



УДК 575.224.22

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА DEFБ4А У ЛИЦ, СТРАДАЮЩИХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПАРОДОНТА

Р. А. Верховский, Е. В. Глинская

Верховский Роман Аркадьевич, магистр биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского. E-mail: r.a.verhovskiy@mail.ru

Глинская Елена Владимировна, доцент кафедры микробиологии и физиологии растений, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, кандидат биологических наук. E-mail: elenavg-2007@yandex.ru

Ключевые слова: ВЗП, пародонтит, гингивит, SNP, β -дефензин-2, DEFБ4А.

DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-4-410-412

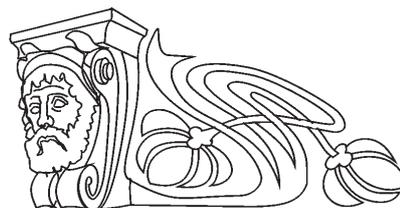
Воспалительные заболевания пародонта (ВЗП) относят к числу массовых стоматологических заболеваний, этиология которых на данный момент еще не до конца изучена. Одной из главных причин возникновения ВЗП является дисбаланс нормальной микрофлоры полости рта, вызванный увеличением доли пародонтопатогенных микроорганизмов [1]. Исход и течение инфекционного процесса в пародонте может быть предопределен не только вирулентностью микробов, но и генетическим полиморфизмом организма человека. За последнее десятилетие накоплен значительный объем данных, свидетельствующих об активном участии α - и β -дефензинов в процессах сано- и патогенеза широкого круга заболеваний [2, 3].

Цель работы

Изучение полиморфизма гена DEFБ4А, кодирующего β -дефензин-2 у людей больных ВЗП.

Задачи

1. Изучить микробный состав зубного налета и десневой жидкости у больных ВЗП и у лиц со здоровым пародонтом.
2. Сконструировать 2 пары праймеров, фланкирующих регионы гена DEFБ4А.
3. Амплифицировать и выделить ДНК двух фрагментов гена DEFБ4А.
4. Определить нуклеотидную и аминокислотную последовательности.
5. Провести анализ нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК методом множественного выравнивания.



Работа выполнена на базе лаборатории молекулярной биологии и кафедры микробиологии и физиологии растений биологического факультета Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского, лаборатории кафедры стоматологии общей практики и подготовки зубных техников, факультета последиplomного образования Московского государственного медико-стоматологического университета имени А. И. Евдокимова. Синтез праймеров и секвенирование амплифицированных фрагментов осуществлялись на базе ОАО «СИНТОЛ» г. Москва.

Определение видового состава пародонтопатогенной микрофлоры производилось методом ПЦР с использованием набора реагентов «Мультиидент-5» производства ООО НПФ «Генлаб».

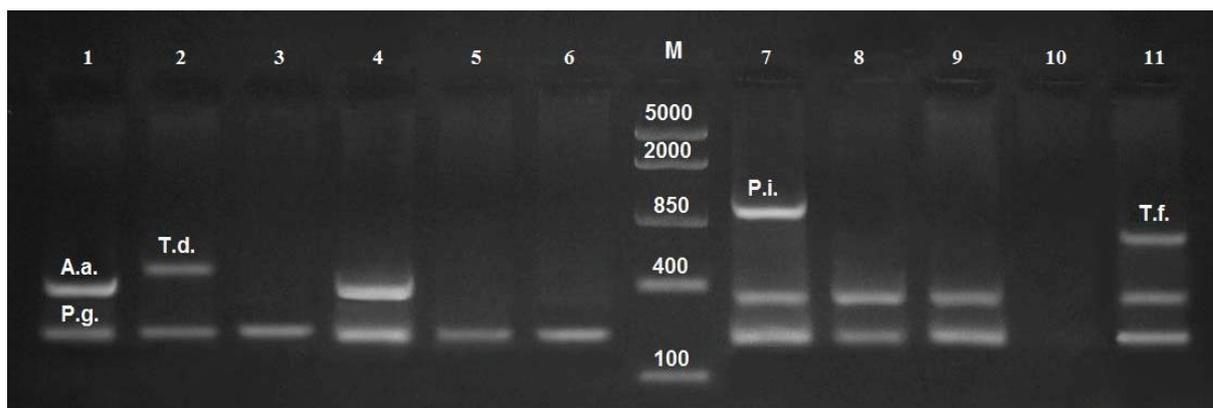
Конструирование фланкирующих праймеров осуществлялось на основе данных, взятых из базы NCBI, с использованием компьютерной программы GeneRunner.

Детекция результатов ПЦР проводилась методом электрофореза в 1% агарозном геле, приготовленном на 10-кратном буфере TAE. Для просмотра и фотографирования гелей использовали ультрафиолетовый трансиллюминатор УВТ-1 (Biokom). В исследуемых образцах при положительном результате ПЦР определялось от одной до пяти светящихся полос (рисунок).

Очистка амплифицированных фрагментов производилась на колонках с использованием набора реагентов «QIAquick PCR Purification Kit».

Анализ полученных последовательностей ДНК осуществлялся методом множественного выравнивания с использованием программы MEGA 7.

Объектом исследования явились образцы ДНК пародонтопатогенных микроорганизмов, выделенных из содержимого десневой борозды, и образцы тотальной ДНК, полученные из крови больных воспалительными заболеваниями пародонта. Забор биологического материала и последующее выделение ДНК осуществлялись сотрудниками лаборатории кафедры



Электрофореграмма продуктов ПЦР, амплифицированных в реакции с образцами десневой жидкости: P.g. – *P. gingivalis* (197 п. н.), P.i. – *P. intermedia* (1000 п.н.), T.d. – *T. denticola* (512 п.н.), T.f. – *T. forsythia* (747 п.н.), A.a. – *A. actinomycetemcomitans* (360 п.н.)

