

**ОРТОДОНТИЧНИЙ РОЗДІЛ**

DOI 10.35220/2078-8916-2019-34-4-25-29

УДК 575.117.2:616.314-089.23

**А. Э. Деньга, к. мед. н., В.В. Бубнов, к. мед. н.,  
С. А. Шнайдер, д. мед. н.**

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

**МЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ,  
УЧАСТВУЮЩИХ В КОСТНОМ  
МЕТАБОЛИЗМЕ У ПАЦИЕНТОВ  
С ЗУБОЧЕЛЮСТНЫМИ АНОМАЛИЯМИ  
НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО  
ПАРОДОНТИТА И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО  
СИНДРОМА**

*Показано, что у пациентов, направленных на ортодонтическое лечение с различной степенью пародонтита на фоне метаболического синдрома, наблюдается увеличение в тканях десны уровня метилирования промотора гена RANKL при хроническом генерализованном пародонтите 2-3 степени по сравнению с начальной-1 степени, что свидетельствует об усилении резорбтивной функции гена RANKL при этом. Кроме того, наблюдалась корреляция (коэффициент корреляции – 0,68) между метилированием промоторов генов RANKL и INF $\gamma$ . Содержание метилированной ДНК гена LEP у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом было достоверно выше при сочетании его с метаболическим синдромом и достоверно не отличалось у пациентов с разной степенью хронического генерализованного пародонтита в отсутствие метаболического синдрома. Полученные результаты необходимо учитывать при разработке лечебно-профилактических мероприятий сопровождения ортодонтического лечения зубочелюстных аномалий на фоне хронического генерализованного пародонтита разной степени тяжести и метаболического синдрома.*

**Ключевые слова:** метилирование генов, костный метаболизм, ортодонтическое лечение, пародонтит, метаболический синдром.

**А.Э. Деньга, В.В. Бубнов, С. А. Шнайдер**

Державна установа «Інститут стоматології  
та щелепно-лицевої хірургії  
Національної академії медичних наук України»

**МЕТИЛУВАННЯ ПРОМОТОРІВ ГЕНІВ,  
ЩО БЕРУТЬ УЧАСТЬ У КІСТКОВОМУ  
МЕТАБОЛІЗМУ У ПАЦІЄНТІВ  
ІЗ ЗУБОЩЕЛЄПНИМИ АНОМАЛІЯМИ  
НА ТЛІ ХРОНІЧНОГО ПАРОДОНТИТУ  
І МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ**

*Показано, що у пацієнтів, спрямованих на ортодонтичне лікування із різним ступенем пародонтиту на тлі метаболічного синдрому, спостерігається збільшення в тканинах ясен рівня метилування промотору гена RANKL при хронічному генералізованому пародонтиті 2-3 ступеня в порівнянні з початковою-1 ступенем, що свідчить про посилення резорбтивної функції гена RANKL при цьому. Крім того, спостерігалася кореляція (коефіцієнт кореляції – 0,68) між метилуванням промоторів генів RANKL і INF $\gamma$ . Вміст метильованої ДНК гена LEP у пацієнтів з хронічним генералізованим пародонтитом був достовірно вище при поєднанні його з метаболічним синдромом і достовірно не відрізнявся у пацієнтів з різним ступенем хронічного генералізованого пародонтиту у відсутності метаболічного синдрому. Отримані результати необхідно враховувати при розробці лікувально-профілактичних заходів супроводу ортодонтичного лікування зубощелепних аномалій на тлі хронічного генералізованого пародонтиту різного ступеня тяжкості і метаболічного синдрому.*

**Ключові слова:** метилування генів, кістковий метаболізм, ортодонтичне лікування, пародонтит, метаболічний синдром.

**A.E. Denga, V.V. Bubnov, S. A. Shnajder**

State Establishment «The Institute of Stomatology  
and Maxillo-Facial Surgery National Academy  
of Medical Science of Ukraine»

