

О взаимосвязи полиморфизма некоторых генов-кандидатов с показателями местного иммунитета полости рта при хроническом генерализованном пародонтите

Вишнягова НА, врач стоматолог-терапевт ООО «Стоматологическая клиника «Гармония», г.Омск

About interconnection between some genes-candidates with the local oral cavity immunity parameters in chronic generalized parodontosis

Vishnyagova N. A.

Резюме

Установленные ассоциации между уровнем экспрессии генов провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-2 и повышенным содержанием иммуноглобулинов в ротовой жидкости обеспечивают генетическую регуляцию состояния местного иммунитета полости рта. Полиморфизм -308G гена TNF- α , гомозиготные варианты гена IL-1 β (2/2) и IL-2 (2/2) ассоциированы с повышенным риском развития пародонтита. Носительство генотипа «2/2» IL-1 β (+3955) обуславливает максимальное увеличение титра Ig G в десневой жидкости и более тяжёлое течение воспаления в пародонте.

Ключевые слова: местный иммунитет, цитокины, иммуноглобулины

Resume

The genetic regulation of oral cavity immunity on the base of determining associations between the level of anti-inflammatory cytokine genes TNF- α , IL-1 β , IL-2 and the content of immunoglobulin in gingival liquor was validated. Polymorphism -308G of gene TNF- α , homozygous variants of gene IL-1 β (2/2) and gene IL-2 (2/2) have been associated with some increased risk of parodontitis development. Maximum enlargement of titre Ig G in gingival liquor and more severe inflammatory course of parodont are determined by carriage of genotype «2/2» IL-1 β (+3955).

Key words: local immunity, cytokines, immunoglobulin

При всём многообразии теорий пародонтита роль микрофлоры в инициации заболевания очевидна и многократно подтверждена. Пародонтит возникает в результате воспалительного ответа организма хозяина на скопление микробов, вегетирующих в составе зубного налёта и контактирующих с тканями десны, прежде всего грамположительных кокков [1;2;3;4;5;6].

Вместе с тем реализация заболевания и выраженность воспалительной реакции в значительной мере определяется возможностями макроорганизма противостоять воздействию на него патогенной микрофлоры [7]. Факт формирования расстройств иммунного реагирования при инфекционном воспалении тканей пародонта установлен давно [8;9;10;11;12]. Известно, что пародонтопатогенные возбудители обладают иммуномодулирующей активностью, вызывая иммунодефицитные состояния, степень выраженности которых связана непосредственно с характером и тяжестью воспалительного процесса и зависит от преморбидного фона пациента и субстрата, в котором развивается патологический процесс [13].

В настоящее время становится всё более очевидным, что тканевое поражение определяется сочетанием внешнего деструктивного фактора (факторов) и локальной тканевой реакции. Последняя может широко варьировать у разных индивидуумов и зависит как от системных комплексных патофизиологических реакций, так и от местных предрасполагающих или, напротив, предохраняющих особенностей организма.

Местный иммунитет – это звено иммунной системы, обеспечивающее защиту тканей, непосредственно контактирующих с микрофлорой окружающей среды [14]. Уровни тканевой реактивности закреплены генетически, следовательно, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию факторов неспецифической резистентности (рецепторов, сорбирующих бактерии, системы макрофагальных клеток, цитокинов и рецепторов к цитокинам).

Углублённое изучение генетической регуляции местных иммунных реакций полости рта при пародонтите позволит реализовать стратегию индивидуализированного подхода к ранней диагностике этого заболевания и определять особенности курации стоматологических пациентов, базирующиеся на донозологическом прогнозе.

Цель настоящего исследования - сопоставление показателей состояния местного иммунитета полости рта с полиморфизмами генов-кандидатов воспалительной реакции: провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β ; IL-2.

Ответственный за ведение переписки -
Вишнягова Наталья Александровна
644073, г. Омск-73, ул. Бережного, д.5А, кв.68.
Тел. моб. 89136097976
Тел. раб. (3812) 325443
Тел. дом. (3812) 717248
e-mail: vish-omsk@mail.ru

Материалы и методы

Было проведено углублённое клинико-лабораторное обследование лиц обоего пола в возрасте 17-75 лет, обратившихся за стоматологической помощью на кафедру терапевтической стоматологии ГОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия Росздрав» и ООО «Стоматологическая клиника «Гармония» (г. Омск). Была сформирована исследовательская когорта из 195 больных хроническим генерализованным пародонтитом в стадии ремиссии (102 мужчины и 93 женщины) в возрасте 46-75 лет. Следуя принципам медицины, основанной на доказательствах, определение минимально допустимого размера выборки рассчитывалось по формуле Лера [15]. Имелось информированное согласие пациента на участие в исследовании.

