

# СОЧЕТАННОЕ ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА EDN1 (RS5370) И NOS3 (RS2070774) НА ПОКАЗАТЕЛИ ИНДЕКСА КПУ

## COMBINATION OF POLYMORPHIC ALLELES OF THE EDN1 (RS5370) AND NOS3 (RS2070774) GENES ON DMF INDEX INDICES

**N. Bebyakova  
S. Levitsky  
N. Davydova  
A. Galieva  
E. Zhibort**

*Summary.* The article presents the results of the study to establish the relationship between the presence of polymorphic variants of endothelin-1 (EDN1) (rs5370), endothelial nitric oxide synthase (NOS3) (rs2070774) genes and the intensity of the processes of formation and development of dental caries, assessed by the DMF index. In practically healthy young men and girls living in the territory of the European North, a molecular genetic study by PCR with a fluorescent scheme of product detection in real time mode was carried out, levels of vasoactive endothelial factors — nitric oxide (by biochemical method) and endothelin-1 (by immunologic method) were determined, the DMF index (caries + fillings + extracted teeth) and the degree of carious process intensity under the combined influence of polymorphic variants of EDN1 and NOS3 genes were determined. It was found that the presence of rs5370 and rs2070774 in the genotype led to an increase in the frequency of individuals with decompensated stage of dental caries, and therefore single nucleotide substitutions (SNPs) in EDN1 (rs5370) and NOS3 (rs2070774) genes can be considered as markers of changes in resistance to this disease.

*Keywords:* gene polymorphism, nitric oxide, endothelin-1, dental caries, DMF index.

**Бебякова Наталья Александровна**

доктор биологических наук, профессор,  
Северный государственный медицинский университет,  
г. Архангельск  
nbebyakova@mail.ru

**Левицкий Сергей Николаевич**

кандидат биологических наук, доцент,  
Северный государственный медицинский университет,  
г. Архангельск  
sergeylevitski@yandex.ru

**Давыдова Надежда Геннадьевна**

кандидат медицинских наук, доцент,  
Северный государственный медицинский университет,  
г. Архангельск  
nadindavydova@mail.ru

**Галиева Александра Сергеевна**

аспирант, Северный государственный медицинский  
университет, г. Архангельск  
alexgalieva@yandex.ru

**Жиборт Екатерина Леонидовна**

кандидат биологических наук, доцент,  
Северный государственный медицинский университет,  
г. Архангельск  
zhibort71@yandex.ru

*Аннотация.* В статье представлены результаты исследования по установлению взаимосвязи между наличием полиморфных вариантов генов эндотелина-1 (EDN1) (rs5370), эндотелиальной синтазы оксида азота (NOS3) (rs2070774) и интенсивностью процессов образования и развития кариеса зубов, оцененного по показателю индекса КПУ. У практически здоровых юношей и девушек, проживающих на территории Европейского Севера, было проведено молекулярно-генетическое исследование методом ПЦР с флуоресцентной схемой детекции продуктов в режиме реального времени, определены уровни вазоактивных эндотелиальных факторов — оксида азота (биохимическим методом) и эндотелина-1 (иммунологическим методом), определен индекс КПУ (кариес + пломбы + удаленные зубы) и степень интенсивности кариозного процесса при сочетанном влиянии полиморфных вариантов генов EDN1 и NOS3. Установлено, что наличие в генотипе rs5370 и rs2070774 приводило к увеличению частоты встречаемости лиц с декомпенсированной стадией кариеса зубов, в связи с чем однонуклеотидные замены (SNP) в генах EDN1 (rs5370) и NOS3 (rs2070774) возможно рассматривать как маркеры изменения резистентности к данному заболеванию.

*Ключевые слова:* полиморфизм генов, оксид азота, эндотелин-1, кариес зубов, индекс КПУ.

