

© ГОРБУНОВА И.Л., ВИШНЯГОВА Н.А.

**ВЛИЯНИЕ ПРОДУКЦИИ TNF- α НА ПОКАЗАТЕЛИ ТКАНЕВОЙ
РЕЗИСТЕНТНОСТИ ПОЛОСТИ РТА
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОМ ПАРОДОНТИТЕ**

И.Л. Горбунова Н.А. Вишнягова

Омская государственная медицинская академия, ректор – д.м.н., проф.

А.И. Новиков.

Резюме. В работе исследованы полиморфизмы гена цитокина TNF- α (A/A, G/A, G/G) при G(-308) \rightarrow A, регулирующего реакцию воспаления. Показана индивидуальная изменчивость показателей цитокина TNF- α , которая проявляется широким диапазоном колебаний в выборке. Установлены ассоциации полиморфизма гена TNF- α при G(-308) \rightarrow A с клиническими показателями, иллюстрирующими процесс воспаления в тканях пародонта – РМА и индекс кровоточивости SBI.

Ключевые слова: пародонтит, цитокины.

Горбунова Ирина Леонидовна – д.м.н., ассистент кафедры терапевтической стоматологии Омская государственная медицинская академия; e-mail: igorbunova2003@mail.ru.

Вишнягова Наталья Александровна – врач стоматолог-терапевт ООО «Стоматологическая клиника «Гармония»; e-mail: vish-omsk@mail.ru.

Несмотря на более чем столетнюю историю изучения вопросов этиологии, патогенеза, клиники, лечения и профилактики хронического

генерализованного пародонтита, его распространённость остаётся высокой и не имеет тенденции к снижению [1,2,9]. Согласно данным ВОЗ (2000г.), очень высока потеря зубов, связанная именно с этой патологией, особенно в возрасте после 40 лет, а в некоторых странах – после 30 [9]. Кроме того, для заболеваний пародонта, характерна латентная инфекция, которая очень часто приводит к явлениям интоксикации и аллергизации. Отмечено, что наибольшая частота этого заболевания регистрируется в высокоразвитых странах [13]. Это обусловлено не только социальными и экономическими факторами, но и генетическим, и иммунологическим статусом больных, определяющих их предрасположенность к стоматологической патологии воспалительного характера. В этой связи разработка и научное обоснование новых подходов к диагностике, прогнозированию и своевременной профилактике пародонтита продолжают оставаться актуальными. Вместе с тем, следует признать, что до настоящего времени назначение профилактических и лечебных мероприятий проводится без учёта индивидуальных особенностей органов и тканей полости рта, обуславливающих различную степень реализации патологии. По нашему мнению первичная диагностика пародонтита должна осуществляться на основе оценки факторов риска, определяющих вероятность возникновения этих заболеваний.

Роль микрофлоры в инициации пародонтита очевидна и многократно подтверждена. В полости рта человека содержится большое количество различных видов бактерий. Оральная бактериальная флора образует довольно сложную и стабильную экосистему, которая зависит от конкретных физиологических особенностей организма хозяина в целом и полости рта, в частности. При всём многообразии теорий пародонтита современный уровень знаний патогенеза определяет в качестве доминирующей воспалительную концепцию, как результат взаимодействия «инфект-хозяин» [3,4]. Ключевыми молекулами воспаления являются цитокины [7,11]. Среди медиаторов воспаления цитокинам отводится особая роль, так как они

участвуют в формировании и регуляции защитных реакций организма [7]. Продукция цитокинов закреплена генетически [8]. Фактор некроза опухолей α (TNF- α) играет важную роль в развитии воспалительного ответа: инициирует синтез IL-1, IL-6, служит хемоаттрактантом для нейтрофильных гранулоцитов, активирует макрофаги, а также стимулирует пролиферацию Т- и В-лимфоцитов. TNF- α вовлечён в патогенез большинства инфекционных заболеваний и иммунопатологических процессов, где он может выполнять различные функции, главным образом, выступая в качестве медиатора врождённого иммунитета. Однако, повышенная продукция TNF- α может быть причиной осложнений течения хронических воспалительных заболеваний [8].

