

УДК 616.314.17-008-092:616.12:616.24:575.174.019.3

Зв'язок поліморфізму G894T гена eNOS із розвитком патології пародонта у хворих з бронхокардіальними захворюваннями

Мета роботи — встановлення можливого асоціативного зв'язку поліморфізму G894T гена eNOS із ризиком розвитку патології в пародонті пацієнтів на тлі хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) та ішемічної хвороби серця (ІХС).

Матеріали та методи. Було обстежено 171 хворого (115 пацієнтів з ХОЗЛ у поєднанні з ІХС, 29 пацієнтів з ІХС, 27 хворих на ХОЗЛ) та 20 соматично здорових осіб. Методи дослідження: клінічний стоматологічний, полімеразна ланцюгова реакція.

Результати та обговорення. Виявлено, що серед хворих з пародонтитом переважали носії генотипів G894T та T894T ($p_2 = 0,0001$). Гетерозиготний генотип G894T мали 75,9 % хворих з пародонтитом та 36,8 % осіб контрольної групи без нього, а гомозиготний генотип T894T виявлявся у 12,7 % хворих та 5,3 % осіб контрольної групи. Це вказує на те, що пацієнти з коморбідною патологією, що є носіями генотипу GG, мають підвищений ризик розвитку атрофічних змін у тканинах пародонта, тоді як генотип TT асоціюється з розвитком запальних процесів у тій же категорії суб'єктів.

Висновки. У розвитку патології тканин пародонта пацієнтів з кардіопульмональною патологією певне значення може мати наявність поліморфізму G894T гена eNOS, що стає прогностично важливою ознакою у формуванні групи ризику.

Ключові слова:

поліморфізм гена eNOS, хронічне обструктивне захворювання легень, ішемічна хвороба серця, пародонт.

За сучасними уявленнями, патологічні зміни в тканинах пародонту мають мультифакторну природу, що пов'язано з впливом на них як зовнішніх, так і внутрішніх факторів, зокрема генетичних [4]. Більш ніж половина пацієнтів, що звертаються за пародонтологічною допомогою, мають захворювання внутрішніх органів, що підтверджує наявність патогенетичних взаємозв'язків між станом пародонту і соматичним статусом організму [8]. Існують низка робіт, що доводять безпосередній зв'язок патологічних змін у тканинах ясен з такими патологіями, як хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) та ішемічна хвороба серця (ІХС), що пов'язано з їх функційною єдністю [5, 7].

Оскільки основними ланками патогенезу ХОЗЛ, ІХС і хронічного генералізованого пародонтиту є гіпоксія, порушення метаболізму оксиду азоту й ендотеліальна дисфункція, а також поліморфізм генів може робити загальний внесок у відносний ризик сприйнятливості і тяжкості захворювання, стає актуальним вивчення поліморфізму гена ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS) [1].

Мета роботи — встановлення можливого асоціативного зв'язку поліморфізму G894T гена eNOS із ризиком розвитку патології в пародонті пацієнтів на тлі ХОЗЛ та ІХС.

ISSN 1605-7295 (Print)
ISSN 2522-1175 (Online)

**Н.Ю. Ємельянова,
В.Ю. Гальчинська,
Т.М. Бондар**

ДУ «Національний інститут терапії імені Л.Т. Малої НАМН України», Харків

КОНТАКТНА ІНФОРМАЦІЯ

Ємельянова Наталія Юрівна
к. мед. н., ст. наук. співр. відділу комплексного зниження ризику хронічних неінфекційних захворювань

61039, м. Харків, просп. Л. Малої, 2А
Тел. (098) 834-24-29
E-mail: natadenta@gmail.com

Стаття надійшла до редакції
4 вересня 2018 р.

