

Рожко П.Д.,

к. мед. н.,

Одесский национальный медицинский университет

Деньга О.В.,

д. мед. н.,

Вербицкая Т.Г.

к. биол. н.

Государственное учреждение

«Институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии НАМН Украины»

[DOI: 10.24411/2520-6990-2020-12039](https://doi.org/10.24411/2520-6990-2020-12039)**ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ COL1A1 -1997G/T, MMP1-1607INSG, MMP9 A-8202G, TIMP1C536T У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА, НАПРАВЛЕННЫХ НА ДЕНТАЛЬНУЮ ИМПЛАНТАЦИЮ****Rozhko P.D.,**

candidate of medical Sciences

Odessa National Medical University

Denga O.V.,

doctor of medicine

Verbitskaya T.G.

candidate of medical Sciences

State Establishment «The Institute of Stomatology and Maxillo-Facial Surgery National Academy of Medical Science of Ukraine»

STUDY OF COL1A1 -1997G / T, MMP1-1607INSG, MMP9 A-8202G, TIMP1C536T GENES POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH 2 TYPE DIABETES PLANNED FOR DENTAL IMPLANTATION**Аннотация.**

Было проведено изучение генетического полиморфизма генов *Col1A1 -1997G/T*, *MMP1-1607insG*, *MMP9 A-8202G*, *TIMP1C536T* у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, требующих ортопедического лечения с использованием денальных имплантатов. Полученные результаты определили группы «риска». 9 % составляли пациенты с функционально неполноценным аллелем T полиморфизма -1997G/T гена *Col1A1*. Функционально неполноценные аллели генов *MMP1-1607insG* и *MMP9 A-8202G* были выявлены у 31,8% и 54,5% пациентов. Среди обследованных пациентов не было выявлено полиморфизма C536T гена *TIMP-1*. Аллельный полиморфизм генов необходимо учитывать в процессе предимплантационной подготовки пациентов с сахарным диабетом для проведения адекватной терапии.

Abstract

Genetic polymorphism of the *Col1A1 -1997G / T*, *MMP1-1607insG*, *MMP9 A-8202G*, *TIMP1C536T* genes was studied in patients with type 2 diabetes mellitus requiring dental treatment using implantation. Results determined the risk groups. 9% were patients with a functionally defective T allele of -1997G / T polymorphism of the *Col1A1* gene. Functionally defective alleles of the *MMP1-1607insG* and *MMP9 A-8202G* genes were detected in 31.8% and 54.5% of patients. Among the examined patients, no *TIMP-1 C536T* polymorphism was detected. Allelic polymorphism of genes must be taken into account during the preimplantation preparation of patients with diabetes mellitus in order to conduct adequate therapy.

Keywords: molecular genetic studies, diabetes mellitus, dental implantation.**Ключевые слова:** молекулярно-генетические исследования, сахарный диабет, денальная имплантация.

Денальная имплантология в настоящее время является одним из наиболее перспективных направлений стоматологии. Развитие денальной имплантации открывает ряд новых возможностей в ортопедической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Однако, при планировании денальной имплантации необходимо учитывать наличие абсолютных и относительных противопоказаний [1]. В первых рядах среди факторов риска и относительных противопоказаний к оперативным вмешательствам, в том числе к денальной имплантации, стоит сахарный диабет [2]. «Выживаемость» денального имплантата в первую очередь зависит от

его успешной остеоинтеграции. Затем первостепенное значение приобретает процесс адекватного ремоделирования кости. Именно эти процессы обеспечивают долговременную стабильность имплантата.

Ремоделирование представляет собой тонкое равновесие между формированием и деградацией тканей, контролируемое активностью протеолитических ферментов. Анализ влияния сахарного диабета на остеоинтеграцию имплантата выявил изменение процессов ремоделирования кости и недостаточную её минерализацию, что приводит к замедлению процесса остеоинтеграции [3].

Для улучшения клинического результата или разработки целевой терапии у пациентов с сахарным диабетом 2 типа важно понимать молекулярные механизмы, которые приводят к отторжению зубного имплантата.

Генетическую основу предрасположенности к долговечности зубных имплантатов составляют сложные взаимодействия между генами коллагенов, ферментами металлопротеиназ и тканевыми ингибиторами, фенотипические эффекты которых в процессе остеоинтеграции могут реализоваться по-разному у пациентов.

Целью исследования являлось изучение генетического полиморфизма генов Col1A1-1997G/T, MMP1-1607insG, MMP9 A-8202G, TIMP1C536T у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, требующих ортопедического лечения с использованием дентальных имплантатов.

