

УДК 575+616.314.17-008.1: 616.633.465.623

МЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРА ГЕНА TLR2 ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ПАРОДОНТИТА НА ФОНЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

¹Деняга О.В., ²Пиндус Т.А., ³Бубнов В.В.

¹ Государственное учреждение «Институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Национальной академии медицинских наук Украины»

² Львовский медицинский институт

³ Одесский национальный медицинский университет

Показана роль гена TLR2 у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом на фоне метаболического синдрома. Снижение метилирования TLR2 в образцах ткани десен у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом 2-3 степени и метаболическим синдромом может служить маркером активности хронического пародонтита и быть мишенью для терапии этого заболевания при наличии соматической патологии.

Ключевые слова: ген TLR2, метилирование, хронический генерализованный пародонтит, метаболический синдром.

Актуальность

Хронические воспалительные заболевания, сопровождающиеся остеоллизом, включая ревматоидный артрит, остеомиелит и пародонтит, обычно связаны с бактериальными инфекциями. Существует доказательство того, что сигнализация Toll-like receptor (TLR) регулирует как воспаление, так и костный метаболизм и что активатор рецептора лиганда NF-κB (RANKL) и его RANK-рецептор являются ключевыми регуляторами ремоделирования кости и активации остеокластов [1]. Провоспалительный каскад и выброс провоспалительных цитокинов инициируется как результат, распознавания антигенов патогенной флоры рецепторами семейства -TLR. Показана существенная роль генов TLR2 и TLR4 в развитии воспалительных повреждений при различных хронических заболеваниях, в том числе при ревматоидном артрите, пародонтите, остеомиелите. Повышенная экспрессия TLR2 и TLR4 выявлена также в патогенезе повреждения эндотелия сосудов при диабете [2]. Отмечается, что хронический пародонтит у беременных женщин может быть причиной преждевременных родов за счет ак-

тивации провоспалительных цитокинов [3]. Таким образом, роль TLR2 и TLR4 в развитии хронической патологии является ключевой [4, 5].

Многие процессы в организме усложняются при наличии у пациентов такой соматической патологии, как метаболический синдром.

Целью данного исследования было выявление роли метилирования промотора гена TLR2 у пациентов с хроническим пародонтитом различной степени на фоне метаболического синдрома.

Материалы и методы

Ткани десны и кровь были взяты у 11 пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) начальной — 1 степени (8 человек с диагнозом «метаболический синдром») и у 10 пациентов с ХГП 2-3 степени (6 человек с диагнозом «метаболический синдром»).

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически на спектрофотометре «Emrlen» и доводили до концентрации 1мкг/мл во всех пробах. Бисульфитную обработку выделенной ДНК и амплификацию ДНК проводили с помощью набора Qiagen по программе: 95°C-

15 мин.; 95°C-30 сек., отжиг праймеров -30 сек, элонгация 72°C-30 сек- 39 циклов; 72°C-10 мин (табл. 1).

Таблица 1

Последовательность праймеров для амплификации ДНК и секвестирования промотора гена TLR2 у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом и метаболическим синдромом

	Праймер	T, °C
TLR2	F-Biotin-GGGA GTTTGTTGGGAAGT	54
TLR2	R- AACCCCCCTCCTTCTAAAAAT	
TLR2	Seq- CCCCTCCTTCTAAAAATA	

Пиросеквенирование проводили на приборе PyroMark Q24, содержание метилированной ДНК в пробе оценивали с помощью программы PyroMark CpG software 2.01. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica, versia 10.

Результаты исследований и их обсуждение

Провоспалительные цитокины играют определяющую роль в развитии и прогрессии хронических воспалительных процессов, в том числе пародонтита. Инициация провоспалительного ответа зависит от взаимодействия и активации TLR-рецепторов с бактериальными антигенами. Одним из таких рецепторов является TLR2, функция которого лежит в распознавании бактериальных антигенов и активации ответа на этот антиген для его элиминации. Пример пирограммы (результат секвенирования) содержания метилированной ДНК гена TLR2 у пациента с МС показан на рисунке 1.