**METHYLATION OF GENES PROMOTERS  
PARTICIPATING IN BONE METABOLISM  
IN DENTOFACIAL ABNORMALITIES  
PATIENTS ON THE BACKGROUND  
OF CHRONIC PERIODONTITIS  
AND METABOLIC SYNDROME**

**ABSTRACT**

*It was shown that in patients referred on orthodontic treatment with varying degrees of periodontitis on the background of metabolic syndrome, there is an increase of RANKL gene promoter methylation level in gum tissues in case of chronic generalized periodontitis of 2nd or 3rd degree, which indicates enhancing the resorptive function of the RANKL gene in this case. In addition, a correlation was observed (correlation coefficient 0.68) between methylation of the RANKL and INF $\gamma$  gene promoters. The content of methylated DNA of the LEP gene in patients with chronic generalized periodontitis was significantly higher when combined with metabolic syndrome and did not significantly differ in patients with different degrees of chronic generalized periodontitis in absence of metabolic syndrome. The results obtained should be taken into account in development of therapeutic and preventive measures to support orthodontic treatment of dentoalveolar anomalies on the background of chronic*

generalized periodontitis of varying severity and metabolic syndrome.

**Key words:** gene methylation, bone metabolism, orthodontic treatment, periodontitis, metabolic syndrome.

Метаболические процессы в костных тканях при ортодонтическом лечении ЗЧА достаточно сложны. Костная ткань постоянно находится в процессе ремоделирования и регулируется сетью генов RANK-RANKL-OPG [1-3]. RANKL, связываясь с рецептором RANK, стимулирует созревание и стимуляцию остеокластов. Остеопрогерин (OPG) регулирует резорбтивную функцию RANKL, связываясь с ним, тормозит созревание и активацию остеокластов. Ген *IFN $\gamma$*  является ингибитором экспрессии RANKL [4]. Его повышенная экспрессия Т-лимфоцитами приводит к быстрой деградации протеинов TRAF6 и блокированию функции RANKL. Ген *LEP* играет ключевую роль в регуляции баланса энергии и контроля веса тела, регулирует костную массу и секрецию гипоталамо-гипофизарно-

надпочечниковых гормонов, влияет на врожденный и адаптивный иммунитет [5-8].

Природные процессы экспрессии генов и их участия в костном метаболизме нарушаются при различной патологии в организме. Одну из главных ролей в этих нарушениях играет ряд системных нарушений в организме, объединяемых понятием метаболический синдром (МС), а также воспалительные процессы в организме и, в частности, в тканях пародонта.

Влияние различной соматической патологии на метаболические процессы в костных тканях пародонта в процессе ортодонтического перемещения зубов необходимо учитывать при лечении зубочелюстных аномалий (ЗЧА) и разработке лечебно-профилактических мероприятий сопровождения такого лечения. Одним из способов регуляции экспрессии гена является метилирование его промоторов или первого экзона [10, 11].

**Цель данной работы.** Изучение уровня метилирования промоторов генов, являющихся ключевыми регуляторами моделирования костных тканей, у пациентов с ЗЧА и различными стадиями пародонтита на фоне МС.

Таблица 1

#### Последовательность праймеров генов

Гены	Праймер	T <sup>0</sup> C
<i>Rankl</i>	F-5' – [Biotin] TTTTGGATTTGATTAGTTTGATATAAGAA-3	52
<i>Rankl</i>	R-5'-CATTTTCAACCACAAACAAATACTATTA-3	
<i>Rankl</i>	Seq-AGTTAGGTGTGGGATATAGT	
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	F-5'-[Biotin] TTTGTAAAGGTTTGAGAGGTTTLAGAAT-3'	49
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	R-5'-CAAACCCATTATACCCACCTATACCA-3'	
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	Seq- 5'-TTTTATACCTCCCCACTT-3'	
<i>LEP</i>	F-[Biotin]GAGTGTGAGGGGTATTTTGTATG	52
<i>LEP</i>	R-GCAACCATAATAAACCCCTACACCTTC	
<i>LEP</i>	Seq-AAACCCCTACACCTTCTATCT	

**Материалы и методы.** Ткань десны была взята у 15 пациентов 25-45 лет, направленных на ортодонтическое лечение, с МС и хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) начальной-1 степени тяжести (8 человек) и у пациентов с ХГП 2-3 степени тяжести (7 человек).