Таблиця 1. Частота алелів та генотипів поліморфізму G894T гена eNOS у групі обстежених хворих (об'єднана група) та групі контролю

Алель та генотип	Обстежені хворі (n = 171)	Група контролю (n = 20)	χ^2	p_{χ^2}	OR	95 % CI
Розподіл алелів та генотипів поліморфізму G894T гена eNOS						
<i>Мультиплікативна модель</i>						
G894	0,5	0,75	8,97	0,003	0,33	0,16—0,70
T894	0,5	0,25				
<i>Загальна модель</i>						
G894G	0,147	0,550	19,05	0,0007	0,14	0,05—0,38
G894T	0,706	0,400				
T894T	0,147	0,050				
<i>Аддитивна модель (тест Кохрана—Армітаджа)</i>						
G894G	0,147	0,550	13,83	0,0002	0,14	0,05—0,38
G894T	0,706	0,400				
T894T	0,147	0,050				

Матеріали та методи

Було обстежено 171 хворого (115 пацієнтів з ХОЗЛ у поєднанні з ІХС, 29 пацієнтів з ІХС, 27 пацієнтів з ХОЗЛ) та 20 соматично здорових осіб. Верифікація соматичних діагнозів проводилась у клініці ДУ «Інститут терапії імені Л.Т. Малої НАМН України» відповідно до національних стандартів та положень, сформульованих у документі GOLD (Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) 2011–2015 pp. і Європейським товариством кардіологів [2, 3].

Усі пацієнти підписували інформовану згоду на участь у дослідженні. Параметрами виключення з дослідженнями були вік старше 65 років, тяжка супутня патологія (злоскісні новоутворення, захворювання залоз внутрішньої секреції, цукровий діабет 2 типу, хронічний пієлонефрит), хірургічне та терапевтичне лікування у лікаря-пародонтолога останні 6 міс.

При стоматологічному огляді враховували стан слизової оболонки порожнини рота, тканин пародонта з визначенням пародонтальних індексів.

Дослідження поліморфізмів проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

Геномну ДНК виділяли з периферичної крові за допомогою комерційного набору «ДНК-Сорб-В». Цільну кров брали в стерильну пробірку з антикоагулянтом (ЕДТА). Поліморфні варіанти поліморфізму G894T (rs1799983, Asp298Glu) гена eNOS визначали із застосуванням праймерів виробництва Thermo Scientific, Литва:

F 5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA-3'

R 5'-CCCAGTCAATCCCCTTTGGTGCTCA-3'.

Продукти ампліфікації фрагментів ДНК гена eNOS підлягали гідролітичному розщепленню за допомогою ендонуклеази рестрикції Ban II [6].

Подальша візуалізація зразків ДНК або її фрагментів проводилася за допомогою транслюмінатора ЕСХ-15.М (Франція). Результат документувався за допомогою відеосистеми GEL IMAGER 2.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою стандартних підходів, що використовуються при проведенні популяційно-генетичних досліджень. Тест на відповідність вибірки рівновазі Харді—Вайнберга проводили з використанням методу χ^2 . Для виявлення асоціації між клініко-анамнестичними показниками і генотипом використовувалася мультиплікативна, загальна й адитивна моделі успадкування (тест Кохрана—Армітаджа для лінійних трендів з одним ступенем свободи). Асоціацію між захворюванням і генотипом визначали за допомогою критерію χ^2 (з корекцією Єйтса на безперервність вибірки).

Показники відношення шансів (OR-odds ratio) з 95 % довірчим інтервалом (95 % CI) розраховувалися для мінорного алеля, носіїв мінорного алеля (гетерозигот + гомозигот за мінорним алелем) щодо мажорних алелів і гомозигот за мажорним алелем відповідно. При OR = 1 асоціація відсутня, OR > 1 розглядали як позитивну асоціацію з алелем або генотипом, OR < 1 — як негативну асоціацію.

Результати та обговорення

Результати дослідження поліморфізму G894T гена eNOS показали, що частота мінорного алеля в усіх групах наближається до частоти в європейських країнах. В об'єднаній групі обстежених хворих було виявлено наступний розподіл генотипів: G894G — 14,7 %, G894T — 70,6 % і T894T — 14,7 % (табл. 1). Розподіл алельних варіантів у даній групі становив: алель G — 50,0 %, алель T — 50,0 %. Розподіл не відповідав рівновазі Харді—Вайнберга ($p_{\chi^2} = 0,0007$).

