

И.К. Лукашевич¹,
ассистент кафедры детской стоматологии

Е.Г. Поморгайло¹,
д.б.н., доцент, профессор кафедры
патологической анатомии

И.Л. Горбунова¹,
д.м.н., ассистент кафедры терапевтической
стоматологии

И.Р. Абрамян²,
врач-стоматолог

¹ ОмГМУ

² частная практика, г. Сочи

Взаимосвязь генотипов гена калликреина-4 с реализацией и течением кариеса зубов

Резюме. На основании комплексной оценки полиморфизма гена, регулирующего формирование белковой матрицы, — калликреина-4 (КЛК-4) G2664153A и G2142A, обоснован прогноз развития кариеса зубов в случае носительства аллеля А, обуславливающего нарушение регуляции процесса минерализации в зубной эмали. Такой подход делает возможным составление индивидуального плана профилактики кариеса зубов в зависимости от носительства генотипа А/А гена КЛК-4 в мутационных точках G2664153A и G2142A. Критериями для формирования групп диспансерного наблюдения являются носительство аллеля А гена КЛК-4 в мутационных точках G2664153A и G2142A, что свидетельствует о высоком риске развития кариеса зубов.

Ключевые слова: ген калликреина-4, мутации, риск развития кариеса, профилактика

Summary. On the comprehensive assessment of polymorphism of gene to regulate the formation of protein matrix — kallikrein-4 G2664153A and G2142A basis, the forecast of dental caries development in a case of carrying the allele A determining dysregulation of the tooth enamel mineralization process has been substantiated. This approach makes drawing up an individual plan of preventing dental caries be possible depending on the carrier of the genotype A/A of the kallikrein-4 gene at the mutation points G2664153A and G2142A. The criteria for forming dispensary observation groups are the allele A carrier of KLK4 gene at the mutation points G2664153A and G2142A, which indicates a high risk of tooth decay.

Key words: kallikrein-4 gene, mutations, risk of tooth decay development, prevention

Кариес зубов до настоящего времени представляет важнейший аспект современной стоматологии. В литературе по проблеме кариеса зубов существует достаточно много работ, авторы которых считают, что причиной кариеса является зубная бляшка [4, 7]. Однако есть исследования, свидетельствующие, что кариес может протекать активно и при идеальной гигиене полости рта [2]. Хотя зубные бляшки образуются едва ли не у каждого человека, поражение зубов кариесом отнюдь не является их неизбежным следствием. Следовательно, тканевое поражение эмали определяется сочетанием внешнего деструктивного фактора (микрофлоры зубной бляшки) и локальной тканевой реакции (свойствами и строением самого субстрата воздействия микрофлоры, т.е. эмали зубов). Тканевая резистентность эмали определяется ее физико-химическим строением, обуславливающим морфологические и текстуральные особенности, фазовый состав, взаимное расположение и распределение по размерам отдельных компонентов фаз, морфологию частиц и другие структурно-геометрические характеристики [1]. Совокупность этих факторов и определяет

особенности протекания процессов деминерализации и реминерализации эмали зубов.

Хорошо известно, что при кариесе зубов существует наследственная предрасположенность [3, 8, 9]. Однако до сих пор не изучены какие-либо факторы, напрямую связанные с наследственностью кариеса. Исходя из этого, генетическую обусловленность кариеса необходимо рассматривать с позиций наследуемости физико-химических, анатомических и морфологических особенностей зубных тканей, количественного и качественного соотношения в них апатитов, состава микроэлементов и т.д.

За формирование зубной эмали отвечает множество генов, которые кодируют матричные белки и протеиназы, необходимые для управления процессами минерализации и кристаллизации созревающей эмали. Калликреин-4 (КЛК-4) является основным ферментом стадии созревания и отвечает за замещение белковой матрицы на минералы и формирование правильной организации кристаллов [6, 10]. Мутации гена КЛК-4 приводят к усечению молекулы белка пептидазы, что

влияет на протеолитическую активность и непосредственно на структуру гидроксиапатита. Темп минерализации эмали при дефекте КЛК-4 в целом ниже на 25% [5]. В КЛК-4-мутированной эмали повышено содержание белка по сравнению с нормальной эмалью, поэтому измененная таким образом эмаль в большей степени подвержена процессам минерализации по сравнению с эмалью, не пострадавшей от мутаций гена КЛК-4.

Полиморфизм G2664153A и G2142A гена КЛК-4 определяет наличие высокой или низкой массовой доли белка и таких аминокислот, как аспарагиновая, глутаминовая, гистидин, глицин, лейцин, лизин и цистин, сопоставимых с повышением калликреин-транслируемой пептидазы промотора гена КЛК-4, регулирующего амелогенез.

