

УДК [616.314-089.23+577.121]:575
DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.3744363>

ОЦЕНКА НАРУШЕНИЙ В ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРАХ, СВЯЗАННЫХ С КОСТНЫМ МЕТАБОЛИЗМОМ У ПАЦИЕНТОВ С ЗУБОЧЕЛЮСТНЫМИ АНОМАЛИЯМИ НА ФОНЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

¹Деньга А.Э., ¹Вербицкая Т.Г., ²Рожко П.Д.

¹Государственное учреждение «Институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии НАМН Украины»

²Одесский национальный медицинский университет

ОЦІНКА ПОРУШЕНЬ В ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРАХ, ПОВ'ЯЗАНИХ З КІСТКОВИМ МЕТАБОЛІЗМОМ, У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЗУБОЩЕЛЕПНИМИ АНОМАЛІЯМИ НА ФОНІ МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ

¹Деньга А.Е., ¹Вербицька Т.Г., ²Рожко П.Д.

¹Державна установа «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії НАМН України»

²Одеський національний медичний університет

EVALUATION OF GENETIC MARKERS OF BONE METABOLISM IN PATIENTS WITH MAXILLOFACIAL ANOMALIES ON THE BACKGROUND OF METABOLIC SYNDROME

¹Denga A.E., ¹Verbitskaya T.G., ²Rozhko P.D.

¹State Institution «The Institute of Stomatology and Maxillo-facial Surgery NAMS of Ukraine»

²Odessa National Medical University

Резюме/Summary

Work shows that creation of dentofacial anomalies treatment plan and development of therapeutic and preventive measures to support orthodontic treatment in patients with metabolic syndrome and chronic generalized periodontitis, it is first necessary to take into account the status of osteogenesis markers Col1A1 and VDR to predict complications, occurrence and progression of periodontal tissue diseases, endothelial factor VEGF, antioxidant protection factor PON, as well as APOE lipoprotein metabolism markers, TGF osteoblast proliferation and a marker of bone tissue response to NOS loading.

Key words: *genetic markers, bone metabolism, orthodontic treatment, metabolic syndrome.*

Показано, что при создании плана лечения зубочелюстных аномалий и разработке лечебно-профилактических мероприятий сопровождения ортодонтического лечения у пациентов с метаболическим синдромом и хроническим генерализованным пародонтитом, в первую очередь необходимо учитывать для прогнозирования осложнений, возникновения и прогрессирования заболеваний тканей пародонта состояние маркеров остеогенеза Col1A1 и VDR, эндотелиального фактора VEGF, фак-

тора антиоксидантной защиты PON, а также маркеров метаболизма липопротеинов APOE, пролиферации остеобластов TGF и маркера реакции костных тканей на нагрузку NOS.

Ключевые слова: генетические маркеры, костный метаболизм, ортодонтическое лечение, метаболический синдром.

Показано, що при створенні плану лікування зубощелепних аномалій та розробці лікувально-профілактичних заходів супроводу ортодонтичного лікування у пацієнтів з метаболічним синдромом і хронічним генералізованим пародонтитом, в першу чергу необхідно враховувати для прогнозування ускладнень, виникнення та прогресування захворювань тканин пародонта стан маркерів остеогенезу Col1A1 і VDR, ендотеліального фактору VEGF, фактору антиоксидантного захисту PON, а також маркерів метаболізму липопротеїнів APOE, проліферації остеобластів TGF і маркеру реакції кісткових тканин на навантаження NOS.

Ключові слова: генетичні маркери, кістковий метаболізм, ортодонтичне лікування, метаболічний синдром.

С появлением методов диагностики в области молекулярной генетики ортодонтическое лечение может получить совершенно новое направление. Понимание изменений, происходящих на молекулярном и генетическом уровнях под действием ортодонтической силы, определенно открывает новые пути для разработки лучших стратегий диагностики, профилактики и лечения.

