

УДК 575.174.015.3: 616.31

**ПОИСК АССОЦИИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ *ANXA5* И *CALB2*
С ПОВЫШЕННЫМ РИСКОМ РАЗВИТИЯ КАРИЕСА У ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА***А. Н. Волков, Л. Ю. Лошакова, А. Д. Еникеева***INVESTIGATION OF ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN *ANXA5* AND *CALB2* GENES
WITH INCREASED RISK OF DENTAL CARIES IN PRESCHOOL CHILDREN***A. N. Volkov, L. J. Loshakova, A. D. Enikeeva*

Работа выполнена в центральной научно-исследовательской лаборатории Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Кемеровская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития России, г. Кемерово.

Изучен полиморфизм генетических маркеров *rs7676539* гена *ANXA5* и *rs8063760* гена *CALB2* среди дошкольников г. Кемерово европеоидной принадлежности, различающихся по уровню интенсивности кариеса. Частоты аллелей и генотипов по изучаемым участкам в данной выборке оказались сопоставимы с показателями, характерными для европеоидов в целом. Не удалось установить статистически значимых отличий частот каких-либо генетических вариантов маркеров *rs7676539* и *rs8063760* в когорте здоровых детей по сравнению с группой дошкольников с очень высоким уровнем интенсивности кариеса.

Was studied polymorphism of genetic markers *rs7676539* of *ANXA5* and *rs8063760* of *CALB2* among preschool children caucasian origin in Kemerovo, differing in the level of caries intensity. Alleles and genotypes frequencies of the studied sites in the sample were comparable to those typical for caucasians in general. Unable to establish statistically significant differences between the frequency of any genetic variants of *rs7676539* and *rs8063760* in a cohort of healthy children compared with ones having very high intensity of dental caries.

Ключевые слова: *ANXA5*, *CALB2*, генетический полиморфизм, кариес.

Keywords: *ANXA5*, *CALB2*, genetic polymorphism, caries.

Использование молекулярно-генетических методов для выявления эндогенных причин повышенного риска развития мультифакторных патологий является относительно новым научным направлением, возникшим на стыке ряда биологических и медицинских дисциплин. При этом, если поиск информативных генетических маркеров сердечно-сосудистых заболеваний осуществляется с 90-х годов прошлого века, то аналогичные исследования в области анализа генетических факторов кариеса начались интенсивно лишь в последнее десятилетие [5, с. 7 – 9; 13, с. 224 – 229]. Учитывая повсеместную широкую распространенность патологии и низкую эффективность профилактических мер, такие изыскания представляются весьма актуальными.

Немногочисленные исследования, посвященные молекулярной генетике кариеса, касались изучения этиологической роли полиморфных участков генов структурных белков, участвующих в формировании зубной эмали (амелогенезе) [1, с. 12 – 16; 5, с. 8 – 13; 7, с. 79 – 85, 8, с. 394 – 400], а также генов ферментов деструкции этих белков в ходе минерализации ткани [2, с. 36 – 40]. Вместе с тем очевидно, что генная сеть кариеса не ограничивается названными участниками. В данной работе впервые предпринята попытка анализа полиморфизма генов обмена кальция у лиц с различной степенью поражения зубов кариесом. Такими кандидатами выступили гены аннексина A5 (*ANXA5*) и кальбиндина 2 (*CALB2*), они кодируют кальций-связывающие белки, широко представленные в различных органах и тканях, а

также в жидких средах организма человека [6, 10 – 12]. Физиологические и клинические эффекты полиморфизма отдельных участков *ANXA5* и *CALB2* практически не изучены. При выборе нами ДНК-маркера для изучения ключевым стал фактор распространенности его аллелей в популяциях человека. При характеристике такой распространенной патологии, как кариес зубов информативным может быть генетический маркер с высокой частотой альтернативных вариантов. Такому условию соответствуют сайты *rs7676539 ANXA5* и *rs8063760 CALB2*.