## Введение

Важнейшими факторами эндотелиального происхождения, которые обуславливают регуляцию периферического сосудистого тонуса, являются эндотелин-1 (EDN1) и оксид азота (NO). Многочисленными экспериментальными исследованиями на животных и клиническими наблюдениями установлено вазоконстрикторное влияние EDN1 и вазодилатационное влияние NO на тонус кровеносных сосудов [1, 2]. При этом состояние тканей пародонта и их кровоснабжение напрямую зависят от состояния эндотелия [3, 5], а эндотелиальная дисфункция при различных стоматологических заболеваниях обусловлена, прежде всего, нарушением нормальной секреции NO и EDN1 [4]. Полиморфные варианты генов вазоактивных эндотелиальных факторов способны приводить к формированию различной патологии, в том числе и органов полости рта [6, 7].

Ген эндотелиальной NO-синтазы (*NOS3*) расположен в локусе 7q35-36 (chr7:150992991) [14], а одним из наиболее изученных полиморфизмов в нем является rs2070774. Он представляет собой однонуклеотидную замену в области промотера — T (-786)C [8, 9, 10]. Ген *EDN1* расположен в локусе 6p24.1 (chr6:12296022), а полиморфизм rs5370 представляет собой трансверсию G594T, вызывающую аминокислотную замену (р. Lys198Asn) и ассоциированную с развитием вазоконстрикторной реакции периферических сосудов [11, 12, 13].

Имеются данные о взаимосвязях степени развития заболеваний пародонта, в основе которых могут лежать нарушения микроциркуляции, и степенью активности кариозного процесса (индекс КПУ) [14, 15], поэтому **целью** данного исследования явилось установление взаимосвязи между степенью интенсивности кариеса зубов и сочетанным влиянием на этот процесс полиморфизмов G594T гена *EDN1* и T(-786)C гена *NOS3* у молодого населения, проживающего в условиях северных широт РФ (Архангельская область).

## Методы и организация исследования

Исследуемая группа составила 62 человека, практически здоровых юношей и девушек (средний возраст — 18,2 лет; 95 % ДИ 17,9–19,4).

Анализировали геномную ДНК, выделенную из лейкоцитов цельной крови с помощью реагентов фирмы «Литех» (Россия). Полиморфизм генов определяли с помощью двух типов реагентов фирмы «Литех» (Россия) методом ПЦР с флуоресцентной схемой детекции продуктов в режиме реального времени на амплификаторе LightCycler96 (Roche, Швейцария/Германия). Для определения полиморфизма гена *NOS3* T(-786)C в реакционной смеси содержались праймеры, необходимые для ам-

плификации участка, содержащего полиморфизм, и два аллель-специфичных гидролизных зонда, содержащих полиморфный сайт. Зонд, содержащий полиморфизм аллель 1, был мечен флуорофором HEX, аллель 2 — флуорофором FAM. Дискриминация аллелей осуществлялась за счёт различной эффективности разрушения Taq-полимеразой полностью и неполностью комплементарного зонда. С образцом выделенной ДНК для определения полиморфизма гена *EDN1* G594T параллельно проводились две реакции амплификации — с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Для детекции амплифицированного фрагмента ДНК использовался интеркалирующий краситель SYBR Green, специфичный к двухцепочечной ДНК.

В соответствии с изучаемыми полиморфизмами генов для установления их сочетанного действия было выделено 4 экспериментальные группы:

- 1) G594G (rs5370) + T (-786) T (rs2070774) (мутантные аллели отсутствовали в обоих генотипах);
- 2) G594T, T594T (rs5370) + T (-786) T (rs2070774) (мутантный аллель (аллели) представлен только в гене *EDN1*);
- 3) G594G (rs5370) + T (-786) C, C (-786) C (rs2070774) (мутантный аллель (аллели) представлен только в гене *NOS3*);
- 4) G594T, T594T (rs5370) + T (-786) C, C (-786) C (rs2070774) (мутантный аллель (аллели) представлены в обоих генотипах).

Уровень NO определяли биохимическим методом, EDN1 — иммуноферментным.

