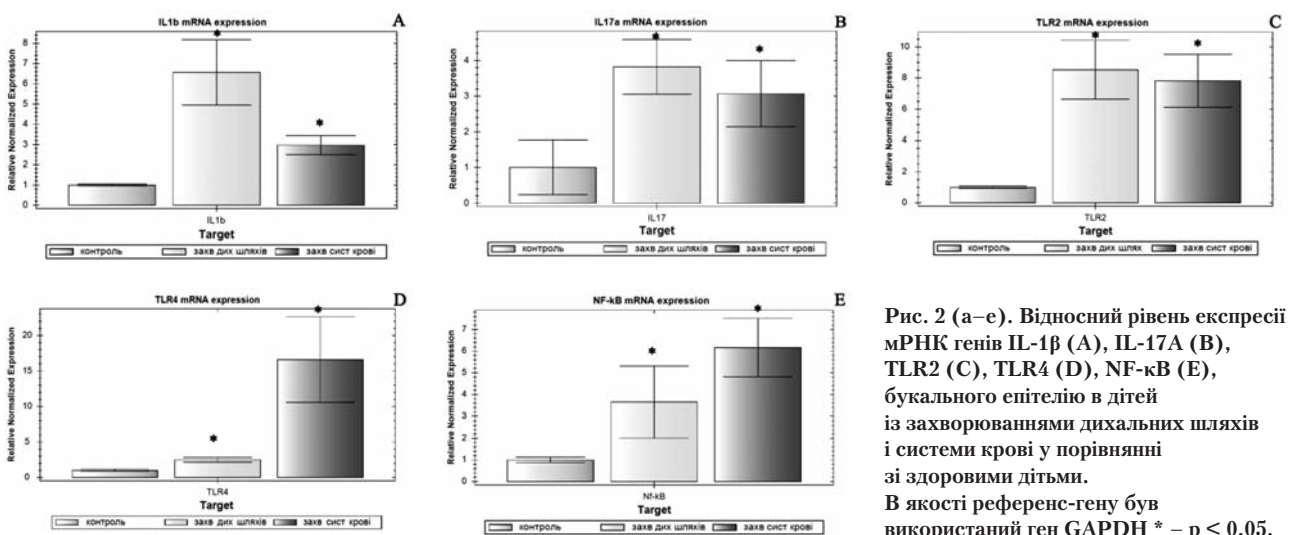


Таблиця 4

Рівень експресії генів GAPDH, TLR2, TLR4, NF-κB, IL-1β та IL-17A у дітей із захворюваннями дихальних шляхів і системи крові, хворих на генералізований пародонтит

Мішень	Група	Рівень експресії M±m
TLR II	захворювання дихальних шляхів	8,53419±1,51699*
	захворювання системи крові	7,81751±1,05294*
	контроль	1,00000±0,24110
TLR IV	захворювання дихальних шляхів	2,48518±0,26850*
	захворювання системи крові	16,59788±3,16877*
	контроль	1,00000±0,19453
NF-κB	захворювання дихальних шляхів	3,65774±0,51225*
	захворювання системи крові	6,16456±0,75163*
	контроль	1,00000±0,14049
IL-1β	захворювання дихальних шляхів	6,55897±0,80872*
	захворювання системи крові	2,97135±0,34198*
	контроль	1,00000±0,12541
IL-17A	захворювання дихальних шляхів	3,82293±0,55663*
	захворювання системи крові	3,06921±0,31085*
	контроль	1,00000±0,15417

Примітки: TLR2 – Toll-like рецептор другого типу; TLR4 – Toll-like рецептор четвертого типу; NF-κB – ядерний фактор κB; IL-1β – інтерлейкін 1β; IL-17A – інтерлейкін 17A; GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase \* – p < 0,05.



NF-κB було продемонстровано в дітей із захворюваннями дихальних шляхів і системи крові (рис. 2-е).

### Висновок

Проведено молекулярно-генетичне дослідження відносного рівня РНК прозапальних цитокінів IL-1β і IL-17A, толл-подібних рецепторів другого та четвертого типів і NF-κB в епітелії ротової порожнини в дітей з особливими потребами віком від 12 до 18-ти років і практично здорових дітей цього ж віку, які страждають на генералізований пародонтит. Установлено, що в дітей з особливими потребами всіх груп суттєво збільшений відносний рівень мРНК прозапального цитокіну IL-17A та NF-κB в епітелії ротової порожнини. Проте в дітей із захворюваннями ЦНС, на відміну від дітей із психічними захворюваннями, переважно збільшився рівень мРНК цитокіну IL-1β толл-подібних рецепторів другого та четвертого типу.

У дітей із захворюваннями дихальних шляхів і патологією системи крові суттєво збільшений відносний рівень мРНК прозапальних цитокінів IL-1β і IL-17A, толл-подібних рецепторів другого та четвертого типів і NF-κB епітелію ротової порожнини. При цьому в дітей із захворюваннями дихальних шляхів переважно збільшився рівень мРНК цитокінів IL-1β і IL-17A та толл-подібних рецепторів другого типу, а в дітей із захворюваннями системи крові – толл-подібних рецепторів четвертого типу та NF-κB. Збільшення рівня прозапальної сигналізації в ротовій порожнині пояснює більш високий рівень захворювань пародонту в дітей I, II, III, IV груп.