Материалы и методы

На этапе формирования выборки было проведено стоматологическое обследование среди детей европеоидной принадлежности, посещающих дошкольные образовательные учреждения г. Кемерово. Изучение стоматологического статуса ребенка предполагало определение индивидуальной интенсивности поражения временных зубов кариесом с помощью индекса КПУ (сумма кариозных, пломбированных и удаленных зубов временного прикуса, при этом удаленные в результате физиологической смены зубы не учитывались). С целью нивелирования временного фактора в развитии патологии дополнительно устанавливали индивидуальный уровень интенсивности кариеса (УИК). Использование данного показателя сделало обоснованным объединение детей различного возраста при статистическом анализе и возможным сравнение разновозрастных групп. УИК рассчитывали как ча-

стное от деления КПУ на возраст обследуемого в соответствии с методикой, предложенной П.А. Лесусом (1990) [4]. Здоровые лица характеризовались величиной УИК, равной нулю, при значении показателя не более 0,4 индекс оценивали как низкий; в пределах 0,5 – 0,8 – средний; в пределах 0,9 – 1,2 – высокий и от 1,3 включительно – очень высокий [3].

Последующее генотипирование было проведено среди 192 детей (98 мальчиков и 94 девочки) в возрасте от 2 до 6 лет. Средний возраст обследованных составил $4,2 \pm 0,09$ года. Эта выборка включала две когорты детей с контрастными значениями изучаемого признака (лица со здоровыми зубами (I группа) и индивидуумы, имеющие очень высокое значение УИК (II группа)). Возраст детей в каждой из двух субвыборок находился в пределах 2 – 6 лет. Средний возраст обследованных в группах I и II составил 4,0 и 4,3 года соответственно, соотношение полов в каждой из когорт было близко к 1:1, что делало правомерным их сопоставление в ходе последующего анализа.

Молекулярно-генетическое исследование проведено в центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВПО КемГМА Минздравсоцразвития России. Источником ДНК послужили буккальные соскобы, взятые у обследованных детей. Выделение ДНК осуществляли сорбентным методом с использованием комплекта реагентов производства НПФ «Литех». В качестве сайтов, содержащих одонуклеотидные полиморфизмы, были выбраны маркеры *rs7676539* (*G>A*) гена *ANXA5* и *rs8063760* гена *CALB2* (*C>T*). Для идентификации полиморфизмов применяли амплификацию соответствующих участков методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции с последующей детекцией ампликонов методом электрофореза в 3 % агарозном геле. В работе использованы тест-системы, разработанные в НПФ «Литех» (г. Москва).

Для статистической обработки данных использовался пакет «Statistica 6.0». Соотношения аллелей и генотипов в сравниваемых группах сопоставлялись с помощью метода χ^2 для таблиц 2×2 с использованием поправки Йетса в случаях наличия в таблице малых численностей (менее 10).

Результаты и обсуждение

Следует отметить, что информация о частотах генотипических вариантов двух выбранных полиморфных маркеров среди представителей различных этнических групп и в целом по миру является очень скудной. Единственным источником, предостав-

ляющим такого рода данные для сравнения с собственными результатами, является всемирная база данных «dbSNP» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Такого рода сравнение позволяет, в какой-то степени, оценить корректность полученных результатов и в некоторых случаях выявить генетическую специфику изучаемой популяции. Изучение указанного источника показало, что представленные в работе данные о частотах полиморфизмов двух генетических маркеров являются уникальными для населения Сибири и, по всей видимости, Российской Федерации.

По результатам исследования материалов dbSNP о распространенности аллелей и генотипов маркера *rs7676539* гена *ANXA5* удалось сделать заключение о преобладании аллеля *G* (54 %) среди представителей европеоидной принадлежности. Наши данные согласуются с этой информацией: в общей группе обследованных частоты аллелей *G* и *A* составили 55,5 % и 44,5 % соответственно. Безусловно, полученная нами выборка не является рандомизированной в связи с использованием при отборе показателя уровня интенсивности кариеса и поэтому не вполне соответствует популяции жителей изучаемого региона. Вместе с тем полученные данные достаточно точно характеризуют генетическую структуру такой популяции, учитывая высокую долю представителей двух рассмотренных нами когорт среди детского населения в целом [2, с. 36 – 40].