При нормальном ремоделировании кости баланс между резорбцией кости (опосредуемой остеокластами) и формированием кости (опосредуемой остеобластами) строго регулируется и поддерживается для обеспечения того, чтобы в зрелой здоровой кости не было никаких существенных изменений в костной массе или механической прочности после каждого цикла ремоделирования. Правильное равновесие контролируется сочетанием образования кости с резорбцией кости, которое включает в себя ряд координированных сигнальных механизмов. Тем не менее, дисбаланс между резорбцией кости и образованием кости может возникать при определенных патологических состояниях, что приводит к аномальному ремоделированию кости и развитию костных нарушений [1].

Метаболический синдром (МС),

сахарный диабет и другая патология могут существенно влиять на процесс ремоделирования костных тканей, который наблюдается при проведении ортодонтического лечения с применением механических или функциональных сил, а также интеграцию имплантатов при ортопедическом лечении. Это связано, в первую очередь, с уменьшением остеобластической активности или усилением апоптоза при этом, повышенной резорбтивной активностью кости [2].

Поэтому изучение состояния генов, связанных с костным метаболизмом, при ортодонтическом перемещении зубов у пациентов с МС представляет научный и практический интерес.

Целью работы было изучение полиморфизма генов, непосредственно или косвенно связанных с костным метаболизмом, у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) на фоне МС, направленных на ортодонтическое лечение зубочелюстных аномалий (ЗЧА).

Материалы и методы

Было обследовано 28 человек с МС и ХГП, направленных на ортодонтическое и ортопедическое лечение. Из них 11 человек было с сахарным диабетом 2

типа.

Выделение ДНК из клеток буккального эпителия проводили по модифицированной методике с Chelex [3]. В эппендорф к аппликатору с соскобом эпителиальных клеток вносили 200 мкл 5% раствора Chelex 100 в стерильной дистиллированной воде (Chelex в натриевой форме, 100-200 меш, Bio-Rad). Инкубировали при 56 °С 30 мин с постоянным перемешиванием на термошейкере. Затем инкубацию проводили при 96 °С в течение 8 мин, периодически встряхивая. После инкубации центрифугировали (на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5424) при 12 000 g 3 мин. Концентрацию и чистоту препарата ДНК определяли на спектрофотометре (Nanophotometr, Implen), отобрав аликвоту 5 мкл непосредственно из пробирки с раствором ДНК. Для ПЦР отбирали 5мкл супернатанта.

Аллельные варианты генов PON1 Gln192Arg, ApoELeu2Pro, VEGFA C634G, TGFT869 C оценивали методом аллель специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Амплификацию исследуемого участка гена проводили параллельно в двух эппендорфах для нормального и мутантного варианта гена в 20 мкл буферного раствора и 100 нм каждого олигонуклеотидного праймера (наборы «SNP-экспресс-ЭФ» НПФ «Литех», Россия), 100-150 нг ДНК. В качестве отрицательного контрольного образца вносили разбавитель в объеме 5 мкл в оба типа реакционной смеси.

Определение олигонуклеотидных полиморфизмов генов VDRT352CrS10735810 и COL1AG1997 Trs1107946 проводили методом ПЦР в реальном времени наборами «SNP-Скрин» (НПК «Синтрол», Россия).

Полиморфизм гена eNos3 4A/4B (делеция 27 пар нуклеотидов) определяли методом ПЦР с соответствующими праймерами (4b-210, 4a-183, 4b/a-210,

183).

Амплификацию проводили на термоциклере CFX96 (Bio-Rad). Условия были следующими: начальная денатурация в течение 5 мин при 94 °С, (20 сек 94 °С, 30 сек 64 °С, 40 сек 72 °С) 35 циклов.

Фракционирование продуктов амплификации проводили в горизонтальном 2% агарозном геле, приготовленном на однократном трис-боратном буфере (1xTBE), при напряжении 100 В в течение 45 минут. Маркер молекулярного веса - ДНК pUC19: Msp1. Агарозный гель окрашивали бромистым этидием и визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

При определении олигонуклеотидных полиморфизмов методом ПЦР в реальном времени отдельно детектировали продукты ПЦР-РВ на двух каналах флуоресценции FAM и HEX. Результаты реакции на двух каналах позволяют одновременно определить присутствие каждого из аллелей исследуемого полиморфизма.