Критерии исключения:

- Пациенты с клиническими и лабораторными признаками наличия острого воспалительного процесса;
- Лица, имеющие на момент обследования хронические соматические заболевания в стадии обострения;
- Лица, в анамнезе которых отмечаются системные заболевания (ревматоидный артрит и др.), ассоциированные с полиморфизмом гена IL-1 β ;
- Лица, имеющие отягощённый аллергологический анамнез;
- Лекарственная и (или) наркотическая, и (или) токсическая (в том числе алкогольная) зависимость, установленные на основании анамнестических данных, либо выявленные на любом этапе обследования.
- Лица, не понимающие цели исследования и не подписавшие добровольное информированное согласие на участие в исследовании, а также отказавшиеся от участия в исследовании на любом из его этапов.

Группу сравнения составили также 195 человек (98 мужчин и 97 женщин) аналогичного возраста без клинически выраженных признаков воспаления в пародонте.

Пародонтологический статус обследуемых определялся по методике А.И. Грудянова и А.И. Ерохина [1].

Иммунологическая реактивность тканей пародонта определялась по уровню иммуноглобулинов (Ig) классов G, A, M в десневой жидкости. Определение содержания Ig G, A, M проводили методом трёхфазного иммуноферментного анализа: концентрации Ig G, A, M – наборами ЗАО «Вектор-Бест» (г.Новосибирск). Забор материала осуществлялся по методике Н.А. Чукасовой (1990) с помощью приспособления, представляющего собой инъекционную иглу с затупленным концом, герметично соединённую с пустотелым пластичным баллончиком (штриц-тюбик с иглой) [16]. Суть данной методики заключается в следующем. В баллончик набирали небольшое количества раствора Хенкса, иглу вводили десневую борозду, выпускали в неё каплю раствора Хенкса, затем, прижимая к десневой стенке борозды, с небольшим усилием проводили от межзубного сосочка к другому, осторожно всасывая содержимое в иглу. Полученную жидкость и материал сосочка вносили в пробирку с раствором Хенкса (2мл). Подобным образом десневую жидкость собирали в области 3-4 интактных зубов. Дальней-

шие исследования выполняли по инструкции, прилагаемой к указанному выше набору.

Состояние гуморального звена иммунитета полости рта изучали также по параметрам провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β ; IL-2. Материалом для исследования служила венозная кровь пациентов. Молекулярно-генетические исследования выполнены в лаборатории молекулярных основ генетики животных ГУ НИИ Цитологии и генетики Сибирского отделения Российской Академии Наук (Сибирский научный Центр, г. Новосибирск).

Все цифровые данные обработаны с помощью системы статистического анализа I \bar{C} BM «Intel Pentium-IV» в системе Microsoft Excel и Windows Vista в редакторе электронных таблиц, а также с применением пакета статистических программ «Biostat». При анализе определяли средние арифметические величины (M) и их средние ошибки (m). Достоверность различий (p) между группами оценивали по критерию значимости (t) Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$, $t \geq 2$.

Результаты исследования

У больных хроническим генерализованным пародонтитом был оценен аллельный полиморфизм гена TNF- α в позиции 308. Полученные данные представлены в таблице 1. Полиморфизм -308G промотора TNF- α статистически значимо ($p=0,001$) ассоциирован с повышенным риском развития пародонтита, так как в основной группе обследования носители аллеля G/A обнаруживаются в 1,9 чаще, чем в группе лиц с интактным пародонтом.

Наряду с этим, у больных пародонтитом анализировалось распределение нормальных и полиморфных вариантов генов семейства интерлейкинов (IL-1 β ; IL-2). Оценивалось влияние этих генов на показатели местного иммунитета полости рта. В ходе проведённого исследования было установлено, что у больных пародонтитом наличие гомозиготного варианта гена IL-1 β (2/2) определяется в 5,5 раза чаще, чем у пациентов без клинически выраженных признаков воспаления тканей пародонта (табл.2). Тогда как нормальный вариант этого гена IL-1 β (1/1) в гомозиготном виде у обследованных пациентов присутствовал в 1,5 раза реже, чем в группе здоровых лиц (табл.2). Кроме того, у больных в 2,5 раза чаще, чем у пациентов группы сравнения встречался гомозиготный вариант гена IL-2.