стоматологии общей практики и подготовки зубных техников факультета последипломного образования Московского государственного медико-стоматологического университета имени А. И. Евдокимова.

В ходе исследования у 110 человек, вошедших в исследуемую группу, была определена пародонтопатогенная микрофлора. *P.gingivalis* вне комплекса встречалась в 24,5% случаев. Комплекс *P.gingivalis* и других пародонтопатогенных микроорганизмов из числа исследуемых встречался в 62,7% случаев. Комплексы, в состав которых не входила *P.gingivalis*, были выявлены у 7,3% человек. Пародонтопатогенные микроорганизмы не были обнаружены у 5,5% человек.

Последовательности участков гена DEF4A были определены у 28 человек. В результате анализа полученных данных нами было выявлено 27 точечных нуклеотидных замен. В пределах 5'-UTR было выявлено две SNP, часто встречаемых у представителей со средней и тяжелой формами течения заболевания. Первая мутация встречалась в 30,4, вторая – 60% случаев.

В ходе исследования было выявлено две SNP, в пределах 5'-UTR, наиболее часто встречаемых у представителей со средней и тяжелой формами течения заболевания. Таким образом, можно предположить, что данные SNP выступают в качестве маркеров предрасположенности к возникновению ВЗП.

Список литературы

1. Аболмасов Н. Н. Стратегия и тактика профилактики заболеваний пародонта // Стоматология. 2003. № 4. С. 34–39.

2. Greer A., Zenobia C., Darveau R. P. Defensins and LL-37: a review of function in the gingival epithelium // Periodontol 2000. 2013. Vol. 63, № 1. P. 67–79.
3. Li X., Duan D., Yang J., Wang P., Han B., Zhao L., Jepsen S., Dommisch H., Winter J., Xu Y. The expression of human β -defensins (hBD-1, hBD-2, hBD-3, hBD-4) in gingival epithelia // Arch. Oral Biol. 2016. Vol. 66. P. 15–21.

Study of the Polymorphism DEF4A Gene in Individuals Suffering from Periodontal Inflammatory Diseases

R. A. Verkhovskiy, E. V. Glinskaya

Roman A. Verkhovskiy, ORCID 0000-0003-1830-4582, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, r.a.verhovskiy@mail.ru

Elena V. Glinskaya, ORCID 0000-0002-1675-5438, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, elenavg-2007@yandex.ru

Key words: inflammatory periodontal disease, periodontitis, gingivitis, SNP, β -defensin-2, DEF4A.

Inflammatory periodontal disease is considered a mass dental disease, the etiology of which is not yet fully understood. One of the main reasons occurrence of inflammatory periodontal disease is an imbalance in the normal microflora of the oral cavity, caused by an increase in the proportion of parodontopathogenic microorganisms [1]. The outcome of the infectious process in the periodontium can be predetermined not only by the virulence of microbes, but also by the genetic polymorphism of the human body. Over the past decade, a significant amount of data has been accumulated, indicating the active participation of α - and β -defensins in the processes of the pathogenesis of a wide range of diseases [2, 3].



Aim

Study the polymorphism of the DEFB4A gene, which codes for β -defensin-2 in people suffering from periodontal inflammatory diseases.

The work was carried out on the basis of the Laboratory of Molecular Biology of the SSU named after N. G. Chernyshevsky, the laboratory of the Department of General Practitioner Dentistry and Training of Dental Technicians of Moscow State University of International Relations named after A. I. Evdokimov (Moscow). Synthesis of primers and sequencing of amplified fragments was carried out on the basis of OJSC «СИНТОЛ» (Moscow).

Determination of the species composition of the parodontopathogenic microflora was carried out using the PCR method using the Multident-5 reagent kit (LLC NPF Genlab).

The flanking primers were designed on the basis of data from the NCBI database using computer program the GeneRunner.

Detection of the PCR results was carried out by electrophoresis in a 1% agarose gel prepared on a 10-fold TAE buffer.

Purification of the amplified fragments was performed on the columns using the QIA quick PCR Purification Kit.

Analysis of the obtained DNA sequences was carried out by the method of multiple alignment using the program MEGA 7.

The subjects of the study were DNA of parodontopathogenic microorganisms and total human DNA.

In the course of study, the parodontopathogenic microflora was determined in 110 patients included in the study group. *P. gingivalis* outside the complex was found in 24.5% of cases. The complex of *P. gingivalis* and other parodontopathogenic microorganisms was found in 62.7% of cases. Complexes, which did not include *P. gingivalis*, were found in 7.3% of people. Parodontopathogenic microorganisms were not found in 5.5% of people.

Sequences of DEFB4A gene sites were determined in 28 patients. As a result of the analysis of the obtained data, we detected 27 point nucleotide substitutions. Within the 5'-UTR, were detected two SNPs, often found in people suffering from periodontal inflammatory diseases. The first mutation is found in 30.4%, the second - in 60% of cases.

In the course of the study, within the 5'-UTR were detected two SNPs, the most common in representatives with moderate to severe forms of the disease. The data obtained suggest that SNP data can act as markers of predisposition to periodontal inflammatory diseases.

Образец для цитирования:

Верховский Р. А., Глинская Е. В. Изучение полиморфизма гена DEFB4A у лиц, страдающих воспалительными заболеваниями пародонта // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2017. Т. 17, вып. 4. С. 410–412. DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-4-410-412.

Cite this article as:

Verkhovsky R. A., Glinskaya E. V. Study of the Polymorphism DEFB4A Gene in Individuals Suffering from Periodontal Inflammatory Diseases. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, iss. 4, pp. 410–412 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-4-410-412.
