

Н.Г.Саркисян^{1,3,5}, Л.В.Ганковская², И.А.Тузанкина^{1,3}, О.А.Свитич⁴,
Г.И.Ронь⁵, В.Н.Шершнева⁶, О.Н.Колядина², М.А.Долгих⁵

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ В ГЕНАХ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ПАРОДОНТИТОМ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

¹Уральский федеральный университет, Екатеринбург; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва; ³Институт иммунологии и физиологии, Екатеринбург; ⁴НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; ⁵Уральский медицинский университет, ⁶Институт промышленной экологии, Екатеринбург

Цель. Поиск ассоциации полиморфизмов в генах DEFB1, IL-10, TNF- α и TLR2 с развитием хронического генерализованного пародонтита у представителей уральского региона (европеоидной расы). *Материалы и методы.* В исследовании участвовали 142 пациента, которые были поделены на три группы: группа пациентов с пародонтитом, группа с частыми воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей и группа сравнения — здоровые доноры. В работе было проведено исследование полиморфных маркеров: DEFB1 (-44G/C), DEFB1 (-20A/G), IL-10 (-1082 A/G), TNF- α (-308 G/A), Arg753Gln и Arg677Trp с помощью ПЦР в режиме реального времени. *Результаты.* Определена ассоциация инфекционной патологии верхних дыхательных путей и возникновения заболеваний пародонта с полиморфными маркерами в генах DEFB1 (-44G/C) и Arg753Gln и Arg677Trp. Не выявлено достоверных различий в распределении генотипов и аллелей генов IL-10 и TNF- α в группе пациентов с пародонтитом и группе сравнения. *Заключение.* Полиморфизм DEFB1 (-44G/C) может рассматриваться в качестве маркера риска развития пародонтита.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 67—71

Ключевые слова: пародонтит, полиморфизм, врожденный иммунитет, TLR, цитокины, дефенсины, инфекция

N.G.Sarkisyan^{1,3,5}, L.V.Gankovskaya², I.A.Tuzankina^{1,3}, O.A.Svitich⁴,
G.I.Ron⁵, V.N.Shershnev⁶, O.N.Kolyadina², M.A.Dolgikh⁵

ASSOCIATION OF POLYMORPHIC MARKERS IN GENES OF INNATE IMMUNITY IN PATIENTS WITH PERIODONTITIS AND INFLAMMATORY DISEASES OF UPPER RESPIRATORY TRACT

¹Ural Federal University, Ekaterinburg; ²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow; ³Institute of Immunology and Physiology, Ekaterinburg; ⁴Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ⁵Ural Medical University, ⁶Institute of Industrial Ecology, Ekaterinburg, Russia

Aim. Search of association of polymorphisms in DEFB1, IL-10, TNF- α and TLR2 genes with development of chronic generalized periodontitis in representatives of Ural region (Caucasian race). *Materials and methods.* 142 patients, that were split into 3 groups, took part in the study: a group of patients with periodontitis, a group with frequent inflammatory disease of upper respiratory tract and a comparison group — healthy donors. A study of polymorphic markers was carried out: DEFB1 (-44G/C), DEFB1 (-20A/G), IL-10 (-1082 A/G), TNF- α (-308 G/A), Arg753Gln and Arg677Trp using PCR in real time mode. *Results.* Association of infectious pathology of upper respiratory tract and development of periodontitis diseases with markers in DEFB1 (-44G/C) and Arg753Gln and Arg677Trp genes was determined. Significant differences in distribution of genotypes and alleles of genes IL-10 and TNF- α in the group of patients with periodontitis and comparison group were not detected. *Conclusion.* DEFB1 (-44G/C) polymorphism can be examined as a marker of periodontitis development risk.

Key words: periodontitis, polymorphism, innate immunity, TLR, cytokines, defensins, infection

Патология пародонта по значимости занимает второе место после кариеса зубов. С каждым годом увеличивается число публикаций, подчеркивающих связь пародонтита с различными хроническими заболеваниями, к примеру: с атеросклерозом и ассоциированными с ним сердечно-сосудистыми заболеваниями, сахарным диабетом, желудочно-кишечными заболеваниями, заболеваниями почек, ожирением, метаболическим синдромом, заболеваниями щитовидной железы, иммунными нарушениями и др. [2, 6, 7, 11]. По данным ВОЗ распространенность заболеваний пародонта различной степени тяжести составляет более 90% у взрослого населения. Несмотря на интенсивное исследование патогенеза пародонтита и риска развития данной патологии, до настоящего времени не выявлено определенной взаимосвязи между конкретными маркерами и развитием заболевания [2 — 4].