Цель исследования — установление взаимосвязи между реализацией кариеса зубов с полиморфизмом гена КЛК-4 в мутационных точках G2664153A и G2142A.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поставленная задача решается за счет того, что в комплексе клинично-лабораторных параметров определяется распределение полиморфизма гена КЛК-4 в мутационных точках G2664153A и G2142A, при этом носительство аллеля А в мутационных точках G2664153A и G2142A может быть использовано в качестве предиктора высокого риска развития кариеса у конкретного пациента.

Образцы ДНК выделяли с помощью наборов «ДНК-экспресс» («Литех», Россия) из венозной крови обследуемых. Для определения точечных мутаций G2664153A и G2142A гена КЛК-4 использовали наборы «SNP-Экспресс» («Литех», Россия).

Выборки больных кариесом и контрольную популяционную группу (лица, не имеющие кариеса) сформировали из представителей европеоидной расы, проживающих на территории Омска. Исследовательская когорта состояла из 131 человека в возрасте от 25 до 60 лет (средний возраст — $33 \pm 1,2$ года) — 68 (51,9%) мужчин и 63 (48,1%) женщины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частоты полиморфизма гена КЛК-4 у обследованных представлены в табл. 1 и 2.

При анализе генотипов аллельного полиморфизма гена КЛК-4 у лиц с интактным зубным рядом в мутационной точке 1 (G2664153A) не зафиксировано статистически значимых различий между частотами генотипов А/А, G/G и G/A, а также между аллелями А и G ($p > 0,05$). У кариесподверженных в мутационной точке 1 отмечаются статистически значимые различия полиморфизмов G/G и А/А ($p < 0,01$), а также частот генотипов А/А и G/G ($p < 0,05$).

В мутационной точке 2 (G2142A) аллельного полиморфизма гена КЛК-4 у кариесподверженных отмечается статистически значимое ($p < 0,001$) увеличение не только патологических гомозигот А/А по сравнению

с кариесрезистентными, но и значительное преобладание патологического аллеля А. У кариесрезистентных, напротив, отмечается статистически значимое увеличение полиморфизма G/G (нормальная гомозигота) по сравнению с полиморфизмами G/A и А/А. Результаты статистического анализа представлены в табл. 1–3.

При оценке частоты выявления аллелей G и А (мутация 1) относительный риск развития кариеса составил 1,374 (95% ДИ 1,062–1,776), отношение шансов развития кариеса — 1,778 (1,122–2,816).

При оценке частоты выявления аллелей G и А (мутация 2) относительный риск составил 2,517 (95% ДИ 1,902–3,333), отношение шансов — 6,014 (3,650–9,910).

При анализе таблиц сопряженности оценивались значения информационной статистики Кульбака (2I-статистика) для оценки связи изучаемых факторов и результативных признаков, которая рассматривается как мощный вариант непараметрического дисперсионного анализа, применяемый в том числе и на относительно малых выборках. Вычисление информационной

Таблица 1. Распределение полиморфизмов гена КЛК-4 в обследуемой популяции кариесрезистентных лиц, населяющих Омскую область

Полиморфизм	Аллель	Распространенность аллеля, %	Генотип	Распространенность генотипа, %
Мутация 1 (G2664153A)	G	52,0	G/G	19,7
	A	48,0	G/A A/A	64,5 15,8
Мутация 2 (G2142A)	G	69,7 ($p_1 < 0,01$)	G/G	47,4 ($p < 0,001$)
	A	30,3	G/A A/A	44,7 7,9

Примечание. Указаны только значимые различия. Коэффициент значимости p рассчитан по отношению к генотипам G/A и А/А в мутационных точках 2, коэффициент значимости p_1 рассчитан по отношению к аллелю А в мутационной точке 2.

Таблица 2. Распределение полиморфизмов гена КЛК-4 в популяции кариесподверженных лиц, населяющих Омскую область

Полиморфизм	Аллель	Распространенность аллеля, %	Генотип	Распространенность генотипа, %
Мутация 1 (G2664153A)	G	37,9	G/G	13,5
	A	62,1 ($p_1 < 0,05$)	G/A A/A	48,6 27,8 ($p < 0,01$)
Мутация 2 (G2142A)	G	27,7	G/G	10,8
	A	72,3 ($p_1 < 0,001$)	G/A A/A	33,8 55,4 ($p < 0,001$)

Примечание. Указаны только значимые различия. Коэффициент значимости p рассчитан по отношению к генотипам G/G и G/A в мутационных точках 1 и 2, коэффициент значимости p_1 рассчитан по отношению к аллелю G в мутационных точках 1 и 2.