Концентрацию ДНК в генах RANKL, *IFN $\gamma$*  и *LEP*, определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Epplen и доводили до концентрации 1 мкг/мл во всех пробах. Бисульфитную обработку выделенной ДНК проводили с помощью набора EpiTect Plus Bisulfite Kits (Qiagen). Амплификацию ДНК проводили с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) по программе: 95<sup>0</sup> С – 15 мин.; 95<sup>0</sup> С – 30 сек., отжиг праймеров – 30 сек., элонгация – 72<sup>0</sup> С – 30 сек. (39 циклов); 72<sup>0</sup> С – 10 мин. (табл.).

Пиросеквенирование проводили на приборе

PyroMark Q24, содержание метилированной ДНК в пробе оценивали с помощью программы PyroMark CpG software 2.01.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты проведенных исследований приведены на рисунках 1-3. Было установлено, что у пациентов с ХГП начальной-1 степени среднее значение содержания метилированной ДНК гена RANKL в образцах тканей десны составило 7,2 ± 2,4 %, что практически было в 2 раза меньше чем у больных с ХГП 2-3 степени (13,1 ± 2,5 %) (рис.1).

Показано также, что в первой группе больных с хроническим пародонтитом легкой степени содержание метилированной ДНК гена *IFN $\gamma$*  в образцах ткани десен составило 64,2±5,7 % и было достоверно выше, чем у пациентов с 2-3 стадией пародонтита (43,0±11,7 %). Выявлена также высокая отрицательная корреляция между метили-

рованием промотора гена RANKL и метлированием промотора гена INFγ (рис. 2). Эти данные согласуются с данными о том, что повышение

экспрессии гена INFγ приводит к блокированию функции RANKL и снижению его экспрессии [12].

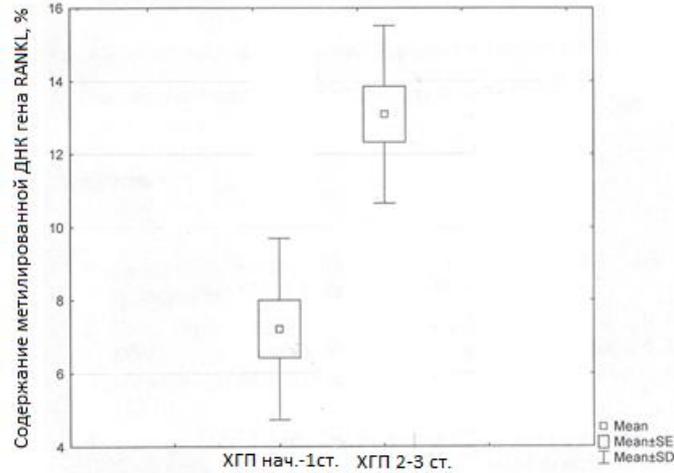


Рис. 1. Сравнение результатов метилирования промотора гена RANKL в тканях десны у пациентов с пародонтитом начальной-1 степени и 2-3 степени и метаболическим синдромом, %.