Молекулярно-генетическим исследованиям в стоматологии в прошлом уделялось мало внимания, в связи с чем, многие важные вопросы ранней диагностики пародонтита остаются нерешёнными. Прогресс в их изучении явится существенной предпосылкой для разработки и обоснования методов ранней диагностики заболевания на доклиническом этапе и обоснования звеньев патогенетической терапии.

Целью настоящего исследования явилось выяснение перспективности клинической оценки полиморфизма продукции цитокина TNF- α (A/A, G/A, G/G) при G(-308)→A в качестве генетического маркера тканевой резистентности полости рта.

Материалы и методы

Для реализации цели исследования 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 Росздрава». Распределение обследуемых по возрастным группам осуществлялось согласно Международной статистической классификации возрастов человека, рекомендованной Европейским региональным бюро Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) для международных

сравнений 10-го пересмотра по распределению обследуемого контингента в медико-биологических исследованиях [5].

В проспективном исследовании была сформирована исследовательская когорта из 289 человек европеоидной расы в возрасте от 25 до 50 лет, из которых 148 мужчин и 141 женщина, средний возраст – $39 \pm 1,2$ лет. Предварительно у всех было получено письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании. У 194 обследованных отмечались клинические признаки хронического генерализованного пародонтита средней степени тяжести (100 мужчин и 94 женщины). Отсутствие клинических признаков воспаления в тканях пародонта имели 95 человек (48 мужчин и 47 женщин). Эти пациенты составляли группу сравнения. Критериями исключения являлись: пациенты с клиническими и лабораторными признаками наличия острого воспалительного процесса; лица, имеющие на момент обследования хронические соматические заболевания в стадии обострения; 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.

Следуя принципам медицины, основанной на доказательствах, определение минимально допустимого размера выборки рассчитывалось по формуле Лера относительно основных переменных интереса [10]. Основными переменными интереса являлись показатели РМА по E. Schour и J. Massler в модификации Parma C. (папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс) [2] и SBI по методике H.R. Mühlemann S.Son (индекс индуцированной кровоточивости десны) [2].

За клинически значимый результат принималось повышение показателя SBI минимум на 2 балла (то есть, 2 балла от 4 баллов – 50%, или 0,5). Основанием для данного утверждения явилось то, что в период ремиссии заболевания снижение показателя SBI на 2 балла соответствует объективной,

клинически значимой положительной динамике (уменьшение отёка, гиперемии десны).

За клинически значимый результат при оценке индекса РМА принималось снижение значений показателя индекса РМА минимум на 1 балл (то есть, 1 балл от 3 баллов – 33,3%, или 0,33). Основанием для данного утверждения являлось то, что при интерпретации индекса РМА за один балл принято воспаление одной из зон десны, таким образом, снижение показателя данного индекса на 1 балл свидетельствует об устранении воспаления целой зоны десны (соответственно, папиллярной, маргинальной или альвеолярной).

Расчёт стандартизованной разности для SBI [12]:

$$\frac{p_1 - p_2}{\sqrt{p(1-p)}} = \frac{0,5}{\sqrt{0,5(1-0,5)}} = 1$$

Расчёт стандартизованной разности для индекса РМА [12]:

$$\frac{p_1 - p_2}{\sqrt{p(1-p)}} = \frac{0,33}{\sqrt{0,33(1-0,33)}} \approx 0,7$$

где p_1 – ожидаемое значение первичной переменной интереса при хроническом генерализованном пародонтите в стадии обострения;

p_2 – ожидаемое значение переменной интереса при хроническом генерализованном пародонтите в стадии ремиссии, выраженное в процентах или долях от единицы;

$p_1 - p_2$ – наименьшая разность в долях «успеха» в двух группах, которая клинически важна.

Чтобы рассчитать объём выборки для принимаемой мощности 90% и двустороннего уровня значимости в 0,05 использовали формулу Лера:

(стандартизованная разность)²

Для SBI

$$\frac{2}{0} = \frac{2}{1}$$

Для PMA

$$\frac{2}{0} \approx \frac{4}{1},7^2$$

[12].