Гомозиготный полиморфный вариант гена IL-2 у здоровых встречался в 3,5% случаев, а в основной группе обследования этот вариант гена имели 8,8% человек. При наблюдении пациентов в течение 1 года у носителей «2/2» IL-2 чаще наблюдались обострения хронического течения заболевания, что подтверждалось индексами кровоточивости по Mühlemann H.R, Son S. и PMA по Parma.

Иммунный статус и частота носительства вариантов «2/2»IL-1 β (+3955), «2/2» IL-2 и TNF- α при G(-308)→A изучался у 195 больных пародонтитом и у 195 пациентов, входящих в группу сравнения.

Таблица 1. Распределение генотипов TNF-α среди больных пародонтитом и пациентов группы сравнения

Группа обследуемых	Всего % (абс. число)	Частота генотипа, % (абс. число)			Частота аллеля, % (абс. число)	
		G/G	G/A	A/A	G	A
Группа сравнения	100,0 (195)	-	16,1 (10)	3,6 (4)	37,2 (214)	64,9 (286)
Пародонтит	100,0 (195)	82,3 (51)	20,1 (43)	1,9 (1)	48,6 (265)	39,9 (224)
Всего:	100,0 (390)	79,0 (218)	19,2 (53)	1,8 (5)	40,7 (233)	57,2 (246)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig (2-sided)
Pearson Chi-Square	3,19 ^a	2	,001
Likelihood Ratio	5,35	2	,001
N of Valid Cases	276		

a. 2 cells (33,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 12

Различия статистически значимы (p=0,001)

Таблица 2. Частота носительства полиморфных и нормальных вариантов генов IL-1β и IL-2 у больных хроническим пародонтитом и пациентов группы сравнения

Группы наблюдения	Частота (%)					
	Аллели					
	IL-1β (+3955)			IL-2		
	1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2
Больные пародонтитом	56,5	36,9	36,7	45,1	53,0	8,8
Здоровые	28,3	38,3	6,6	31,2	55,9	3,5

Таблица 3. Уровень иммуноглобулинов в десневой жидкости больных пародонтитом с различной частотой носительства генов провоспалительных цитокинов TNF-α, IL-1β (+3955) и IL-2 и пациентов группы сравнения

Количество человек	Носительство генов цитокинов	Иммуноглобулины (M±m), г/л		
		G	A	M
n=65	TNF-α при G(-308)→A	9,54±0,2	1,79±0,22	1,15±0,07
n=65	«2/2» IL-2	9,65±0,68	1,59±0,13*	1,05±0,11
n=65	«2/2» IL-1β (+3955)	12,34±0,54**	0,84±0,14***	1,66±0,12***

Группа сравнения	Иммуноглобулины (M±m), г/л		
	G	A	M
	9,33±0,41	1,95±0,03	1,18±0,04

Примечание: В таблице указаны только статистически значимые различия; p – значимость рассчитана по отношению к аналогичному показателю в группе сравнения: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,01.

При проведении комплексного исследования показателей местного иммунитета у больных пародонтитом были получены следующие данные (табл. 3.). Согласно полученным данным максимальное увеличение титра Ig G в десневой жидкости больных пародонтитом отмечается у носителей гена «2/2»IL-1β (+3955). Также у носите-

лей этого гена отмечается статистически значимое снижение уровня Ig A. При этом средний уровень Ig A в группах больных пародонтитом с различной экспрессией генов провоспалительных цитокинов был ниже аналогичного показателя лиц группы сравнения (табл.3). Клинически у больных пародонтитом с носительством «2/2»IL-1β

Таблица 4. Сравнительная характеристика основных клинических показателей больных пародонтитом с различной частотой носительства генов провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β (+3955) и IL-2