Таблиця 2. Частота алелів та генотипів поліморфізму G894T гена eNOS в основній групі хворих та групі контролю

Алель та генотип	Хворі на ХОЗЛ та ІХС (n = 115)	Група контролю (n = 20)	χ^2	p_2	OR	95 % CI
<i>Мультиплікативна модель</i>						
G894	0,535	0,75	6,43	0,01	0,38	0,18—0,82
T894	0,465	0,25				
<i>Загальна модель</i>						
G894G	0,165	0,550	14,59	0,0007	0,16	0,06—0,44
G894T	0,739	0,400				
T894T	0,096	0,050				
<i>Адитивна модель (тест Кохрана—Армітаджа)</i>						
G894G	0,165	0,550	10,76	0,001	0,16	0,06—0,44
G894T	0,739	0,400				
T894T	0,096	0,050				

Таблиця 3. Частота алелів та генотипів поліморфізму G894T гена eNOS у групі хворих на ХОЗЛ та групі контролю

Алель та генотип	Хворі на ХОЗЛ (n = 27)	Група контролю (n = 20)	χ^2	p_2	OR	95 % CI
<i>Мультиплікативна модель</i>						
G894	0,463	0,75	7,80	0,005	0,29	0,12—0,70
T894	0,537	0,25				
<i>Загальна модель</i>						
G894G	0,148	0,550	9,24	0,01	0,14	0,04—0,57
G894T	0,630	0,400				
T894T	0,222	0,050				
<i>Адитивна модель (тест Кохрана—Армітаджа)</i>						
G894G	0,148	0,550	8,62	0,003	0,14	0,04—0,57
G894T	0,630	0,400				
T894T	0,222	0,050				

У групі контролю генотипи та алелі були розподілені наступним чином: G894G — 55,0 %, G894T — 40,0 % і T894T — 5,0 %, частота алеля G становила 75,0 %, алеля T — 25,0 %. Розподіл генотипів поліморфізму G894T гена eNOS у контрольній групі відповідав рівновазі Харді—Вайнберга ($p_2 = 0,77$).

Було виявлено достовірну різницю в частоті гетерозиготного генотипу даного поліморфізму у хворих та в контрольній групі (загальна модель, тест Кохрана—Армітаджа). Частота генотипів G894T та T894T у хворих була суттєво вищою порівняно з контрольною групою (в 1,8 та 2,9 рази відповідно).

У хворих об'єднаної групи не виявлено достовірних гендерних відмінностей у частоті генотипів поліморфізму G894T гена eNOS ($p_2 = 0,14$). Генотип G894G поліморфізму гена eNOS зустрічався у 11,7 % чоловіків та 20,3 % жінок, генотип G894T — у 72,1 % чоловіків та 67,8 % жінок, генотип T894T — у 16,2 % чоловіків та 11,9 % жінок (тест Кохрана—Армітаджа). Аналіз розподілу алелів T та G в залежності від статі також не виявив статистично значимих відмінностей ($p_2 = 0,25$).

Проте, розподіл генотипів та алельних варіантів поліморфізму G894T гена eNOS у групах обстежених хворих при розподілі за верифікованим діагнозом мав суттєві відмінності при порівнянні з контрольною групою. Отримані результати відображені в табл. 2—4.

Так, для основної групи (хворі з коморбідною патологією) характерним був наступний розподіл алелів та генотипів: G894G — 16,5 %, G894T — 73,9 % і T894T — 9,6 % ($p_2 = 0,0007$), алель G — 53,5 %, алель T — 46,5 % ($p_2 = 0,01$). Частота гомозиготного генотипу за поширеним (мажорним) алелем G894G у хворих була нижче в порівнянні з контрольною групою, тоді як гетерозиготний варіант G894T та гомозиготний варіант T894T зустрічався значно частіше — в 1,85 та 1,92 рази відповідно.

У групі хворих на ХОЗЛ також відзначали виражене превалювання кількості носіїв мінорного алеля поліморфізму G894T гена eNOS у порівнянні з контролем. Частота гетерозиготного варіанта G894T та гомозиготного варіанта T894T перевищувала контрольні значення — в 1,6 та 4,4 рази відповідно ($p_2 = 0,003$) (див. табл. 3).