Показано, что этиологическими факторами хронического генерализованного пародонтита являются бактерии *P. intermedia*, *B. forsythus*, *T. denticola* и *A. actinomycetemcomitans*, а также вирусы семейства *Herpesviridae*. В последние годы в литературе появились данные о роли иммунной системы, в частности факторов врожденного иммунитета, в патогенезе пародонтита. Особое место среди факторов иммунитета занимают цитокины, и баланс про- и противовоспалительных цитокинов имеет большое значение при пародонтите. Считается, что полиморфные маркеры в генах *CD-14* и *TNF- α* могут быть ассоциированы с метаболическими нарушениями в системе соединительной ткани и деструктивными процессами в кости. Так, полиморфизмы *C(-260)T* в гене *CD14* и *G(-308)A* в гене *TNF- α* ассоциированы с высоким риском развития хронического воспаления в тканях пародонта. При наличии хронического генерализованного пародонтита в зубодесневой жидкости определяется повышение провоспалительных цитокинов *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-1 α* и снижение — *IL-10*. Показано, что к протективным маркерам хронического пародонтита относятся специфичность *DRB1*04* и аллель *DQA1*0101*, которые ассоциированы с устойчивостью к различным формам данной патологии [9].

В литературе имеются единичные и противоречивые исследования, касающиеся ассоциации полиморфных маркеров в генах, белковые продукты которых участвуют в иммунных реакциях с риском развития заболеваний пародонта [10, 13]. Практически нет данных о маркерах в генах противомикробных пептидов (дефенсинов), которые являются одним из основных факторов защиты слизистой ротовой полости. Следует отметить, что рецепторы врожденного иммунитета, распознающие патогены — *Toll*-подобные рецепторы (*TLR*) и др. могут участвовать в патогенезе пародонтита. В связи с этим, поиск генетических маркеров в генах врожденного иммунитета (*TLR*, дефенсинов, цитокинов) воспалительных заболеваний пародонта является актуальной задачей. Полученные данные позволяют прогнозировать развитие и тяжесть воспалительных заболеваний пародонта.

Цель исследования — поиск ассоциации полиморфизмов в генах *DEFB1*, *IL-10*, *TNF- α* и *TLR2* с развитием хронического генерализованного пародонтита у представителей уральского региона (европеоидной расы).

В данной работе были обследованы 142 пациента, среди них 57 мужчин и 85 женщин, в возрасте от 35 до 55 лет. Все пациенты были разделены на три группы: пациенты с пародонтитом (67 человек: 23 мужчины, 44 женщины, возраст 37 — 55 лет), пациенты с частыми воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей (48 человек: 19 мужчин, 29 женщин, возраст 35 — 52 года) и группа сравне-

ния — здоровые доноры (27 человек: 15 мужчин, 12 женщин, возраст 40 — 55 лет). По расширенному сбору анамнеза выявлено наличие соматической патологии (гайморит, тонзиллит, ларингит, этмоидит, отит, трахеит, фарингит). Проведено комплексное стоматологическое обследование: заполнение амбулаторной карты формы 043У, сбор жалоб, анамнеза, осмотра с индексной оценкой гигиенического состояния полости рта.

Биологическим материалом служил соскоб эпителиальных клеток со слизистой щеки пациента. Анализ материала выполнялся на кафедре иммунологии РНИМУ им. Н.И.Пирогова.

В работе было проведено исследование полиморфных маркеров: DEFBI (-44G/C), DEFBI (-20A/G), IL-10 (-1082 A/G), TNF- α (-308 G/A), Arg753Gln и Arg677Trp. Для оценки полиморфизмов из эпителиальных клеток была выделена ДНК с использованием наборов «К-сорб» («Синтол», РФ). Далее проводили полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для приготовления ПЦР-смеси в реакциях использовали Hot Start Taq DNA Polymerase («Синтол», РФ) а также наборы «Набор реактивов для проведения ПЦР-РВ» («Синтол», РФ). Реакцию для оценки маркеров в генах дефензина проводили на приборе RotorGene («QIAGEN», Германия). Праймеры, задействованные в работе с генетическими маркерами, были разработаны с помощью программы Vector NTI 8.0 и синтезированы фирмой «Синтол» (РФ). Системы для проведения ПЦР-РВ для определения исследуемых полиморфизмов была разработаны на кафедре иммунологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова [1, 5, 8].