Таким образом, исходя из наибольшего, из требуемых разделов выборки, необходимо наличие 41 человека (исходя из индекса PMA), чтобы иметь 91%-ный шанс обнаружения значимой разницы в обострении и вне обострения хронического генерализованного пародонтита при 5% уровне значимости.

Для изучения тканевой резистентности полости рта было проведено клинико-лабораторное исследование ротовой жидкости обследуемых лиц. В надосадочной части ротовой жидкости измеряли кальций и фосфор. Из полученных данных по кальцию и фосфору рассчитывался кальций-фосфорный молярный коэффициент (Ca/P), который определялся соотношением количеств этих минеральных компонентов в надосадочной жидкости. Потенциометрически определяли pH, K⁺, Na⁺, Ca²⁺. Определение белка в ротовой жидкости проводилось методом с использованием биуретовой реакции.

Произведение растворимости гидроксиапатита (ГА) – минерализующий потенциал – в надосадочной жидкости высчитывалось по формуле:



Осадок ротовой жидкости выделялся центрифугированием. Его количество определялось весовым методом и пересчитывалось на 1000 мл ротовой жидкости. Утилизирующая способность осадка ротовой жидкости определялась по степени изменения рН в процессе инкубации с 0,28М раствором глюкозы при температуре 37°C в течение 3 часов. Деминерализующая активность осадка ротовой жидкости оценивалась нами по количеству Са, извлечённого осадком из эмали интактного человеческого зуба.

Популяционные частоты аллельных вариантов вычисляли на основе наблюдаемых частот генотипов. Оценку соответствия частот генотипов равновесию Хайди-Вайнберга проводили с использованием критерия χ^2 с помощью компьютерной программы SPSS.

Вторичную структуру РНК оценивали с помощью компьютерной программы «Алгоритмы, термодинамика и базы данных для анализа вторичной структуры РНК на сетевом сервере» [14].

Результаты и обсуждение

При генотипировании по TNF- α гену в позиции -308 у обследуемых были обнаружены все возможные вариации аллелей (A/A; G/A; G/G). При этом у больных пародонтитом отсутствовал полиморфизм G/G (гомозигота по мутантному аллелю). По всей видимости, отсутствие этого полиморфизма предопределяет подверженность тканей пародонта и способствует развитию воспаления при воздействии равных экзо- и эндогенных факторов. В группе больных хроническим пародонтитом было установлено, что частоты изученных аллелей промоторного участка гена различаются по подгруппам и отмечается статистически значимое ($p < 0,01$) влияние данных полиморфизмов на степень тяжести пародонтита. Наблюдается тенденция к увеличению частоты А- аллеля промотора -308 гена TNF- α , однако статистически значимой разницы в распределении генотипов между основной группой и группой сравнения не обнаружено (рис.1).

При сравнении по критерию χ^2 частотного распределения аллелей и генотипов TNF- α по трём полиморфизмам (A/A; A/G; G/G) у больных пародонтитом с учётом фактора возраста, мы не выявили значимых различий.

Кроме того, нами были изучены возможные ассоциации генотипов и аллелей гена TNF- α по исследуемым полиморфизмам с некоторыми показателями, характеризующими состояние тканевой резистентности полости рта. У больных пародонтитом (как мужчин, так и женщин), гомозиготных по дикому аллелю (A/A), нам удалось выявить статистически значимые положительные корреляции по критерию Spearman между следующими показателями: SBI и деминерализующая активность осадка ротовой жидкости; SBI и утилизирующая способность осадка ротовой жидкости; PMA и активной концентрацией кальция в ротовой жидкости. Помимо этого в группе женщин, с генотипом A/A, отмечалась сильная положительная корреляционная связь между количеством белка в ротовой жидкости и индексом PMA (табл.1).

В то же время, у мужчин больных пародонтитом с генотипом A/G полиморфизма гена TNF- α сильная положительная корреляционная связь была установлена между показателями SBI и концентрацией фосфора в ротовой жидкости; PMA и произведением растворимости гидроксиапатита. У женщин больных пародонтитом с генотипом A/G установлена сильная положительная корреляционная связь между показателями PMA и скоростью секреции слюны, а также активными концентрациями кальция и гидрофосфата в ротовой жидкости (табл.2).