Проведенный анализ метилирования промотора гена TLR2 в образцах ткани десны у пациентов с ХГП различной степени тяжести и МС выявил гипометилирование промотора гена TLR2 у больных в группе с 2 и 3 степенью хронического пародонтита. Содержание метилированной ДНК гена TLR2 в этой группе больных составило $9 \pm 1,8 \%$ (рис. 2). В группе пациентов с пародонтитом начальной — I степени содержание метилированной ДНК гена TLR2 составило $17,8 \pm 4,7 \%$ и было достоверно выше, чем в группе с хроническим пародонтитом 2-3 степени ($p < 0,01$). Снижение метилирования промотора гена TLR2 приводит к активации экспрессии гена и повышенному синтезу этого рецептора на мембранах антигенраспознающих клеток. Таким образом, можно говорить о повышенной экспрессии гена TLR2 у пациентов со 2-й и 3-й степенью хронического генерализованного пародонтита.

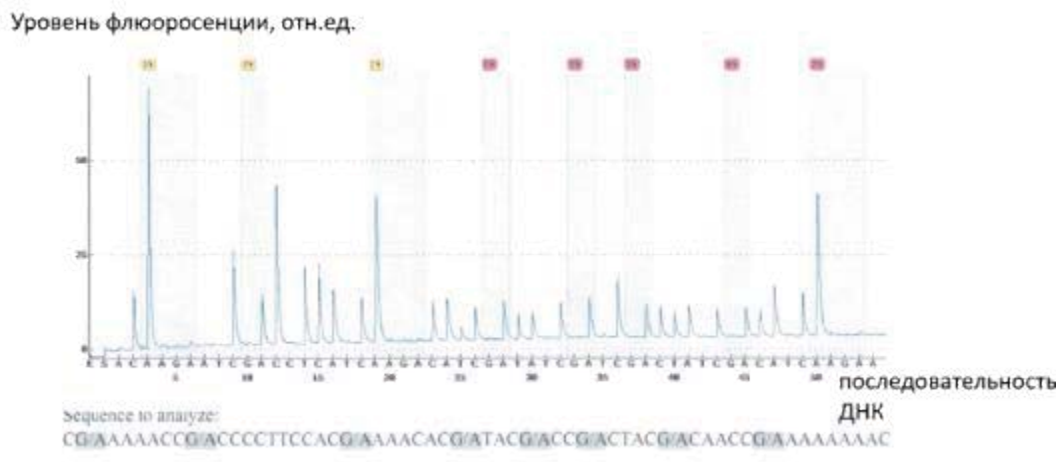


Рис. 1. Пример пирограммы метилирования промотора гена TLR2 в десне у пациента с метаболическим синдромом

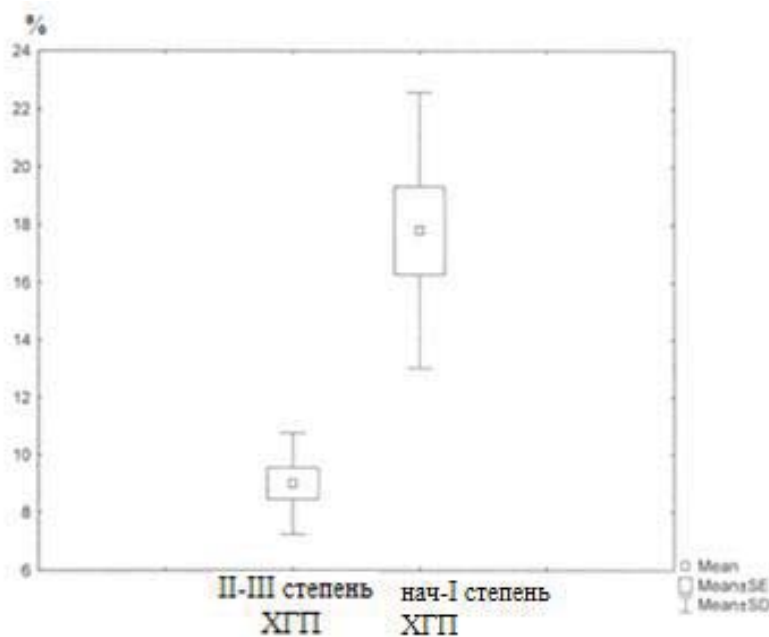


Рис 2. Содержание метилированной ДНК гена TLR2 в десне у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом начальной - 1 и 2-3 степени на фоне метаболического синдрома

Уменьшение (хотя и недостоверное) содержания метилированной ДНК гена *TLR2* в тканях десны и крови у пациентов с МС по сравнению с пациентами без соматической патологии (в 1,4 и 1,17 раза соответственно) свидетельствует о дополнительном снижении защитных возможностей организма (табл. 2).