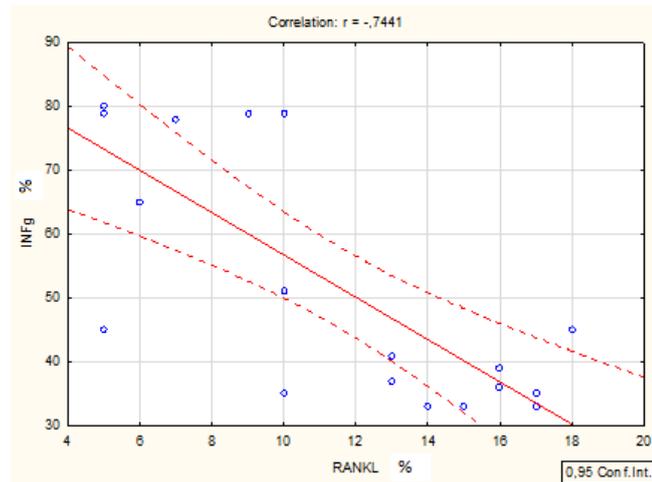


Рис. 2. Отрицательная корреляция между метилированием промоторов генов RANKL и INFγ в образцах ткани дёсен у пациентов с хроническим пародонтитом 2-3 степени и метаболическим синдромом.

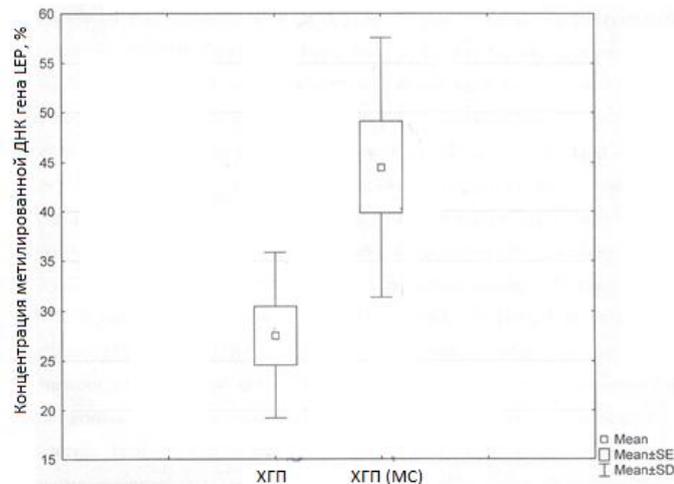


Рис. 3. Сравнительный анализ концентрации метилированной ДНК гена LEP у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом без метаболического синдрома и с метаболическим синдромом

Результаты метилирования генов RANKL и INF $\gamma$  свидетельствуют о том, что они могут служить потенциальными маркерами оценки прогрессирования пародонтита и развития остеопороза на фоне МС при ортодонтическом лечении.

Кроме того, было показано, что в случае отсутствия патологии МС результаты метилирования промотора гена LEP в образцах тканей десны с ХГП разной степени тяжести достоверно не отличались.

В то же время при сочетании у пациентов с ХГП разной степени тяжести с МС в образцах десен наблюдалось достоверное повышение содержания метилированной ДНК гена LEP по сравнению со случаем отсутствия МС (рис. 3).

**Выводы.** Показано, что у пациентов, направленных на ортодонтическое лечение с различной степенью пародонтита на фоне МС, наблюдается увеличение в тканях десны уровня метилирования промотора гена RANKL при ХГП 2-3 степени по сравнению с ХГП начальной-1 степени, что свидетельствует об усилении резорбтивной функции гена RANKL при этом. Кроме того, наблюдалась отрицательная корреляция (коэффициент корреляции – 0,744) между метилированием промоторов генов RANKL и INF $\gamma$ . Содержание метилированной ДНК гена LEP у пациентов с ХГП было достоверно выше при сочетании ХГП с МС и достоверно не отличалось у пациентов с разной степенью ХГП в отсутствии МС. Полученные результаты необходимо учитывать при разработке лечебно-профилактических мероприятий сопровождения ортодонтического лечения ЗЧА на фоне ХГП разной степени тяжести и МС.