Индивидуальная восприимчивость к инфекции при пародонтите определяется факторами окружающей среды – тканевой резистентностью полости рта, которая контролируется генами, регулирующими реакцию воспаления. Различия в генах, контролирующих защитные реакции организма, могут определять различный характер воспалительного ответа и специфических иммунологических реакций при внедрении патогенов. В

первую очередь это касается генов регуляторных молекул, обеспечивающих начальные этапы развития воспалительной реакции: распознавание патогена, проведение внутриклеточного активационного сигнала и синтез медиаторов развития воспалительной реакции.

В настоящем исследовании установлено, что характер течения заболевания можно определять с помощью установления ассоциаций между полиморфизмами гена провоспалительного цитокина TNF- α с клиническими и лабораторными факторами тканевой резистентности полости рта, являющихся маркерами возможного патологического процесса в пародонте.

Полученные статистически значимые данные о наличии ассоциаций между продукцией цитокина TNF- α (A/A, G/A, G/G) при G(-308) \rightarrow A и показателями, характеризующими наличие воспалительного процесса в тканях пародонтита позволили установить, что значения индексов РМА и SBI различаются в зависимости от частот изученных аллелей промоторного участка гена, отмечается статистически значимое ($p=0,001$) влияние данных полиморфизмов на степень тяжести пародонтита.

INFLUENCE OF TNF- A PRODUCTION ON TISSUE RESISTANCE IN ORAL CAVITY AT CHRONIC GENERALIZED PARADONTITIS

I.L. Gorbunova, N.A. Vishniakova

Omsk State Medical Academy

Abstract. We examined polymorphism of cytokine gene TNF- α (A/A, G/A, G/G) in G(308) \rightarrow A which regulates inflammatory reaction. The individual variability of cytokine TNF- α was shown. There was determined a relation between polymorphism gene TNF- α in G(-308) \rightarrow A and clinical indicators showing inflammatory process in the paradontic tissue – RMA and SBI bleeding indexes.

Key words: paradontitis, cytokines

Литература

1. Грудянов А.И. Пародонтология. Избранные лекции. – М., 1997. – 32 с.
2. Иванов В.С. Заболевания пародонта. – М., 1998. – 294с.
3. Канкян А.П., Леонтьев В.К. Болезни пародонта (новые подходы в этиологии, патогенезе, диагностике, профилактике и лечении. – Ереван, 1998. – 358 с.
4. Логинова Н.К., Воложин А.И. Патопфизиология пародонта. – М., 1993. – 80с.
5. Международная классификация стоматологических болезней на основе МКБ-10. – 3-е изд. – Женева: ВОЗ, 1997. – 247с.
6. Рыдловская А.В., Симбирцев А.С. Функциональный полиморфизм гена TNF- α и патология // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т.4, №3. – С. 4-10.
7. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т.3, №2. – С. 16-22.
8. Симбирцев А.С., Громова А.Ю. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т.4, № 1. – С. 3-10.
9. Стоматологическая заболеваемость населения России / Под ред. Э.М. Кузьминой. – М.: Информэлектро, 1999. – 228 с.
10. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины // Пер с англ. – М., 1998. – 352 с.
11. Хитров Н.К. Медиаторы воспаления // Воспаление. – М. – 1995. – 225с.
12. Шустер Д.И. Динамика клинических и морфологических признаков воспаления десны на этапах лечения больных гингивитом

и пародонтизом: автореф. дис. ... канд. мед.наук. – Омск, 2006. - 15с.

13. Melsen B. Dentistry and science in 21st century: Developing new paradigms / B. Melsen // Dentistry in 21st century : a Global perspective : Proceeding of the International Symposium on dentistry in the 21st century. – Chicago ; London ; Berlin, 1991. – P. 115-120.

14. [http:// bioinfo.math.rpi.edu/~zukerm/rna](http://bioinfo.math.rpi.edu/~zukerm/rna)