Таблица 3. Результат оценки различий в группах по распространенности аллелей/генотипов (2I-статистика, p)

	Аллели		Генотипы	
	2I	p	2I	p
Мутация 1 (G2664153A)	6,08	<0,05	9,56	<0,01
Мутация 2 (G2142A)	54,72	<0,001	49,88	<0,001

статистики Кульбака для таблицы с двумя входами осуществляли по формуле:

$$2I = \left(\sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c 2n_{ij} \ln n_{ij} + 2n \ln n \right) - \left(\sum_{i=1}^r 2n_i \ln n_i + \sum_{j=1}^c 2n_j \ln n_j \right),$$

где n_i и n_j — объемы выборок в двух альтернативных группах.

Полученное фактическое значение $2I$ сравнивали с табличным значением χ^2 при соответствующем числе степеней свободы.

Результаты исследования свидетельствуют об информативности полиморфизма гена КЛК-4 в мутационных точках G2664153A и G2142A для прогноза развития кариеса.

Проведенное исследование убедительно свидетельствует о том, что в изученных группах пациентов отмечается статистически значимое более частое носительство патологического аллеля А у кариесподверженных, определяющее различия в структуре и текстуре эмали зубов с кариесрезистентными.

Клинический пример 1

Клиническими исследованиями установлены существенные различия в активности, распространенности и темпе прироста кариеса у русских и казахов, населяющих Омскую область. В этой связи изучение полиморфизма гена КЛК-4 явилось попыткой обоснования этой разницы с молекулярно-генетических позиций.

Провели молекулярно-генетическое обследование 150 человек в возрасте от 25 до 49 лет, русских — 76 человек (39 женщин и 37 мужчин) и казахов — 74 человека (37 женщин и 37 мужчин). Представленная выборка генотипирована по гену КЛК-4. Ген КЛК-4 исследовали в трех мутационных точках: T2664152G (мутация 1), G2664153A (мутация 2) и G2142A (мутация 3).

При анализе генотипов аллельного полиморфизма гена КЛК-4 среди казахов в мутационной точке 2 зафиксировано статистически значимое ($p < 0,01$) повышение частот генотипов А/А по отношению к генотипам G/G и G/A, а также значимое ($p < 0,05$) преобладание патологического аллеля А у казахов, в то время как у русских значимо ($p < 0,01$) выше частота генотипа G/G (нормальная гомозигота) и преобладание нормального аллеля G ($p < 0,05$).

В мутационной точке 3 аллельного полиморфизма гена КЛК-4 у казахов также отмечается статистически значимое ($p < 0,001$) увеличение не только патологических гомозигот А/А по сравнению с русскими, но и значительное преобладание патологического аллеля А. У русских, напротив, отмечается статистически значимое увеличение полиморфизма G/G (нормальная гомозигота) по сравнению с полиморфизмами G/A и А/А.

Определив количество остеопротегерина (инициатора ингибирования активации и дифференциации остеокластов) у русских и казахов, проживающих на территории Омской области, генотипированных по КЛК-4, удалось установить статистически значимое ($p < 0,001$) снижение концентрации остеопротегерина

в крови казахов — носителей полиморфного варианта А/А гена КЛК-4 в мутационной точке 2 и в мутационной точке 3.

Так, у русских, генотипированных по КЛК-4 в полиморфной точке 2, концентрация остеопротегерина в сыворотке крови при наличии полиморфного варианта А/А составила 11,659 пмоль/л, а у казахов — 2,911 пмоль/л. В полиморфной точке 3 у русских, генотипированных по КЛК-4, концентрация остеопротегерина в сыворотке крови составила 8,256 пмоль/л, а у казахов — 3,011 пмоль/л. При генотипировании русских и казахов по КЛК-4 в полиморфных точках 2 и 3 при наличии полиморфизма G/G содержание остеопротегерина в сыворотке крови не имеет статистически значимых различий: 8,674 пмоль/л у русских и 7,375 пмоль/л у казахов.

Клинический пример 2

Выявлены особенности распределения генотипов гена КЛК-4 по аллельным полиморфизмам в мутантных точках G2664153A и G2142A у беременных женщин 25—35 лет европеоидной расы в возрастных группах до и после 30 лет, на сроках беременности 13—36 недель (II и III триместры).

При анализе генотипов аллельного полиморфизма гена КЛК-4 среди некоторых беременных младше и старше 30 лет в мутационной точке G2664153A зафиксировано статистически значимое ($p < 0,01$) повышение частот генотипов А/А по отношению к генотипам G/G и G/A, а также значимое ($p < 0,05$) преобладание патологического аллеля А, в то время как у других беременных обеих возрастных групп была значимо ($p < 0,01$) выше частота генотипа G/G (нормальная гомозигота) и преобладание нормального аллеля G ($p < 0,05$).