Для оценки полиморфных маркеров Arg753Gln и Arg677Trp в гене TLR2 проводили ПЦР и реакцию рестрикции. При исследовании полиморфных маркеров, локализованных в гене TLR2, был использован подход, предложенный Schröder N.W. et al. [12]. Реакцию рестрикции продуктов ПЦР проводили для выявления наличия полиморфных участков в генах TLR2. Для определения полиморфных маркеров Arg677Trp и Arg753Gln в гене TLR2 использовали рестриктазу BspAC I («СибЭнзим», РФ). Температурный и временной режим реакции полностью соответствовал таковому в инструкции фирмы-производителя.

Статистическая обработка данных проводилась в программе Microsoft Excel 2007 с использованием статистического пакета STATISTICA 6.0, а также при использовании формул «Pearson Chi-square» и «M-L Chi-square». Для оценки достоверности различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров применяли критерий χ^2 . Различия между показателями в группах считались достоверными при $p < 0,05$.

При исследовании распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg677Trp гена TLR2 среди пациентов с пародонтитом, с воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей и в группе сравнения обнаружено преобладание частоты аллеля Trp над частотой аллеля Arg и встречаемости генотипа TrpTrp над встречаемостью генотипов TrpArg и ArgArg во всех исследуемых группах. Отличия распределения аллелей и генотипов в группе пациентов с пародонтитом и в группе сравнения были недостоверны. Однако следует отметить, что у пациентов с инфекцией достоверно доминировал гетерозиготный генотип и отсутствовал генотип Arg/Arg.

Таким образом, можно заключить, что полиморфный маркер Arg677Trp гена TLR2 не ассоциирован с пародонтитом. Можно предположить, что хотя замена аминокислоты в 677 положении могла привести к нарушению передачи сигнала с TIR-домена TLR2 рецептора, но в наших исследованиях в группе с пародонтитом это не было показано. В то же время, у пациентов с частыми заболеваниями верхних дыхательных путей выявлена ассоциация маркера Arg677Trp.

Другой полиморфный маркер Arg753Gln также был локализован в районе TIR-домена TLR2. В группе пациентов с воспалительными заболеваниями верх-

них дыхательных путей частота аллеля Gln преобладала над частотой аллеля Arg, а встречаемость генотипа GlnArg — над другими генотипами. Следует отметить, что в группе с пародонтитом соотношение частоты аллелей и генотипов было сопоставимо с показателями в группе сравнения.

В группе пациентов с пародонтитом распределение частоты аллелей и генотипов полиморфизмов IL-10 (-1082 A/G) и TNF- α (-308 G/A) недостоверно отличалось от такового в норме. При рассмотрении распределения частоты генотипов можно отметить, что в группе с пародонтитом недостоверно преобладали генотипы TNF- α (GG) и IL-10 (GG). Сравнительный анализ исследуемых маркеров в генах цитокинов не выявил статистически значимых отличий в группе с пародонтитом и в группе пациентов с воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей относительно показателей в группе сравнения.

Другие полиморфные маркеры, которые были изучены в работе, относились к нетранслируемой области гена дефенсина. Для данного исследования нами были выбраны полиморфные маркеры G(-20)A и C(-44)G гена DEFB1, расположенные в нетранслируемой области. Предположительно данные SNPs могут влиять на уровень экспрессии гена дефенсина. SNPs в положениях -44C/G (rs1800972) и -20G/A (rs11362), которые находятся в 5'-нетранслируемой области (UTR) гена DEFB1, не приводили к изменению аминокислотной последовательности, но могли быть связаны с изменением в транскрипции или в трансляции [14]. Ассоциация данных полиморфных маркеров с патологиями пародонта до настоящего времени не исследовалась.

Различия в распределении аллелей и генотипов полиморфного маркера A(-20)G между исследуемыми группами были статистически недостоверными. Таким образом, можно говорить об отсутствии ассоциации полиморфного маркера A(-20)G гена DEFB1 с пародонтитом и воспалительными патологиями верхних дыхательных путей. Показано, что пародонтит ассоциирован с генотипом CC -44C/G (rs1800972). Частота генотипов в группе пациентов с инфекцией относительно показателей в группе сравнения были следующими: генотип GG — 0,2 и 0,04, генотип GC — 0,41 и 0,46, генотип CC — 0,39 и 0,50, соответственно. Риск развития воспалительных патологий в верхних дыхательных путях связан с носительством генотипа GG, генотип CC является протективным.