Активация *TLR2* гена является одним из важных механизмов ответа на инфекцию в ротовой полости. Гипометилирование этого гена при пародонтите говорит о высокой экспрессии этого рецептора на эпителиальных клетках десны и клетках, связанных с иммунным ответом.

Уменьшение метелирования ДНК гена *TLR2* при МС свидетельствует о дополнительном снижении при этом уровня реакции организма на воспаление по сравнению с пациентами без этой соматической патологии.

Литература / References

1. Ping Zhang, Jianzhong Liu, Qingan Xu. TLR2-dependent Modulation of Osteoclastogenesis by *Porphyromonas gingivalis* through Differential Induction of NFATc1 and NF-Kb. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286 (27): 24159-69.
2. Mudaliar H., Pollock C., Ma J., Wu F.I. The role of TLR2 and 4-mediated inflammatory pathways in endothelial cells exposed to high glucose. *PLoS One*. 2014 Oct 10; 9 (10): e 108844. doi: 10.137.
3. Prathahini Parthiban and Jaideep Mahendra. Toll-Like Receptors: A Key

Таблица 2

Содержание метелированной ДНК гена *TLR2* в тканях десны и крови у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом, $M \pm m$, %

Гены \ Диагноз	Ткани пародонта		Кровь	
	Без соматической патологии (n = 6)	Мет. синдром (n = 14)	Без соматической патологии (n = 6)	Мет. синдром (n = 14)
<i>TLR2</i>	5,2 ± 1,7	3,7 ± 1,5 <i>p</i> > 0,05	5,3 ± 2,1	4,5 ± 1,4 <i>p</i> > 0,05

Примечание: *p* — показатель достоверности отличий от группы пациентов без соматической патологии.

Marker for Periodontal Disease and Preterm Birth — A Contemporary Review. Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR. 2015; 9 (9): ZE14-ZE17. doi: 10.7860/JCDR/2015/14143.6526.

4. Yannick Delpeu. DNA Мѣthylation and Cancer Diagnosis. Int. J. Mol. Sci. 2013, 14, 15029-15058; doi: 10.3390/ijms 140715029.
5. Ana Paula De Souza High-throughput DNA analysis shows the importance of мѣthylation in the control of immune inflammatory gene transcription in chronic periodontitis. Clinical Eigenetics; 2014, 6: 15.

Резюме

МЕТИЛУВАННЯ ПРОМОТОРА ГЕНА TLR2 ПРИ РІЗНОМУ СТУПЕНЮ ПАРОДОНТИТУ НА ТЛІ МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ

Деньга О.В., Пиндус Т.О., Бубнов В.В.

Показана роль гена TLR2 у пацієнтів з хронічним генералізованим пародонтитом на тлі метаболічного синдрому. Зниження метилування TLR2 в зразках тканини ясен у пацієнтів з хронічним генералізованим пародонтитом 2-3 ступеня та метаболічним синдромом може служити маркером активності хронічного пародонтиту і бути мішенню для терапії цього захворювання при наявності соматичної патології.

Ключові слова: ген TLR2, метилування, хронічний генералізований пародонтит, метаболічний синдром.

Впервые поступила в редакцию 05.11.2017 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования

Summary

METHYLATION OF THE TLR2 GENE PROMOTER AT A DIFFERENT DEGREE OF PARODONTITIS ON THE BACKGROUND OF METABOLIC SYNDROME

Denga O.V., Pyndus T.A., Bubnov V.V.

Introduction. The proinflammatory cascade and the release of pro-inflammatory cytokines are initiated as a result of the recognition of antigens of the pathogenic flora by the receptors of the TLR family. Many processes in the body become more complicated when patients have such a somatic pathology as metabolic syndrome.

Purpose of the study. The aim of the study was to identify the role of methylation of the TLR2 gene promoter in patients with chronic periodontitis of varying degrees against the background of the metabolic syndrome.

Materials and methods. In samples of gum tissues and oral fluid of patients (21 people, ages 30-55 years), pyrosequencing was performed, the concentration and content of methylated DNA was evaluated, DNA amplification was performed.

Results. Conclusions. The role of the TLR2 gene in patients with chronic generalized parodontitis on the background of metabolic syndrome is shown. Reduction of methylation of TLR2 in tissue samples with chronic generalized parodontitis of 2-3 degree and metabolic syndrome can serve as a marker for the activity of chronic parodontitis and be a target for the treatment of this disease in the presence of somatic pathology.

Key words: TLR2 gene, methylation, chronic generalized parodontitis, metabolic syndrome.