Результаты и их обсуждение

Перечень исследованных генов, связанных с костным метаболизмом, и результаты исследования приведены в таблицах 1-3.

Ген PON1 (параоксоназа 1) является геном, кодирующим белок. Этот ген кодирует член семейства параоксоназ ферментов. После синтеза в почках и печени фермент выделяется в кровеносное русло и связывается с липопротеинами высокой плотности (ЛПВП), отвечает за их антиоксидантные свойства, защищающие от перекисного окисления липидов (ПОЛ), и гидролизует ксенобiotики (2 фаза детоксикации). Заболевания, связанные с PON1, включают микрососудистые осложнения. Полиморфизмы в этом гене связывают с диабетом и ишемической болезнью сердца. Аннотации генной онтологии, связанные с этим геном, включают связывание

Таблица 1

Перечень исследуемых генов

| Название | Ген | Полиморфизм | Тест-система, праймеры | Т °С отжига |
|--|--------|-------------|---|-------------|
| Параоксаназа, кальций-зависимая эстераза | PON1 | Gln192Arg | «SNP-экспресс-ЭФ» НПФ «Литех» | 64 |
| Эндотелиальная синтаза | eNOS3 | 4B/4A | F-CTA TGG TAG TGG CTT GGC TGG AGG R-ACC GCC CAG GGA ACT CCG CT | 60 |
| Аполипопротеин E | ApoE | Leu28Pro | «SNP-экспресс-ЭФ» НПФ «Литех» | 64 |
| Эндотелиальный фактор роста сосудов | VEGF A | C634G | «SNP-экспресс-ЭФ» НПФ «Литех» | 64 |
| Трансформирующий фактор роста | TGF | T869C | «SNP-экспресс-ЭФ» НПФ «Литех» | 64 |
| Рецептор витамина D | VDR | | «SNP-Скрин» НПФ «Синтол» | 68 |
| Коллаген 1 типа альфа | COL1A1 | | «SNP-Скрин» НПФ «Синтол» | 68 |

Таблица 2

Нарушения в генах, связанных с костным метаболизмом, у пациентов с зубочелюстными аномалиями на фоне метаболического синдрома и хронического генерализованного пародонтита

| № | PON Gly192Arg | | | APOE Leu28Pro | | | NOS 4b/4a | | |
|--------|---------------|---------|----------|---------------|----------|---|-----------|-------|-------|
| | н | г | м | н | г | м | н | г | м |
| 1 | | | Arg /Arg | Leu28 Leu | Leu28Pro | | | 4b/4a | 4a/4a |
| 2 | | Gly/Arg | | Leu28 Leu | | | | 4b/4a | |
| 3 | | | Arg /Arg | Leu28 Leu | | | | 4b/4a | |
| 4 | | Gly/Arg | | Leu28 Leu | | | | 4b/4a | |
| 5 | | Gly/Arg | | | Leu28Pro | | 4b/4b | | |
| 6 | | Gly/Arg | | | Leu28Pro | | | | 4a/4a |
| 7 | | Gly/Arg | | | Leu28Pro | | 4b/4b | | |
| 8 | | | Arg /Arg | | Leu28Pro | | | | 4a/4a |
| 9 | | Gly/Arg | | Leu28 Leu | | | 4b/4b | | |
| 10 | | Gly/Arg | | | Leu28Pro | | | 4b/4a | |
| 11 | | | Arg /Arg | Leu28 Leu | | | | 4b/4a | |
| 12 | | Gly/Arg | | | Leu28Pro | | 4b/4b | | |
| 13 | | | Arg /Arg | Leu28 Leu | | | | 4b/4a | |
| 14 | | | Arg /Arg | | Leu28Pro | | 4b/4b | | |
| 15 | | | Arg /Arg | | Leu28Pro | | 4b/4b | | |
| 16 | | | Arg /Arg | | Leu28Pro | | 4b/4b | | |
| 17 | | | Arg /Arg | | Leu28Pro | | 4b/4b | | |
| 18 | | Gly/Arg | | | Leu28Pro | | 4b/4b | | |
| 19 | | | Arg /Arg | Leu28 Leu | | | | | 4a/4a |
| 20 | | | Arg /Arg | Leu28 Leu | | | 4b/4b | | |
| 21 | | Gly/Arg | | | Leu28Pro | | 4b/4b | | |
| 22 | | Gly/Arg | | | Leu28Pro | | 4b/4b | | |
| 23 | | Gly/Arg | | Leu28 Leu | | | 4b/4b | | |
| 24 | | Gly/Arg | | Leu28 Leu | | | | 4b/4a | |
| 25 | | Gly/Arg | | Leu28 Leu | | | 4b/4b | | |
| 26 | | Gly/Arg | | | Leu28Pro | | 4b/4b | | |
| 27 | | Gly/Arg | | | Leu28Pro | | | 4b/4a | |
| 28 | Gly/Gly | | | Leu28 Leu | | | 4b/4b | | |
| Кол-во | 1 | 16 | 11 | 12 | 16 | | 16 | 8 | 4 |
| % | 3,6 | 57,1 | 39,3 | 42,9 | 57,1 | | 57,1 | 28,6 | 14,3 |