Аналогично, полученные нами данные о распространенности среди европеоидов Кемерово генетических вариантов полиморфного маркера *rs8063760* гена *CALB2* в значительной степени соответствуют информации dbSNP. Частоты аллелей *C* и *T* в изученной нами выборке составили 72,9 % и 27,1 %, тогда как соответствующие величины, установленные в наиболее объемной группе обследованных европеоидов, составили 73,3 % и 26,7 %.

Сопоставление частот генотипов полиморфного маркера *rs7676539* гена *ANXA5* у обследованных детей с различным уровнем кариеса показало отсутствие статистически значимых отличий между группами по всем наблюдаемым вариантам (таб. 1). В обеих группах преобладали генотипы, включающие аллель *G*, при значительном доминировании сочетания *GA*. Это связано с несколько большей частотой указанного аллеля по сравнению с альтернативным вариантом *A* как в группе здоровых обследованных (54,6 %), так и среди детей с очень высоким значением УИК (56,4 %).

Таблица 1

**Частоты генотипов и аллелей полиморфного маркера *rs7676539*
гена *ANXA5* у обследованных детей с различным уровнем кариеса**

Группа	Показатель	Генотип			Аллель	
		GG	GA	AA	G	A
Здоровые (I группа, n = 97)	частота, %	28,9	51,5	19,6	54,6	45,4
	численность	28	50	19	106	88
С очень высоким УИК (II группа, n = 94)	частота, %	29,8	53,2	17,0	56,4	43,6
	численность	28	50	16	106	82
χ^2 (p)		0,02 (0,89) ^a	0,05 (0,82) ^б	0,21 (0,65) ^в	0,12 (0,73)	

Примечание: а – при сопоставлении генотипа GG со всеми прочими генотипами;

б – при сопоставлении генотипа GA со всеми прочими генотипами;

в – при сопоставлении генотипа AA со всеми прочими генотипами.

Относительное повышение распространенности варианта G во второй группе по сравнению с первой не носило достоверного характера ($\chi^2 = 0,12$; $p > 0,05$). Проведенный статистический анализ позволяет заключить, что вероятнее всего ни один генетический вариант изучаемого полиморфного маркера не является самостоятельно значимым при формировании предрасположенности или резистентности к кариесу среди дошкольников.

Сопоставлены частоты генотипов полиморфного маркера *rs8063760* гена *CALB2* в группе здоровых детей и у обследованных с очень высоким уровнем кариеса (таблица 2). Как видно, из всех генотипов лишь сочетание CC чаще встречалось среди обследованных группы II. Однако такое увеличение час-

тоты не являлось статистически значимым ($\chi^2 = 0,77$; $p > 0,05$). Отмеченное недостоверное повышение распространенности одного из генотипов среди детей с очень высоким УИК объясняется смещением соотношения аллелей, ассоциированных с данным маркером, в сторону повышения доли варианта C. В данной группе его частота достигла 75,3 %, тогда как в группе I эта величина составила 70,6 %. Сравнение соотношений частот аллелей в двух когортах показало отсутствие статистически значимого отличия между ними ($\chi^2 = 1,05$; $p > 0,05$). Очевидно, изолированные полиморфные варианты маркера *rs8063760* гена *CALB2* не являются информативными при выявлении риска развития детского кариеса.

Таблица 2

**Частоты генотипов и аллелей полиморфного маркера *rs8063760*
гена *CALB2* у обследованных детей с различным уровнем кариеса**

Группа	Показатель	Генотип			Аллель	
		CC	CT	TT	C	T
Здоровые (I группа, n = 97)	частота, %	49,5	42,3	8,2	70,6	29,4
	численность	48	41	8	137	57
С очень высоким УИК (II группа, n = 95)	частота, %	55,8	38,9	5,3	75,3	24,7
	численность	53	37	5	143	47
χ^2 (p)		0,77 (0,38) ^a	0,22 (0,64) ^б	0,29 (0,59) ^в	1,05 (0,31)	

Примечание: а – при сопоставлении генотипа CC со всеми прочими генотипами;

б – при сопоставлении генотипа CT со всеми прочими генотипами;

в – при сопоставлении генотипа TT со всеми прочими генотипами.