Изучаемые показатели	Носительство генов цитокинов		
	TNF- α при G(-308) \rightarrow A	«2/2» IL-2	«2/2»IL-1 β (+3955)
ОHI-S (баллы)	0,89 \pm 0,08	1,55 \pm 0,13 p=0,0001	2,93 \pm 0,18 p=0,0001 p ₁ =0,005
PMA (%)	16,48 \pm 3,54	24,14 \pm 4,29 p=0,001	44,65 \pm 5,15 p=0,0001 p ₁ =0,001
PI (баллы)	0,74 \pm 0,09	2,27 \pm 0,59	4,17 \pm 0,94 p=0,0001
SBI (баллы)	0,83 \pm 0,01	0,88 \pm 0,05	1,31 \pm 0,47
КП Fusch (баллы)	0,84 \pm 0,06	0,69 \pm 0,02	0,41 \pm 0,06 p=0,001
Подвижность зубов (баллы)	0,01 \pm 0,001	1,33 \pm 0,09	2,01 \pm 0,03 p=0,001

Примечание: В таблице указаны только значимые показатели; коэффициент значимости p рассчитан по отношению к соответствующим показателям больных пародонтитом – носителей гена TNF- α при G(-308) A; коэффициент значимости p₁ рассчитан по отношению к соответствующим показателям больных пародонтитом – носителей гена «2/2» IL-2.

(+3955) отмечаются наихудшие значения клинических показателей пародонта (глубокие пародонтальные карманы, наибольшие показатели индекса PMA и SBI) (табл.4).

При этом отмечаются статистически значимые различия значений в подгруппе больных пародонтитом – носителей гена «2/2»IL-1 β (+3955) от сравниваемых подгрупп (носителей генов TNF- α при G(-308) \rightarrow A и «2/2» IL-2) по таким показателям, как ОHI-S, PMA, PI, КП Fusch, а также по показателю подвижности зубов.

Таким образом, клиническое сопоставление полиморфизмов генов-кандидатов воспалительной реакции TNF- α , IL-1 β ; IL-2 с показателями местного иммунитета полости рта позволили установить, что носительство гено типа «2/2»IL-1 β (+3955) обуславливает более тяжёлое течение воспаления в пародонте. Полученные данные могут быть использованы при планировании лечебных и профилактических мероприятий больным хроническим пародонтитом с опорой на гено-кандидатный анализ. ■

Литература:

1. Грудянов АИ. Заболевания пародонта. М: 2009.
2. Григорьян АС (и др.) Болезни пародонта. Патогенез, диагностика, лечение: руководство для врачей. М: МИА; 2004.
3. Канкянцян АП. Болезни пародонта (новые подходы в этиологии, патогенезе, диагностике, профилактике и лечении). Ереван; 1998.
4. Иванов ВС. Заболевания пародонта. М: 1998.
5. Kesavalu L. In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans. Oral Microbiol Immunol. 2002. Vol 17, № 3. P. 177-180.
6. Stots J. Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius and Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal diseases. J. Clin. Periodontol. 1988; Vol 15. P. 85-93.
7. Taubman M.A. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. J. Clin. Periodontol. 2007; Vol 34, №5. P. 367-369.
8. Булгакова АИ. Влияние состояния местного иммунитета десны и ротовой полости на течение хронического пародонтита. Новое в стоматологии. 2001; №10. С. 90-93.
9. Воложанин АИ (и др.) Иммунологические нарушения в патогенезе хронического генерализованного пародонтита. Стоматология. 2005; № 3. С. 4-7.
10. Безрукова И.В. Роль иммунных механизмов в развитии заболеваний пародонта. Озонотерапия в пародонтологической практике. М: 2008. С. 11-13.
11. M.A. Taubman [et al] Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. J. Periodontol. 2005; Vol 76, №11. P. 2033-2041.
12. Oda T, Yoshie H, Yamazaki K. Porphyromonas gingivalis antigen preferentially stimulates T cells to express IL-17 but not receptor activator of NF-kappaB ligand in vitro. Oral Microbiol Immunol. 2003. Vol 18, №1. P. 30-36.
13. Preshaw P.M., Seymour R.A., Heasman P.A. Current concepts in periodontal pathogenesis. Dent Update. 2004; Vol 31, №10. P. 570-578.
14. Бабер Хью Р.К. Иммунология для практических врачей: пер с англ. М: Медицина; 1995. С. 297-341.
15. Власов В.В. Введение в доказательную медицину. М: 2001. 329с.
16. Дмитриева Л.А. Современные аспекты клинической пародонтологии. М: 2001. 125с.