Таблиця 4. Частота алелів та генотипів поліморфізму G894T гена eNOS у групі хворих на ІХС та групі контролю

Алель та генотип	Хворі на ХОЗЛ (n = 27)	Група контролю (n = 20)	χ^2	p_2	OR	95 % CI
<i>Мультиплікативна модель</i>						
G894	0,393	0,75	11,99	0,0005	0,22	0,09—0,53
T894	0,607	0,25			4,64	1,90—11,34
<i>Загальна модель</i>						
G894G	0,071	0,643	14,59	0,0007	0,06	0,01—0,34
G894T	0,643	0,400			2,70	0,83—8,81
T894T	0,286	0,050			7,60	0,87—66,67
<i>Адитивна модель (тест Кохрана—Армітаджа)</i>						
G894G	0,071	0,643	13,19	0,0003	0,06	0,01 — 0,34
G894T	0,643	0,400			2,70	0,83— 8,81
T894T	0,286	0,050			7,60	0,87 — 66,67

Слід зауважити, що розподіл генотипів при коморбідній патології мав дещо інший характер у порівнянні з ізолюваним ХОЗЛ. В останньому випадку відзначається більш виражене зростання частоти гомозиготного варіанта генотипу за мінорним алелем.

Аналіз розподілу алелів та генотипів поліморфізму G894T гена eNOS у групі хворих на ІХС дав наступні результати (див. табл. 4).

Частота генотипів G894T та T894T у зазначеній групі хворих була вищою в порівнянні з контрольною групою в 1,6 та 5,7 разу відповідно ($p_2 = 0,0003$).

Отримані результати свідчать про високу достовірність асоціації генотипу поліморфізму G894T гена eNOS з ризиком розвитку стоматологічної патології на тлі таких соматичних захворювань, як ІХС і ХОЗЛ, та їх поєднання.

Було проведено аналіз розподілу алелів та генотипів поліморфізму G894T гена eNOS в обстежених хворих залежно від наявності певної стоматологічної патології — гінгівіту, пародонтиту та пародонтозу в порівнянні з особами контрольної групи без клінічних уражень пародонтального комплексу.

При використанні загальної моделі ми не виявили суттєвої різниці у розподілі алелів та генотипів поліморфізму G894T гена eNOS у хворих з гінгівітом та в групі контролю без гінгівіту. Відмінності між групами були достовірними лише при застосуванні адитивної моделі ($p_2 = 0,05$). Гомозиготний генотип за мажорним алелем G894G мали 28,2 % хворих з гінгівітом та 53,8 % осіб контрольної групи без гінгівіту, гомозиготний генотип за мінорним алелем T894T виявлявся у 15,4 % хворих з гінгівітом, тоді як у контрольній групі він був відсутнім.

Було виявлено, що серед хворих з пародонтитом переважали носії генотипів G894T та T894T ($p_2 = 0,0001$). Гетерозиготний генотип G894T мали 75,9 % хворих з пародонтитом та 36,8 % осіб

контрольної групи без нього, а гомозиготний генотип T894T виявлявся у 12,7 % хворих, та 5,3 % осіб контрольної групи.

У результаті аналізу розподілу генотипів поліморфізму G894T гена eNOS між групою хворих з пародонтозом та контролем було виявлено статистично значущу різницю: в групі хворих з пародонтозом генотипи з мінорним алелем G894T та T894T зустрічалися значно частіше — у 69,6 та 17,4 % проти 40,0 та 5,0 % у контрольній групі відповідно ($p_2 = 0,001$).

При аналізі розподілу алелів та генотипів у хворих залежно від наявності певної стоматологічної патології було виявлено, що серед хворих з пародонтитом та пародонтозом переважали носії генотипів G894T та T894T.

Отже, можна зробити висновок щодо достовірної асоціації мінорного алеля T894 з наявністю стоматологічної патології у хворих із соматичними захворюваннями.

Оціночний тест для аналізу ступеня асоціації між генотипом поліморфізму G894T гена eNOS і наявністю запальних або атрофічних змін у пародонті залежно від числа поліморфних алелів (тренд-тест Кохрана—Армітаджа) показав достовірні статистичні відмінності між порівнюваними генотипами, що свідчить про наявність асоціації генотипу даного поліморфізму з розвитком стоматологічних ускладнень.