В мутационной точке G2142A аллельного полиморфизма гена КЛК-4 у части обследуемых также отмечается статистически значимое ($p < 0,001$) увеличение не только патологических гомозигот А/А, но и значительное преобладание патологического аллеля А. У других, напротив, отмечается статистически значимое увеличение полиморфизма G/G (нормальная гомозигота) по сравнению с полиморфизмами G/A и А/А. Полученные закономерности присущи женщинам обеих обследованных возрастных групп.

Клиническими исследованиями установлены существенные различия в интенсивности, распространенности и темпе прироста кариеса у беременных, являющихся носителями патологического аллеля А гена КЛК-4, и беременными с преобладанием нормального аллеля G гена КЛК-4.

В обеих группах, как на момент первичного осмотра, так и после проведения курса кариеспрофилактики с использованием трехкомпонентного кальцийфосфатфторсодержащего геля, показатели, характеризующие состояние гигиены полости рта и кариесогенность зубного налета не имели статистически значимых различий.

При этом индекс КПУп в группе беременных, являющихся носителями патологического аллеля А гена КЛК-4, имел тенденцию к росту по сравнению

с первичным осмотром, несмотря на проведение кариепрофилактических мероприятий, — $\Delta\text{КПУп} = 10,14 \pm 0,53$ ($p \leq 0,05$). Этого, очевидно, не произошло в группе пациенток с преобладанием нормального аллеля G гена КЛК-4.

При сравнении основных показателей ротовой жидкости установлено, что активная концентрация кальция была наибольшей в группе с преобладанием нормального аллеля G — $0,49$ ммоль/л — и статистически достоверно ($p \leq 0,001$) отличалась от аналогичного показателя в группе с преобладанием патологического аллеля A гена КЛК-4 ($0,19$ ммоль/л).

При изучении активных концентраций натрия и калия в ротовой жидкости установлено статистически значимое ($p \leq 0,001$) увеличение активной концентрации калия в группе с преобладанием патологического

аллеля A гена КЛК-4. Деминерализующая активность осадка ротовой жидкости была значимо ($p \leq 0,001$) выше у беременных с преобладанием нормального аллеля G гена КЛК-4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования позволяют утверждать, что при выявлении полиморфизмов A/A и G/A гена КЛК-4 у беременных, несмотря на проведенные аппликации на зубы трехкомпонентного кальцийфосфатфторсодержащего геля, увеличивается темп прироста кариеса, а также изменяются такие показатели ротовой жидкости, как активные концентрации кальция и калия и деминерализующая активность осадка ротовой жидкости.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Дроздов В.А., Горбунова И.Л., Недосеко В.Б. Текстурные характеристики эмали зуба и ее резистентность к кариесу. — *Стоматология*. — 2002; 4: 4—9.
2. About I., Mitsiadis T.A. Molecular aspects of tooth pathogenesis and repair: in vivo and in vitro models. — *Adv Dent Res*. — 2001; 15: 59—62.
3. Hu C.C., Hart T.C., Dupont B.R., Chen J.J., Sun X., Qian Q., Zhang C.H., Jiang H., Mattern V.L., Wright J.T., Simmer J.P. Cloning human enamelin cDNA, chromosomal localization, and analysis of expression during tooth development. — *J Dent Res*. — 2000; 79 (4): 912—9.
4. Doméjean-Orliaguet S., Gansky S.A., Featherstone J.D. Caries risk assessment in an educational environment. — *J Dent Educ*. — 2006; 70 (12): 1346—54.
5. Wright J.T., Daly B., Simmons D., Hong S., Hart S.P., Hart T.C., Atsawasuwan P., Yamauchi M. Human enamel phenotype associated with amelogenesis imperfecta and a kallikrein-4 (g.2142G>A) proteinase mutation. — *Eur J Oral Sci*. — 2006; 114, suppl. 1: 13—7.
6. Simmer J.P., Hu Y., Lertlam R., Yamakoshi Y., Hu J.C. Hypomaturation enamel defects in *Klk4* knockout/LacZ knockin mice. — *J Biol Chem*. — 2009; 284 (28): 19110—21.
7. Jacobsson B., Wendt L.K., Johansson I. Dental caries and caries associated factors in Swedish 15-year-olds in relation to immigrant background. — *Swed Dent J*. — 2005; 29 (2): 71—9.
8. Lau E.C., Slavkin H.C., Snead M.L. Analysis of human enamel genes: insights into genetic disorders of enamel. — *Cleft Palate J*. — 1990; 27 (2): 121—30. PMID: 2187631
9. Forsman K., Lind L., Bäckman B., Westermark E., Holmgren G. Localization of a gene for autosomal dominant amelogenesis imperfecta (ADAI) to chromosome 4q. — *Hum Mol Genet*. — 1994; 3 (9): 1621—5.
10. Hart P.S., Hart T.C., Michalec M.D., Ryu O.H., Simmons D., Hong S., Wright J.T. Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. — *J Med Genet*. — 2004; 41 (7): 545—9.