Полученные результаты дают возможность выявления генетической предрасположенности к пародонтиту и воспалительной патологии верхних дыхательных путей. Исследование позволяет рекомендовать проведение генетического анализа на полиморфизм гена DEFB1 в детском возрасте, что даст возможность направленной профилактики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ганковская О.А. Исследование ассоциации полиморфных маркеров генов TLR2 и TLR9 с преждевременными родами и внутриутробным инфицированием. Медицинская иммунология. 2010, 12 (1-2): 87-94.
2. Козодаева М.В., Иванова Е.В., Манулов Б.М. Состояние пародонта у больных сахарным диабетом (обзор). Пародонтология. 2011, 1 (58): 3-7.
3. Мирсаева Ф.З. Экспресс-диагностика заболеваний внутренних органов у больных хроническим генерализованным пародонтитом. Пародонтология. 2013, 3 (68): 55-58.
4. Ореховой Л.Ю. Заболевания пародонта. М., Поли Медиа Пресс, 2004.
5. Свитич О.А., Ганковская Л.В., Рахманова И.В. и др. Ассоциация полиморфных маркеров, локализованных в 5'-нетранслируемой области гена DEFB1, с гипертрофией аденоидных вегетаций. Вестник РГМУ. 2012, 3: 59-62.
6. Al-Zahrani M. S., Kayal R. A., Bissada N. F. Periodontitis and cardiovascular disease: a review of shared risk factors and new findings supporting a causality hypothesis. Quint. Int. 2006, 37 (1): 11-18.
7. Chapple I. L., Genco R. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/

- AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. J. Periodontol. 2013, 84 (4): 106-112.
8. Gankovskaya L.V., Svitich O.A., Lavrov V.F. et al. Herpes simplex virus type 2 infection during pregnancy is correlated with elevated TLR9 and TNF α expression in cervical cells. Intern. Trends Immunology. 2014, 2: 62-66.
 9. Jazi M.M., Solgi G., Roosta H.A. et al. HLA-DRB and HLA-DQA/HLA-DQB allele and haplotype frequencies in Iranian patients with aggressive periodontitis. J. Periodontal Res. 2013, 48 (4): 533-539.
 10. Karimbux N.Y., Saraiya V.M., Elangovan S. et al. Interleukin-1 gene polymorphisms and chronic periodontitis in adult whites: a systematic review and meta-analysis. J. Periodontol. 2012, 83 (11): 1407-1419.
 11. Luis-Delgado O., Echevarría-García J. J., Berini-Aytés L. et al. Periodontitis as a risk factor in patients with ischemic heart disease. Med. Oral. 2004, 9(2):125-137.
 12. Schröder N.W., Hermann C., Hamann L. et al. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. J. Mol. Med. 2003, 81 (6): 368-372.
 13. Taba M. Jr., Souza S.L., Mariguela V.C. Periodontal disease: a genetic perspective. Braz. Oral. Res. 2012, 26 (1): 32-8.
 14. Tesse R., Cardinale F., Santostasi T. et al. Association of beta-defensin-1 gene polymorphisms with Pseudomonas aeruginosa airway colonization in cystic fibrosis. Genes Immun. 2008, 9 (1): 57-60.

Поступила 15.05.15

Контактная информация: Свитич Оксана Анатольевна,
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)674-55-01

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

П.Д.Лопухов¹, Н.И.Брико¹, А.А.Халдин², Н.Н.Цапкова¹, О.В.Лунашко²

ПАПИЛЛОМАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ: ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ, КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ, ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА

¹Первый Московский государственный медицинский университет И.М. Сеченова,
²Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии

Папилломавирусы — большая и разнообразная группа вирусов. Она включает около двухсот полностью описанных типов, которые были обнаружены у людей. Вирусы папилломы человека (ВПЧ) выступают этиологическим агентом при различных доброкачественных и злокачественных поражениях эпителия слизистых оболочек и кожи. Крайне важно, что персистирующая ВПЧ инфекция определенных типов является ведущей причиной рака шейки матки, полового члена, вульвы, влагалища, анального канала и ротоглотки (включая основание языка и миндаины). Профилактика ВПЧ инфекции — лучший способ борьбы с обусловленными ВПЧ заболеваниями, а вакцинация, как было показано, самый эффективный метод ее профилактики. В данной статье рассмотрены основные характеристики и клинические проявления папилломавирусной инфекции, а также эффективность вакцинации против ВПЧ.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 71—78

Ключевые слова: папилломавирус, рак шейки матки, аногентиальные бородавки, вакцинация