У подальшому дослідженні, при проведенні розподілу пацієнтів за генотипами з'ясували можливі асоціації поліморфізму G894T гена eNOS з клініко-анамнестичними показниками.

Оцінювання скарг у групах хворих з різними генотипами поліморфізму G894T гена eNOS виявило достовірні відмінності лише за одним показником — кровоточивістю ясен в анамнезі ($p = 0,030$). Найбільша частота кровоточивості ясен була зареєстрована в групі з генотипом TT (56 %), тоді як частота цієї скарги у двох інших групах не перевищувала 40 %.

Також була зафіксована достовірна різниця ($p = 0,001$) зустрічальності запальної патології пародонту без деструктивних уражень у носіїв різних генотипів. Так, найбільша частота гінгівіту була притаманна групі з генотипом GG (44,0 %), що майже вдвічі перевищувало аналогічний показник у інших групах.

Згодом був проведений аналіз стоматологічної патології в групах хворих з ізольованою соматичною патологією (група ХОЗЛ та група ІХС) та в основній групі з поєднаною патологією (група ХОЗЛ + ІХС) залежно від носійства певних генотипів досліджуваних поліморфних маркерів.

При виявленні запальних захворювань пародонту в зазначених групах було з'ясовано, що мінорний алель Т поліморфізму G894T гена eNOS у групі з ХОЗЛ зустрічався частіше, ніж в інших групах, а частота гомозигот за мінорним алелем у групі з ІХС зустрічалася достовірно рідше, ніж у носіїв алеля G, тоді як в основній групі достовірних відмінностей не спостерігалося. А у групі з ХОЗЛ найчастіше спостерігалися запальні зміни тканин пародонту порівняно з іншими групами.

Аналіз поліморфізму G894T гена eNOS вказує на те, що генотип GG, імовірно, пов'язаний з розвитком патології пародонту запальної деструктивної природи у пацієнтів групи ІХС і з

розвитком атрофічних процесів в основній групі. Мінорний алель Т, за даними дослідження, пов'язаний з розвитком запального процесу в пародонті в групі з коморбідною патологією, й атрофічних змін — у групі з ізольованою ІХС.

Висновки

Таким чином, у розвитку патології тканин пародонта у пацієнтів з коморбідною бронхопатологією серця певне значення може мати наявність поліморфізму G894T гена eNOS, що може стати прогностично важливою ознакою у формуванні групи ризику. Незважаючи на те, що поліморфізм G894T гена eNOS не може бути використаний як основний предиктивний маркер перебігу захворювання пародонту, він може використовуватися для побудови індивідуального генетичного прогнозу ризику розвитку захворювань пародонту у пацієнтів із захворюваннями, з якими встановлена асоціація.

Перспективи подальших досліджень. Представлені у роботі дані вказують на необхідність подальшого вивчення впливу поліморфізму G894T гена eNOS на виникнення та розвиток патологічних змін у пародонті, що дозволить враховувати його при розробці індивідуального профілю ризику хворих із соматичними захворюваннями.

Конфлікт інтересів немає. Участь авторів: концепція та дизайн дослідження, опрацювання висновків — Н.Ю. Емельянова, В.Ю. Гальчинська; збір та обробка матеріалу — Н.Ю. Емельянова, В.Ю. Гальчинська; складання бази даних — Т.М. Бондар.