Примечание: н – норма, г – гетерозигота, м – мутация.

ионов кальция и связывание фосфолипидов [4]. В наших исследованиях при наличии у пациентов ЗЧА, МС и ХГП нарушения в гене PON1 составляли 96,4 % случаев (57,1 % – гетерозиготы, 39,3 % – мутации) (табл. 2).

Ген APOE (аполипопротеин E) представляет собой белок, кодирующий ген. Этот белок связывается со специфическим рецептором печени и периферических клеток и необходим для нормального метаболизма компонентов, богатых триглицеридами, липопротеинов. Среди связанных с ним путей – путь сепатинов. Мутации в этом гене приводят к гиперлиппротеинемии типа III, при которой отмечается повышенный уровень холестерина и триглицеридов в плазме крови [5]. В гене APOE, отвечающем за метаболизм липопротеинов и первичную регенерацию костных тканей отклонения от нормы в нашем случае составляли 57,1 % (гетерозиготы) (табл. 2).

Эндотелиальный ген NOS₃ (e-NOS)

представляет собой белок, кодирующий ген, связанный с активностью оксидоредуктазы и связыванием ионов железа, восприимчивости к коронарному спазму, регулирует реакцию костей на нагрузку [6]. В гене NOS₃ в 42,9 % случаев мы отмечали

Таблица 3

Нарушения в генах костного метаболизма у пациентов с зубочелюстными аномалиями на фоне метаболического синдрома и хронического генерализованного пародонтита