Выводы

1. Частоты генетических вариантов маркеров *rs7676539* гена *ANXA5* и *rs8063760* гена *CALB2*, установленные нами в выборке дошкольников евро-

пеоидной принадлежности, проживающих в крупном городе Западной Сибири, согласуются с показателями, характерными для европеоидов в целом.

2. Наличие тех или иных генотипов или аллелей маркеров *rs7676539* и *rs8063760*, рассмотренных изолированно, не является фактором, достоверно повышающим риск возникновения кариеса среди детей европеоидной этнической принадлежности, проживающих на территории г. Кемерово.

Завершая обсуждение результатов исследования, следует отметить, что поиски генетических маркеров, ассоциированных с низкой устойчивостью зубной эмали к кариесогенным воздействиям, находятся в начальной стадии. Это в равной мере относится как к отечественным, так и зарубежным исследованиям. Поиск осложняется недостаточной разработанностью концепции генетического регулирования амелогенеза и отсутствием четкого представления о геной сети кариеса как мультифакторного заболевания. Для решения данного вопроса необходимы дальнейшие открытия и теоретические изыскания в области физиологии, биохимии и генетики твердых тканей зубов.

Литература

1. Волков, А. Н. Значение полиморфизма генов человека, участвующих в амелогенезе и формировании микросреды ротовой полости, для развития кариеса / А. Н. Волков, Л. Ю. Лошакова // Медицинская генетика. – 2011. – Т. 10. – № 2(104).
2. Волков, А. Н. Полиморфизм генетических маркеров *rs2664152* и *rs2664153*, расположенных в 5'-области, по соседству с геном *KLK4*, среди детей дошкольного возраста с различным уровнем кариеса / А. Н. Волков, Л. Ю. Лошакова, А. С. Сухих // Медицинская генетика. – 2011. – Т. 10. – № 9(111).
3. Корчагина, В. В. Лечение кариеса зубов у детей раннего возраста. – М.: МЕДпресс-Информ, 2008. – 168 с.
4. Стоматологический уровень здоровья: рекомендации по методике определения / под ред. П. А. Леус. – М., 1990. – 39 с.
5. Deeley, K. Possible association of amelogenin to high caries experience in a Guatemalan-Mayan population / K. Deeley, A. Letra, E. K. Rose et al. // Caries Res. – 2008. – V. 42.
6. Homann, V. Calcium transport in human salivary glands: a proposed model of calcium secretion into saliva / V. Homann, E. Kinne-Saffran, W. H. Arnold et al. // Histochem Cell Biol. – 2006. – V. 125.
7. Ouryouji, K. Analysis of mutations in the amelogenin and the enamel genes in severe caries in Japanese pediatric patients / K. Ouryouji, Y. Imamura, Y. Fujigaki et al. // Pediatric Dental Journal. – 2008. – V. 18.
8. Patir, A. Enamel formation genes are associated with high caries experience in Turkish children / A. Patir, F. Seymen, M. Yildirim et al. // Caries Res. – 2008. – V. 42.
9. Rajpar, M. H. Mutation of the gene encoding the enamel-specific protein, amelogenin, causes autosomal-dominant amelogenesis imperfecta / M. H. Rajpar, K. Harley, C. Laing et al. // Hum. Molec. Genet. – 2001. – V. 10.
10. Tetè, S. Microarray expression profiling of human dental pulp from single subject / S. Tetè, F. Mastrangelo, A. P. Scioletti et al. // Clin Invest Med. – 2008. – V. 31(2).
11. Gerke, V. Annexins: from structure to function / V. Gerke, S. E. Moss // Physiol Rev. – 2002. – V. 82.
12. Wescott, D. C. Osteogenic gene expression by human periodontal ligament cells under cyclic tension / D. C. Wescott, M. N. Pinkerton, B. J. Gaffey et al. // J Dent Res. – 2007. – V. 86(12).
13. Wright, J. T. Human and mouse enamel phenotypes resulting from mutation or altered expression of AMEL, ENAM, MMP20 and KLK4 / J. T. Wright, T. C. Hart, P. S. Hart // Cells Tissues Organs. – 2009. – V. 189.