Материалы и методы. Для молекулярно-генетического анализа использовали образцы геномной ДНК пациентов с сахарным диабетом 2 типа, направленных на дентальную имплантацию. *Выделение ДНК из клеток буккального эпителия пациентов проводили по модифицированной методике с Chelex [4].* Аллельные варианты генов коллагена 1 типа COL1A1 -1997G/T, матричных металлопротеиназ MMP1-1607insG, MMP9A-8202G, ингибитора протеиназ TIMP1 C536T оценивали методом аллель специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) (наборы «SNP-экспресс-ЭФ» НПФ «Литех», Россия). Амплификацию проводили на термоциклере CFX96 (Bio-Rad). Ампликоны визуализовали методом электрофореза в 2 %-м агарозном геле.

Результаты их обсуждения. Ген COL1A1 кодирует аминокислотную последовательность

альфа-1-цепь белка коллагена 1 типа. Коллаген 1 типа является основной составной частью органической матрицы костной ткани (90 %) и соединительной ткани (30 %). Он придает механическую прочность и выполняет морфогенетическую функцию, влияя на рост, миграцию и дифференцировку клеток, определяет их секреторную и синтетическую активность.

На образцах ДНК пациентов с СД 2 типа было проведено исследование полиморфизма (-1997G/T) в промоторной области гена коллагена 1 типа COL1A1 (табл.). Установлено, что среди обследованных пациентов по полиморфизму G/T гена COL1A1 преобладают гомозиготы по аллели G (91%). Гомозиготный генотип G/G выявлен у 81,9% пациентов. 18,1% составляют пациенты с гетерозиготным генотипом G/T. Гомозиготный минорный генотип T/T в данной выборке пациентов не присутствует. Увеличение уровня транскрипции гена COL1A1, вызванное полиморфизмом (-1997G/T) регуляторной области, приводит к изменению соотношения альфа 1 и альфа 2 цепей коллагена. Это вызывает дезорганизацию межклеточного матрикса и инициирует процесс прогрессивного снижения минеральной плотности костной ткани [5]. Наиболее выражено это проявляется у гомозиготных носителей минорного генотипа, который среди исследованных пациентов не выявлен. Но даже наличие одной функционально неполноценной аллели T у гетерозигот также приводит, хотя в меньшей степени, к нарушению нормального соотношения субъединиц в молекуле коллагена I типа, что нарушает функции коллагена.

Таблица

Частота встречаемости аллелей и генотипов генов коллагена 1 типа Col1A1 -1997G/T, матричных металлопротеиназ MMP1-1607insG, MMP9A-8202G, ингибитора протеиназ TIMP1 C536T.

Аллель, генотип	COL1A1 -1997G/T, n=11 (%)	Аллель, генотип	MMP1 - 1607insG n=11 (%)	Аллель, генотип	MMP9 A- 202G n=11 (%)	Аллель, генотип	TIMP1 C536T n=11 (%)
G	20(91)	G	15(68,2)	A	10(45,5)	C	22(100)
T	2(9)	2G	7(31,8)	G	12(54,5)	T	0
G/G	9(81,8)	G/G	6(54,5)	A/A	2(18,2)	C/C	11(100)
G/T	2(18,2)	G/2G	3(27,3)	A/G	6(54,5)	C/T	0
T/T	0	2G/2G	2(18,2)	G/G	3(27,3)	T/T	0

У пациентов с сахарным диабетом 2 типа процесс образования костной ткани обычно угнетается. Присутствие глюкозы вызывает образование промежуточных продуктов, содержащих высокореактивные дикарбонилы, что в конечном итоге приводит к необратимому накоплению соединений конечных продуктов позднего гликирования, скопления которых определяют образование дефектных коллагенов и активных форм кислорода, вызывая структурные изменения в кости посредством посттрансляционных модификаций [6, 7].

Риск и степень потери альвеолярной кости положительно коррелирует с отсутствием гликемического контроля. Однако, если лечить гипергликемию и поддерживать уровень глюкозы, близкий к нормальному, то имплантаты будут интегрироваться с большей скоростью в области с преобладанием кортикальной кости [8].

В нашем исследовании молекулярно-генетическое тестирование пациентов с сахарным диабетом 2 типа, требующих ортопедического лечения с использованием дентальных имплантатов, определило группу «риска» с функционально неполноценным аллелем T полиморфизма -1997G/T гена Col1A1.

Среди молекул, вовлеченных в ремоделирование костной ткани, важную роль играют ферменты из группы матриксных металлопротеиназ (MMPs). MMP представляют собой семейство цинк- и кальций-зависимых эндопептидаз, ферментов, которые отвечают за разложение компонентов внеклеточного матрикса, таких как коллаген, протеогликаны, ламинин, эластин и фибронектин. Они играют центральную роль в ремоделировании периодонтальной связки как в физиологических, так и в патологических условиях. Они секретируются в виде зимогенов (про-MMPs), которые активируются различными протеиназами. MMP1-коллагеназа ответственна за деградацию коллагена I, II и III типа, MMP9-желатиназа - за деградацию коллагена IV, V типов, а также эластина, фибронектина, ламинина и денатурированного коллагена (желатина).