| № | VEGF C634G | | | TGF T869C | | | COL1A1 Rs 1107949 | | | VDR T35C | | |
|--------|------------|------|------|-----------|------|-----|-------------------|----|---|----------|----|-----|
| | н | г | м | н | г | м | н | г | м | н | г | м |
| 1 | | | G/G | T/T | | | C/C | | | | | C/C |
| 2 | | | G/G | T/T | | | C/C | | | | | C/C |
| 3 | | | C/G | T/T | | | C/C | | | | | T/C |
| 4 | | | C/G | | | | T/C | | | C/A | | T/T |
| 5 | | | C/G | | | | T/T | | | C/C | | T/C |
| 6 | | | C/G | | | | T/T | | | C/A | | T/T |
| 7 | | | G/G | T/T | | | C/C | | | | | T/C |
| 8 | | | G/G | | | | T/C | | | C/A | | T/C |
| 9 | | | C/G | | | | T/C | | | C/C | | T/T |
| 10 | | | G/G | | | | T/C | | | C/A | | T/C |
| 11 | | | G/G | | | | T/C | | | C/A | | C/C |
| 12 | | | C/G | | | | T/T | | | C/A | | T/C |
| 13 | | | C/G | | | | T/T | | | C/C | | C/C |
| 14 | | | C/G | | | | T/C | | | C/A | | T/T |
| 15 | | | C/G | | | | T/C | | | C/A | | T/C |
| 16 | | | C/G | | | | T/C | | | C/A | | C/C |
| 17 | | | G/G | T/T | | | C/C | | | | | T/C |
| 18 | | | C/G | | | | T/C | | | C/C | | T/T |
| 19 | | | G/G | | | | C/C | | | C/C | | T/T |
| 20 | | | C/G | | | | T/T | | | C/C | | C/C |
| 21 | | | C/G | | | | T/C | | | C/C | | T/C |
| 22 | | | C/G | | | | T/C | | | C/C | | T/T |
| 23 | | | C/G | | | | T/C | | | C/C | | T/C |
| 24 | | | C/G | | | | T/T | | | C/C | | T/C |
| 25 | | | C/G | | | | T/T | | | C/C | | T/C |
| 26 | | | C/G | | | | T/T | | | C/C | | T/C |
| 27 | | | C/G | | | | T/T | | | C/A | | T/C |
| 28 | C/C | | | | | | T/C | | | C/A | | C/C |
| Кол-во | 1 | 19 | 8 | 14 | 13 | 1 | 17 | 11 | | 7 | 14 | 7 |
| % | 3,6 | 67,9 | 28,6 | 50 | 46,4 | 3,6 | 68 | 32 | | 25 | 50 | 25 |

Примечание: н – норма, г – гетерозигота, м – мутация.

мутации и гетерозиготы (табл. 2).

Эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) играет ключевую роль в процессе ангиогенеза, а также увеличивает проницаемость сосудов, стимулирует рост эндотелиальных клеток сосудов, ингибирует апоптоз. Аллельные варианты VEGF связаны с микрососудистыми осложнениями при диабете и атеросклерозе [7]. Нарушения в VEGF в нашем исследовании составили 96,5 % (67,9 % – гетерозиготы и 28,6 % – мутации) (табл. 3).

Оценку способности образования кости, что особенно важно в ретенционном периоде ортодонтического лечения, пролиферации остеобластов проводили по гену TGF. Отклонения от нормы отмечались в 50% случаев. TGF – мультипотентный цитокин, являющийся модулятором клеточного роста, воспаления [8]. Ингибирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, оказывает ин-

гибирующее действие на иммунную систему, подавляя провоспалительный цитокиновый ответ. Изучение продукции ростового фактора может быть использовано для оценки динамики течения заболеваний.

Гены Col1A1 и VDR отвечают за прогноз осложненный при ортодонтическом лечении, возникновение и прогрессирование пародонтита, ускорение перемещения зубов, определяют массу и скорость изменения плотности костных тканей. Ген Col1A1

кодирует про-альфа 1 цепи коллагена типа I – это коллаген, образующий фибриллы, который содержится в большинстве соединительных тканей и в избытке содержится в кости и сухожилиях. Заболевания, связанные с Col1A1 включают несовершенный остеогенез. В нашем случае нарушения в генах коллагенообразования кости составили 32 %. Ген VDR кодирует рецептор витамина D3. Мишени для рецептора витамина D3 главным образом участвуют в метаболизме минералов и регулируют ряд других метаболических путей, участвующих в иммунном ответе [9]. В гене VDR гетерозиготы и мутации в нашем случае составили 75 % (табл. 3).

Полученные результаты необходимо учитывать для прогнозирования возможных осложнений при лечении ЗЧА, а также при разработке лечебно-профилактических мероприятий сопровождения ортодонтического лечения ЗЧА у

пациентов на фоне МС в сочетании с ХГП.