Список літератури

- Casas J.P., Bautista L.E., Humphries S.E., Hingorani A.D. Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype and Ischemic Heart Disease: Meta-Analysis of 26 Studies Involving 23028 Subjects // *Circulation*.— 2004.— Vol. 109.— P. 1359—1365.
- Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (GOLD): Upd. 2016.— 80 p.
- GOLD — Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases (updated 2011—2015).
- Reissmann D.R., John M.T., Schierz O. et al. Association between perceived oral and general health // *J. Dent*.— 2013.— Vol. 41 (7).— P. 581—589.
- Shen T.C., Chang P.Y., Lin C.L. et al. Risk of periodontal diseases in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a nationwide population-based cohort study // *Medicine*.— 2015.— Vol. 94.— P. 2047.
- Tammam Sipahi. Lack of Evidence for Contribution of eNOS, ACE and AT1R Gene Polymorphisms with Development of Ischemic Stroke in Turkish Subjects in Trakya Region // *Polymerase Chain Reaction*.— 2012.— P. 455—468.
- Tonetti M.S., Van Dyke T.E. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases // *J. Periodontol*.— 2013.— Vol. 84 (4).— P. 24—29.
- Yu Y.H., Chasman D.I., Buring J.E. et al. Cardiovascular risks associated with incident and prevalent periodontal disease // *J. Clin. Periodontol*.— 2015.— Vol. 42 (1).— P. 21—28.

Н.Ю. Емельянова, В.Ю. Гальчинская, Т.Н. Бондарь

ГУ «Национальный институт терапии имени Л.Т. Малой НАМН Украины», Харьков

Связь полиморфизма G894T гена eNOS с развитием патологии пародонта у пациентов с бронхокардиальными заболеваниями

Цель работы — установление возможной ассоциативной связи полиморфизма G894T гена eNOS с риском развития патологии в пародонте пациентов на фоне хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ) и ишемической болезни легких (ИБС).

Материалы и методы. Обследован 171 больной (115 пациентов с ХОЗЛ в сочетании с ИБС, 29 пациентов с ИБС, 27 больных ХОЗЛ) и 20 соматически здоровых лиц. Методы исследования: клинический стоматологический, полимеразная цепная реакция.

Результаты и обсуждение. Выявлено, что среди больных с пародонтитом преобладали носители генотипов G894T и T894T ($p_2 = 0,0001$). Гетерозиготный генотип G894T имели 75,9 % больных с пародонтитом и 36,8 % лиц контрольной группы без него, а гомозиготный генотип T894T определялся у 12,7 % больных и 5,3 % лиц контрольной группы. Это указывает на то, что пациенты с коморбидной патологией, которые являются носителями генотипа GG, имеют повышенный риск развития атрофических изменений в тканях пародонта, тогда как генотип TT ассоциируется с развитием воспалительных процессов у той же категории субъектов.

Выводы. В развитии патологии тканей пародонта пациентов с кардиопульмональной патологией определенное значение может иметь наличие полиморфизма G894T гена eNOS, что становится прогностически важным признаком в формировании группы риска.

Ключевые слова: полиморфизм гена eNOS, хроническое обструктивное заболевание легких, ишемическая болезнь сердца, пародонт.

N.Yu. Emelyanova, V.Yu. Galchinskaya, T.M. Bondar

SI «National Institute of Therapy named after L.T. Mala of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv

Correlation between G894T polymorphism eNOS gene and development of periodontal pathology in patients with bronchialcardiac diseases

Objective – to establish possible connection between eNOS gene G894T polymorphism with a risk of pathology developing in the periodontal patients against the background of COPD comorbid with CHD.

Materials and methods. The examinations involved 171 patients (115 patients with COPD in combination with CHD, 28 patients with CHD, 27 COPD patients) and 20 somatically healthy patients. The methods of examination included clinical dental examination and polymerase chain reaction.

Results and discussion. It has been established that carriers of G894T and T894T genotypes ($p_2 = 0,0001$) prevailed in patients with periodontitis. The heterozygous genotype G894T was found in 75.9 % of the patients with periodontitis and 36.8 % patients of the control group without periodontitis. The homozygous genotype T894T was found in 12.7 % of patients and in 5.3 % of the control group. The results showed that patients with comorbid pathology carrying the GG-genotype have higher risk of developing atrophic changes in the periodontal tissues, whereas the TT genotype is responsible for the development of inflammatory processes in the same category of subjects.

Conclusions. The presence of eNOS gene G894T polymorphism can be significant in the development of periodontal tissues pathology in patients with cardiopulmonary pathology. This data can be highly significant as prognostic factor in the risk group formation.

Key words: eNOS gene polymorphism, chronic obstructive pulmonary disease, coronary heart disease, periodontium.