Проведені дослідження мають велике значення для діагностики запальних процесів і стану локального імунітету пародонту, а також є підґрунтям для розробки стратегії лікування генералізованого пародонтиту в дітей з особливими потребами.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – Киев: Морион, 2000. – 320 с.
2. Нормы лабораторных анализов: слюна [Электронный ресурс]. – Медицинская информационно-консультационная система. – Режим доступа: <http://ill.ru/>.
3. Система цитокинов, комплемента и современные методы иммунного анализа / Л.В. Ковальчук и др. – М.: Изд-во Российского гос. мед. ун-та, 2001. – 81 с.
4. Демьянов А.В. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике / А.В. Демьянов, А.Ю. Котов, А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2003, № 3. – С. 20–35.
5. Волкова М.Н. Исследование интерлейкина 1β, интерферона γ, интерлейкина 2 в ротовой жидкости пациентов с хроническим генерализованным периодонтитом, хроническим гингивитом и периодонтально здоровых / М.Н. Волкова, В.В. Янченко // Цитокины и воспаление. – 2011. – Т. 10. – № 4. – С. 46–51.

### Изменения экспрессии мРНК TLR II и IV типа, ядерного фактора κB и провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-17A эпителия ротовой полости у детей с особыми потребностями

*М.А. Гавриленко, А.М. Камышный*

**Цель:** оценить относительный уровень мРНК провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-17A, толл-подобных рецепторов II и IV типов и NF-κB эпителия ротовой полости у детей с особыми потребностями.

**Объект и методы.** Проведено молекулярно-генетическое исследование экспрессии толл-подобных рецепторов эпителия ротовой полости 93-х детей с особыми потребностями и 25-ти здоровых детей в возрасте от 12 до 18 лет.

**Результаты:** повышение уровня экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-17A у детей с заболеваниями ЦНС в 8,9 и 7,7 раза ( $P < 0,05$ ) соответственно. У детей с психическими заболеваниями уровень IL-17A повысился в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Экспрессия IL-1β повысилась в 6,5 и 2,9 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно, IL-17A – в 3,8 и 3 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

**Выводы.** Установлено, что у детей с особыми потребностями всех групп существенно увеличен относительный уровень мРНК провоспалительного цитокина IL-17A и NF-κB в эпителии ротовой полости.

**Ключевые слова:** дети с особыми потребностями, генерализованный пародонтит, провоспалительный цитокин, рецепторы врожденного иммунитета, ядерный фактор κB, IL-1β, IL-17A.

### Changes in the expression of mRNA TLR II and IV type, nuclear factor κB and pro-inflammatory cytokines IL-1β and IL-17A in the epithelium of the oral cavity in children with special needs

*M. Gavrilenko, A. Kamyshny*

**Objective:** to rate the relative level of mRNA of proinflammatory cytokines IL-1β and IL-17A, toll-like receptors II and IV types and NF-κB epithelium of the oral cavity in children with special needs and their influence on the course of generalized periodontitis.

**Object and methods.** Conducted molecular genetic study the expression of toll-like receptors in the epithelium of the oral cavity 93 children with special needs and 25 healthy children aged 12 to 18 years.

**Results:** the increased expression level of proinflammatory cytokines IL-1β and IL-17A in days diseases of the Central nervous system 8.9 and 7.7 times ( $p < 0.05$ ), respectively. Children with mental illness, the levels of IL-17A was increased in 2.2 times ( $p < 0.05$ ) in comparison with the control. The expression of IL-1β was increased by 6.5 and 2.9 times ( $p < 0.05$ ), respectively, of IL-17A – 3 and 3.8 times ( $p < 0.05$ ) in comparison with the control.

**Conclusions.** It was found that children with special needs of all groups significantly increased the relative mRNA level of proinflammatory cytokine IL-17A and NF-κB in the epithelium of the oral cavity.

**Key words:** children with special needs, generalized periodontitis, a proinflammatory cytokine, the receptors of innate immunity, nuclear factor κB, IL-1β, IL-17A.

*Гавриленко Марина Аркадіївна* – канд. мед. наук, асистент кафедри терапевтичної, ортопедичної та дитячої стоматології. Запорізький державний медичний університет. **Службова адреса:** пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035. **Тел.:** (061) 233-33-18. **Тел. моб.:** (066) 630-83-58. **E-mail:** [zpstatomat@bk.ru](mailto:zpstatomat@bk.ru).

*Камышный Александр Михайлович* – д-р мед. наук, професор, завідувач кафедру мікробіології, вірусології та імунології. Запорізький державний медичний університет. **Службова адреса:** пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035. **Тел.:** (061) 234-26-31. **Тел. моб.:** (066) 926-63-08. **E-mail:** [alexkamyshny@yandex.ru](mailto:alexkamyshny@yandex.ru).