Выводы

При планировании лечения ЗЧА и разработке лечебно-профилактических мероприятий сопровождения ортодонтического лечения у пациентов с метаболическим синдромом (МС), в первую очередь необходимо учитывать для прогнозирования осложнений и возникновения и прогрессирования заболеваний тканей пародонта состоянием маркеров остеогенеза Col1A1 и VDR, эндотелиального фактора VEGF, фактора антиоксидантной защиты PON, маркеров метаболизма липопротеинов АРОЕ, пролиферации остеобластов TGF и маркера реакции костных тканей на нагрузку NOS.

Литература

1. Фліс П.С. Ортодонтія / П. С. Фліс, М. А. Омельчук, Н. В. Ращенко, І. Л. Скрипник, С. І. Тріль. – Вінниця : Нова книга, 2007. – 311 с.
2. Bensch, L., Braem, M., Van Acker, K., Willems. Orthodontic treatment considerations in patients with diabetes mellitus // American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. – 2003. – No. 123(1). – P. 74-78.
3. P. Sean Walsh, David A Metzger, Russell Higuchi. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material // BioTechniques. – 2013. – Vol. 54. – No. 3. – P. 134–139.
4. Rajkovic M, Rumora L, Barisic K. The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans // Biochem Med (Zagreb). – 2011. – № 21(2). – P. 122-130.
5. Liu M, Bian C, Zhang J et al. Apolipoprotein E gene polymorphism and Alzheimer's disease in Chinese population: a meta-analysis // Sci Rep. – 2014. – №4. – P. 4383.
6. Tan SD, Xie R, Klein-Nulend J, et al. Orthodontic force stimulates eNOS and iNOS in rat osteocytes // Journal of Dental Research. – 2009. – №88(3). – P. 255–260.
7. M. Di Domenico, F. D'apuzzo, A Feola, L. Cito, A Monsurri, G. M. Pierantoni, L. Berrino, A De Rosa, A Polimeni, L. Perillo. Cytokines and VEGF Induction in Orthodontic Movement in Animal Models // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2012. – №5. – P. 1-4.

8. Feller L., Kramer B., Lemmer J. A short account of metastatic bone disease // Cancer Cell International. – 2011. – Vol. 11. – P.24.
9. Brown MA, Haughton MA, Grant SF, et al. Genetic control of bone density and turnover: role of the collagen 1alpha1, estrogen receptor, and vitamin D receptor genes // J Bone Miner Res. – 2001. – №16. – P. 758-764.

References

1. Flis P. S., Omelchuk M. A, Rashchenko N. V., Skrypyuk I. L., Tril S. I. *Ortodontiya* [Orthodontics]. – Vinnytsia: Nova knyha. 2007. – 311p.
2. Bensch, L., Braem, M., Van Acker, K., Willems. Orthodontic treatment considerations in patients with diabetes mellitus. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2003;123(1):74-78.
3. P. Sean Walsh, David A Metzger, Russell Higuchi. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. BioTechniques. 2013;54(3):134–139.
4. Rajkovic M, Rumora L, Barisic K. The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. BiochemMed (Zagreb). 2011;21(2):122-130.
5. Liu M, Bian C, Zhang J et al. Apolipoprotein E gene polymorphism and Alzheimer's disease in Chinese population: a meta-analysis. Sci Rep. 2014;4:4383.
6. Tan SD, Xie R, Klein-Nulend J, et al. Orthodontic force stimulates eNOS and iNOS in rat osteocytes. Journal of Dental Research. 2009;88(3):255–260.
7. M. Di Domenico, F. D'apuzzo, A Feola, L. Cito, A Monsurri, G. M. Pierantoni, L. Berrino, A De Rosa, A Polimeni, L. Perillo. Cytokines and VEGF Induction in Orthodontic Movement in Animal Models. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012;5:1-4.
8. Feller L., Kramer B., Lemmer J. A short account of metastatic bone disease. Cancer Cell International. 2011;11:24.
9. Brown MA, Haughton MA, Grant SF, et al. Genetic control of bone density and turnover: role of the collagen 1alpha1, estrogen receptor, and vitamin D receptor genes. J Bone Miner Res. 2001;16:758-764.

Впервые поступила в редакцию 05.12.2019 г.
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования