MOLECULAR-GENETIC ASSESSMENT OF MARKERS OF CONNECTIVE TISSUE METABOLISM COL1A1 AND MMP9 IN CHILDREN AGAINST THE BACKGROUND OF VITAMIN D DEFICIENCY AND MUSCULOSKELETAL DISORDERS

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ОЦІНКА МАРКЕРІВ МЕТАБОЛІЗМУ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ COL1A1 І MMP9 У ДІТЕЙ, НА ТЛІ ДЕФІЦИТУ ВІТАМІНУ D ТА ЗАХВОРЮВАНЬ ОПОРНО-РУХОВОГО АПАРАТУ

Danylo Sukhomeylo[1]
Olga Reyzvikh [2]

DOI: https://doi.org/10.30525/978-9934-26-672-0-10

Пошук та розробка сучасних неінвазивних методів ранньої діагностики стоматологічної патології має науково-практичну значущість для персоніфікованого підходу до прогнозування перебігу захворювання та обґрунтування вибору тактики лікування. Морфологічна незрілість, висока напруженість анаболічних процесів, функціональна неспроможність нейрогуморальної, ендокринної та імунологічних захисних систем у поєднанні з порушенням рівноваги між процесами синтезу та деградації компонентів екстрацелюлярного матриксу у дітей із захворюваннями опорно-рухового апарату значно підвищує ризик розвитку стоматологічних захворювань. Профілактика будь-яких захворювань, в тому числі стоматологічних, на сучасному етапі повинна проводитися в першу чергу з урахуванням генетичних складових та стану загальносоматичного здоров'я дитини [1].

Ріст та розвиток кісткової тканини зростаючого організму визначаються взаємодією хондроцитів, що утворюють хрящ, остеобластів, що синтезують та відкладають кістковий матрикс, та остеокластів, відповідальних за резорбцію кісткової речовини [2]. Під час резорбції кісткової тканини, опосередкованої остеокластами, білкові фактори діють як сигнальні молекули для ініціації відновлення кісток остеобластами. Остеобласти, у свою чергу, можуть впливати на функцію остеокластів через експресію розчинних або мембранно-пов'язаних регуляторів, якими є специфічні білкові молекули, матриксні

[1] Odesa National Medical University, Ukraine
[2] The Institute of Stomatology and Maxillo-Facial Surgery
National Academy of Medical Sciences Of Ukraine, Ukraine

металопротеїнази (ММР), фактори росту, цитокіни та хемокіни [3]. Очевидно, що нормальне ремоделювання кісток залежить від певного балансу між функціями утворення та резорбції. На ризик розвитку остеопорозу впливає низка факторів, серед яких генетичний відноситься до найзначніших. До 90 % випадків остеопорозу генетично детерміновано [4].

Основна біологічна функція ММР полягає у здатності гідролізувати основні компоненти ПКМ. ММР-9 (колагеназа-4, желатиназ-В) була виявлена в нейтрофілах, хондроцитах, макрофагах, фібробластах, одонтобластах.

Низкою авторів було показано, що прозапальні цитокіни стимулюють надмірну продукцію ММР-9, що сприяє посиленню проникності, порушенню структури зуба та виникненню карієсу [5].

Основу сполучної тканини організму складають колагени і забезпечують її міцність і еластичність. Роботи останніх років вказують на можливий взаємозв'язок поліморфізму колагену з розвитком захворювань сполучної тканини, таких як остеопороз. Є дані про високу поширеність зубощелепних аномалій, карієсу зубів, захворювань пародонту, скроневонижньощелепного суглоба при дисплазії сполучної тканини [6, 7]. Одним із генів-кандидатів остеопорозу є ген COL1A1, який кодує 1-альфа ланцюг колагену 1-го типу, що входить до складу кісток, сухожиль, зв’язок, шкіри та інших видів сполучної тканини.

Для розробки ефективних схем лікувально-профілактичних заходів було важливо провести молекулярно-генетичні дослідження. Для цього оцінювався вплив поліморфних варіантів генів COL1A1 1546 SP1,G>T, MMP9 A8202G в групі пацієнтів з дефіцитом вітамину D (n=10), остеопорозом (n=10) та контрольній групі (n=10).

Під час дослідження вивчали генетичний поліморфізм генів COL1A1 546 SP1,G>T, MMP9 A8202G в групах пацієнтів зі стоматологічною патологією на тлі дефіциту вітаміну D, остеопорозу на фоні захворювань опорно-рухового апарату та контрольної групи з метою персоніфікованого характеру профілактичних та лікувальних стоматологічних заходів. Для молекулярно-генетичного аналізу використовували зразки геномної ДНК 30 дітей зі стоматологічною патологією на тлі аліментарного дефіциту вітаміну D, остеопорозу на фоні захворювань опорно-рухового апарату та контрольної групи. Виділення ДНК з клітин букального епітелію проводили за модифікованою методикою з Chelex [8].

Частоту поліморфізму гена COL1A1,1 546 (6252) SP1,G>T оцінювали методом ПЛР з детекцією результатів у режимі реального часу та аналізом

кривих плавлення. Для ПЛР-діагностики використовували детектуючий ампліфікатор ДТлайт4S1.

В досліджуваній групі 60 % дітей з остеопорозом (ОП) мали мутантний алель G, який є фактором ризику захворювань твердих тканин зуба і предиктором розвитку остеопорозу.

Встановлено, що серед обстежених дітей з ОП по поліморфізму A8202G гену MMP9 переважали гетерозиготи AG. Частота даного генотипу серед дітей з ОП становила 50 %. 10 % дітей з ОП були мутантними гомозиготами по алелю G. Генотип AA був виявлений у 40 % досліджуваних дітей. Частота алеля A в промоторній ділянці – 8202 гену MMP9 склала 65 %, алеля G – 35 %.

У нашому дослідженні у дітей з лабораторно підтвердженим дефіцитом або нестачею вітаміну D в сироватці крові нормальний генотип AA гену MMP9 зустрічався у 40 % дітей. Гетерозиготний (AG) та мутантний гомозиготний (GG) поліморфізм гена MMP9 було виявлено загалом у 60 % дітей. Мутантний алель G представлений як в гетерозиготній, так і гомозиготній формі у 40 % дітей. В досліджуваних групах по ОП та дефіциту вітаміну D 60 % дітей мали алель G, який є фактором ризику захворювання пародонту. В контрольній групі дітей частота мутантного алеля G склала 65 %. За критерієм $\chi 2$ сила зв'язку між фактором ризику та захворюваністю є відносно сильною ($p < 0,001$) як по гомозиготі AA, так і по мутантній гетерозиготі AG та сильною ($p < 0,001$) по мутантній гомозиготі GG. Поліморфізм A8202G гену MMP9 призводить до підвищеного розщеплення білків міжклітинної матриксу і, як наслідок, відбувається деструкція тканин підтримуючого апарату зуба.

При дослідженні 1546 SP1,G>T поліморфізму гену COL1A1 встановлено, що серед обстежених дітей контрольної групи та дітей з дефіцитом вітаміну D переважали гомозиготи GG. Частота даного генотипу серед дітей становила 60 %, відповідно в обох групах. Генотип GT був виявлений у 40 % досліджуваних дітей всіх груп. Частота мутантного алеля T склала 40 % у дітей з ОП та 20 % – у дітей з дефіцитом вітаміну D та контрольної групи.

Встановлено, що діти з генотипом GG та гетерозіготи GT мали несуттєвий рівень ризику розвитку патологічних змін у кістковій тканині та розвитку D-дефіцитного стану ($p > 0,05$). Фактором ризику для розвитку остеопорозу є генотип TT. У 20 % дітей-гомозігот TT з остеопорозом за критерієм $\chi 2$ середня сила зв'язку ($p < 0,001$). Мутації даного гена можуть впливати на структурно-функціональні характеристики найпоширенішого протеїну кісткового матриксу та сприяти розвитку остеопорозу.

Висновки. При дослідженні функціональнозначущих поліморфізмів генів MMP9 A8202G, COL1A1 1546 SP1,G>T, що входять в генну мережу метаболізму сполучної тканини у дітей встановлено: наявність алеля G гена MMP9 A8202G у 40 % дітей з дефіцитом вітаміну D, 35 % дітей з остеопорозом та алеля T гена COL1A1 у 20 % та 40 % досліджуваних дітей відповідно, призводять до схильності цих дітей до каріозного ураження твердих тканин зубів та захворювань пародонту.

Список використаних джерел:

1. Кіцера Н., Ковальчук Л., Рожко М. Генетична патологія і її стоматологічні прояви: навчальний посібник для для стоматологів, сімейних лікарів, генетиків. ІваноФранківськ-Львів, 2021. 240 с.

2. Franceschi R.T., Ge C. Control of the Osteoblast Lineage by Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Curr Mol Biol Rep*. 2017. №3 (2). P. 122–132. DOI: 10.1007/s40610-017-0059-5

3. Paiva K.B.S., Granjeiro J.M. Matrix Metalloproteinases in Bone resorption, remodeling, and repair. *Prog Mol biol Transl sci*. 2017. №148. P. 203–303. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.05.001

4. Urano T., Inoue S. Genetics of osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014. №452 (2). P. 287–93. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.07.141

5. de Almeida L.G.N., Thode H., Eslambolchi Y., Chopra S., Young D., Gill S., Devel L., Dufour A. Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev*. 2022. №74 (3). P. 712–768. DOI: 10.1124/pharmrev.121.000349

6. Sokolova I.I., Yaroshenko O.H., Herman S.I., Tomilina T.V., Skydan K.V., Skydan M.I. Features of dental status and metabolism in children with early childhood caries against the background of connective tissue dysplasia. *Wiad Lek*. 2021. №74 (10 pt 1). P. 2503–2509.

7. Боднарук Н.І., Смоляр Н.І., Чухрай Н.Л., Машкаринец О.О., Ган І.В. Взаємозв'язок захворюваності на карієс тимчасових зубів із патологією опорно-рухового апарату в дітей дошкільного віку з урахуванням біохімічних маркерів метаболізму сполучної тканини. *Медичні перспективи*. 2022. Т. 27, № 2. С. 138-145. https://doi.org/10.26641/2307-0404.2022.2.260290

8. Walsh P.S., Metzger D.A., Higushi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 2013. №54 (3). P. 134–9.