Генотипирование обследованных пациентов показало, что функциональные аллели металлопротеиназ MMP1-1607insG и MMP9 A-8202G составляют 68,2% и 45,5% соответственно. Минорный аллель 2G MMP1 выявлен у 31,8% пациентов. Минорный аллель G гена MMP9 представлен у 54,5%. Гомозиготный генотип-2G/2G и гетерозиготный G/2G гена MMP1 составляют 18,2% и 27,3%. 54,5% пациентов имеют функционально полноценный генотип G/G. Функциональный генотип AA -820 гена MMP9 представлен лишь у 18,2% обследованных пациентов. Функционально неполноценные генотипы составляют 27,3% для гомозиготного GG и 54,5% для гетерозиготного варианта AG полиморфизма A-8202G гена MMP9 (табл.1).

Введение гуанина в положение -1607 гена MMP-1 человека создает аллель 2G, который, как показано, увеличивает транскрипционную активность, изменяет минеральную плотность кости и может влиять на процесс остеоинтеграции [9].

Было показано, что аллель 2G (вставка гуанина в положение -1607 в области промотора человеческой матричной металлопротеиназы 1 MMP-1) присутствовал у 50% пациентов с ранней потерей остеоинтегрированных оральных имплантатов, т.е. данный полиморфизм может быть использован в качестве генетического маркера «неудачных» имплантатов [10].

MMP-9 участвует в процессах воспаления, ремоделирования ткани, заживления ран, мобилизации матрикс-связанных факторов роста и пролиферации цитокинов. У больных со сниженной МПК (остеопения или остеопороз) достоверно чаще выявлялся аллель G в полиморфной позиции -1562 гена MMP9 (OR=1,92, p=0,007) [11]. Полиморфизмы в генах MMP в значительной степени связаны с рядом патологий зубов и костей, и их присутствие в периимплантной жидкости может спровоцировать заболевание периимплантата с дальнейшей потерей костной массы. Обычно эти ферменты экспрессируются в очень небольших количествах и их транскрипция регулируется как в положительную, так и в отрицательную сторону гормонами, цитокинами и факторами роста. Регуляция активности MMP очень важна в процессах ремоделирования ткани и при воспалении.

В условиях избытка глюкозы эндотелиальные клетки и макрофаги человека вырабатывают большее количество MMP [12]. Было показано, что сывороточные уровни MMP1 диабетических пациентов достоверно выше, чем у индивидуумов с нормальным метаболизмом глюкозы. Анализ распределения генотипов у диабетических пациентов выявил ассоциированность генотипа 2G2G с высоким уровнем MMP1 [13], что приводит к усиленной деградации фибриллярного коллагена.

Гиперпродукция MMP-9 на фоне сахарного диабета 2 была установлена у больных с хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) [14]. Воспаление оказывает критическое влияние на остеоинтеграцию и успех имплантации. Высокий уровень MMP-9 в раневой жидкости свидетельствует о воспалении и является маркером плохого заживления ран при сахарном диабете [15].

Регуляция активности ферментов на посттрансляционном уровне осуществляется группой эндогенных белков, называемых тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (TIMP) [16]. TIMP-1 играет роль в регуляции активных форм MMP-1, MMP-3 и MMP-9 благодаря способности образовывать комплекс с про-MMP-9, блокируя активацию фермента.

Среди обследованных пациентов с сахарным диабетом 2 типа не было выявлено полиморфизма C536T гена TIMP-1. По данным литературы частота полиморфизма C536T гена TIMP-1 незначительна.

На целостность соединительных тканей, окружающих зубные имплантаты, влияет баланс между MMP и TIMP1. TIMP1 конститутивно экспрессируется на низком уровне во многих тканях, но в условиях воспаления и повреждения тканей экспрессия TIMP-1 обычно увеличивается по сравнению со здоровой тканью. В работе [17] была исследована

концентрация TIMP-1 в десневой кревикулярной (щелевой) жидкости у больных с СД 2 типа. Концентрация TIMP-1 у пациентов с СД были сходны с аналогичными показателями у пациентов с гингивитом / хроническим генерализованным пародонтитом без СД, поэтому было сделано предположение, что СД не оказывает существенного влияния на концентрацию TIMP-1 в десневой кревикулярной жидкости.

Наличие генетического полиморфизма определяет предрасположенность к увеличению транскрипционной активности ферментов, изменению минеральной плотности кости, развитию воспалительных осложнений, усугубляющиеся наличием сахарного диабета, что может повлиять на процесс остеointegrации.