### *Список литературы*

1. **Boyce B.F.** Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin / B.F. Boyce, L. Xing // *Arthritis Res Ther.* – 2007. – №. 9. – P. 56-62.
2. Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase / Peter Stepper, Goran Kungulovski, Renata Z. [and all] // *Nuclear Acide research.* – 2017. – Vol. 45 (4). – P. 1703-1713.
3. **Atkins G.J.** RANKL expression is related to the differentiation state of human osteoblasts / G.J. Atkins, P. Kostakb, B. Pan // *J Bone Miner Res.* – 2003. – 18(6). – P. 1088-1098.
4. Blockade of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANKL) signaling improves hepatic insulin resistance and prevents development of diabetes mellitus / S. Kiechl, J. Wittmann, A. Giaccari [et al.] // *Nat Med.* – 2013. – №. 1. – P. 358-363.
5. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$  / H. I. Takayanagi, K. Ogasawara, S. Hida [et al.] // *Nature.* – 2000. – No. 30. – P. 600-605.
6. **Saxena N.K.** leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3 / N.K. Saxena, P.M. Vertino, F.A.

Anania, D. Sharma // *J Biol Chem.* – 2007. – Vol. 4. – №. 282(18). – P. 13316-25.

7. **Vuolteenaho K.** Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage—mediator role of NO in leptin-induced PGE2, IL-6, and IL-8 production / K. Vuolteenaho, A. Koskinen, M. Kukkonen // *Mediators Inflamm.* – 2009. – №. 13. – P. 55-60.

8. Фильченков А. А. Лептин, адипоциты и ожирение организма / А. А. Фильченков, В. Н. Залесский // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2007. – №3. – С. 30-35.

9. **Noriko Iikunil** Leptin and Inflammation / Noriko Iikunil, Queenie Lai Kwan Lam, Liwei Lu // *Curr Immunol Rev.* – 2008. – Vol. 1. – №. 4(2). – P. 70-79.

10. Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase / Peter Stepper, Goran Kungulovski, Renata Z. [et al.] // *Nuclear Acide research.* – 2017. – Vol. 45 (4). – P.1703-1713.

11. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers / Isaac B Hilton Anthony M D'Ippolito, Christopher M Vockley [et al.] // *NATURE BIOTECHNOLOGY.* – 2015. – №.33. – P. 510-517.

12. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$  / H. Takayanagi, K. Ogasawara, S. Hida, [et al.] // *Nature.* – 2000. – № 30. – P. 600-605.

### **REFERENCES**

1. **Boyce BF, Xing L.** Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 2007;9:56-62.
2. **Peter Stepper, Goran Kungulovski, Renata Z. [and all]** Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase. *Nuclear Acide research.* 2017;45 (4):1703-1713.
3. **Atkins GJ, Kostakb P. Pan B.** RANKL expression is related to the differentiation state of human osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2003;18(6):1088-1098.
4. **Kiechl S, Wittmann J, Giaccari A, Knoflach M, Willeit P, Bozec A et al.** Blockade of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANKL) signaling improves hepatic insulin resistance and prevents development of diabetes mellitus. *Nat Med.* 2013;1:358-363.
5. **Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, [et al.]**. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$ . *Nature.* 2000;30:600-605.
6. **Saxena NK, Vertino PM, Anania FA, Sharma D.** leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. *J Biol Chem.* 2007;4;282(18):13316-25.
7. **Vuolteenaho K, Koskinen A, Kukkonen M.** Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage – mediator role of NO in leptin-induced PGE2, IL-6, and IL-8 production. *Mediators Inflamm.* 2009;13:55-60.
8. **Filchenkov A. A, Zalessky V. H.** *Leptin, adiposity i ozhireniye organizma* [Leptin, adipocytes and obesity]. *Rossyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* 2007;3:30-35.
9. **Noriko Iikunil, Queenie Lai Kwan Lam, Liwei Lu.** Leptin and Inflammation. *Curr Immunol Rev.* 2008;1;4(2):70-79.
10. **Peter Stepper, Goran Kungulovski, Renata Z. [et al.]** Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase. *Nuclear Acide research.* 2017;45(4):1703-1713.
11. **Isaac B Hilton Anthony M D'Ippolito, Christopher M Vockley [et al.]**. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-

based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. NATURE BIOTECHNOLOGY. 2015;33:510-517.

Поступила 26.11.19

12. **Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, [et al.]**. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. Nature. 2000;30:600-605.