Выводы. Молекулярно-генетическое тестирование полиморфизма генов Col1A1 -1997G/T, MMP1-1607insG, MMP9 A-8202G, TIMP1C536T пациентов с сахарным диабетом 2 типа, требующих ортопедического лечения с использованием дентальных имплантатов определило группы «риска»;

- 9% составляют пациенты с функционально неполноценным аллелем T полиморфизма -1997G/T гена Col1A1;
- Функционально неполноценные аллели генов MMP1-1607insG и MMP9 A-8202G выявлены у 31,8% и 54,5% пациентов соответственно. Среди обследованных пациентов с сахарным диабетом 2 типа не выявлено полиморфизма C536T гена TIMP-1;

- Аллельный полиморфизм генов необходимо учитывать в процессе предимплантационной подготовки пациентов с сахарным диабетом для проведения адекватной терапии.

Список литературы

1. Тунева Н.А., Богачева Н.В., Тунева Ю.О. Проблемы дентальной имплантации // Вятский медицинский вестник. – 2019. – №2(62). – С. 86-93.
2. Никитин В.С., Капитонова О.П., Антонова И.Н. Особенности дентальной имплантации у пациентов с сахарным диабетом // Трансляционная медицина. – 2015. – №2(6). – С. 25–31.
3. Кузнецов С.В. Дентальная имплантация у пациентов с соматической патологией: автореф. дис. на соискание ученой степени к. мед. н.: спец. 14.01.22 «Стоматология» / С.В. Кузнецов. – Москва, 2009 – 26с.
4. 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.
5. Базилевская Е.М., Якубова И.Ш., Топанова А.А. Оценка генетической предрасположенности молодых жителей г. Санкт-Петербурга к заболеванию, связанным с нарушением обмена кальция // Клинические и экспериментальные исследования. – 2014. – №3(52). – С. 96-101.

6. Napoli N. The alliance of mesenchymal stem cells, bone, and diabetes / N. Napoli, R. Strollo, A. Paladini, S.I. Briganti, P. Pozzilli, S. Epstein // Int J Endocrinol. – 2014;2014:690783. doi:10.1155/2014/690783.]

7. Strollo R. HLA-dependent autoantibodies against post-translationally modified collagen type II in type 1 diabetes mellitus / R. Strollo, P. Rizzo, M. Spolemini, R. Landy, C. Hughes, F. Ponchel, N. Napoli, A. Palermo, R. Buzzetti, P. Pozzilli, A. Nissim // Diabetologia. – 2013. – 56(3). – P. 563–572. doi: 10.1007/s00125-012-2780-1.

8. Pavya G, Babu N. A. Effect of Diabetes in Osseointegration of Dental Implant - A Review // Biomed Pharmacol J. – 2015. – №8 (October Spl Edition). Available from: <http://biomedpharmajournal.org/?p=3593>

9. Yamada Y. Association of a poly-morphism of the matrix metalloproteinase-1 gene with boneminer density / Y. Yamada, F. Ando, N. Niino, H. Shimokata // Matrix Biology. – 2002. – №21. – С. 389–392.

10. Shilin HE1; Peng XU; Shi BAI. The relationship between MMP-1 genetic polymorphisms and dental implant early failure in Chinese Han nationality Chongqing Medicine. – 2017. – №46(5). – P. 635-637.

11. Фазуллини О.Н., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Коненков В.И. Ассоциации полиморфизмов генов цитокинов и матриксных металлопротеиназ с минеральной плотностью костной ткани у женщин в постменопаузе с сахарным диабетом 2 типа // Сахарный диабет. – 2018. – №21(1). – С.26-33.

12. Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. Diabetic Medicine. – 2006. – №23(6). – P. 594–608.

13. Drzewoski J, Sliwińska A, Przybyłowska K, et al. Gene polymorphisms and antigen levels of matrix metalloproteinase-1 in type 2 diabetes mellitus coexisting with coronary heart disease // Kardiologia Pol. – 2008. – V.66(10). –P. 1042-1049.

14. Голицына А.А., Югай Ю.В., Чагина Е.А., Первов Ю.Ю., Романчук А.Л. Сравнительный анализ системы металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов при пародонтите у пациентов с сахарным диабетом II типа // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т.12(3). – С. 247-254.

15. Liu Y, Min D, Bolton T, Nubé V, Twigg SM, Yue DK, et al. Increased Matrix Metalloproteinase-9 Predicts Poor Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers. Diabetes Care. – 2009. – №32(1). – P. 117–119.

16. Visse R. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry / R. Visse, H. Nagase // Circulation Res. – 2003. – N 2. – P. 827–839.

17. Kardeşler L. Crevicular fluid matrix metalloproteinase-8,-13, and TIMP1 levels in type 2 diabetics / L. Kardeşler, B. Biyikoğlu, S. Cetinkalp, M. Pitkala, T. Sorsa, N. Buduneli // Oral. Dis. — 2010. – Vol. 16 (5). – P. 476–481.