Для оценки состояния вазоактивной системы NO — EDN1 использовали показатель отношения концентрации метаболитов NO к концентрации EDN1: NOx (мкмоль/л)/ EDN1 (фмоль/мл) [отн. ед.]. Данный коэффициент указывает на дисбаланс между процессами вазоконстрикции и вазодилатации и возможность риска развития сосудистой патологии [16].

Индекс КПУ оценивали как сумму кариозных (К), пломбированных (П) и удаленных (У) зубов (по Виноградовой Т.Ф.) с выделением компенсированной, субкомпенсированной и декомпенсированной степеней.

Статистическая обработка полученных результатов, оценка распределения показателей, сравнительный анализ выборок проведен с помощью пакета программ для статистической обработки «STATA» («Stata Corp», TX, USA) общепринятыми методами статистической обработки. Количественные данные были подвергнуты анализу на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка и представлены с указанием медианного значения (Me) и 1 и 3 квартиля (Q1, Q3). Взаимосвязь между количественными данными и вариан-

тами генотипов оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Парные сравнения проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Частота распределения генотипов анализировалась с помощью теста хи-квадрата Пирсона. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез  $p \leq 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

В изучаемой популяции эмпирическое распределение аллелей и генотипов соответствовало теоретически ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга ( $p > 0,05$ ) и не отличалось от других российских популяций, данные которых были взяты из проекта RUSeq [<http://ruseq.ru/#/>].

Концентрации NO и EDN1 в исследуемых группах представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Уровень вазоактивных эндотелиальных факторов (Me, Q1, Q3) у людей с различными полиморфными вариантами генов

1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	Значимость различий (P)
NO (мкмоль/л)				
74,5 (64,4; 79,7)	66,8 (63,4; 72,9)	72,7 (67,3; 78,3)	61,3 (61,6; 68,0)	$P_{1-2} = 0,073$ $P_{1-3} = 0,415$ $P_{1-4} = 0,036$
EDN1 (фмоль/мл)				
0,8 (0,2; 1,4)	0,8 (0,3; 1,3)	1,4 (0,2; 1,5)	1,8 (0,3; 2,5)	$P_{1-2} = 0,444$ $P_{1-3} = 0,152$ $P_{1-4} = 0,095$

Результаты исследования показали, что уровень NO снижался при наличии полиморфных аллелей, однако статистически значимое изменение на 17,72 % наблюдалось при совместном присутствии в генотипе полиморфных аллелей генов *NOS3* и *EDN1*. В этих условиях наблюдалась тенденция к увеличению уровня EDN1, максимальные значения которого также наблюдались при совместном присутствии в генотипе полиморфных вариантов изучаемых генов.

Кроме того, при расчете индекса NO/EDN1, который характеризует сдвиг реакции сосудистого тонуса в сторону вазоконстрикции или вазодилатации, было установлено, что данный показатель в группе 1 составлял 59,64 отн. ед., уменьшаясь до 34,06 отн. ед. в группе 4 (на 57,12 %) ( $p = 0,004$ ), что указывает на явное вазоконстрикторное действие на сосудистый тонус сочетанного влияния аллелей G594T, T594T (rs5370) + T(-786)C, C(-786)C (rs2070774).

Показатели индекса КПУ в обследованной выборке представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Показатель индекса КПУ (Me, Q1, Q3) у людей с различными полиморфными вариантами генов

1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	Значимость различий (p)
7,25 (6,0; 9,0)	10,1 (8,75; 13,0)	9,0 (7,0; 12,0)	10,0 (7,5; 12,5)	$P_{1-2} = 0,009$ $P_{1-3} = 0,306$ $P_{1-4} = 0,079$

Полученные данные свидетельствуют об увеличении абсолютных показателей индекса КПУ при наличии полиморфных вариантов изучаемых генов. Так, наличие мутации в гене *EDN1* приводило к увеличению данного показателя на 39,3 %, мутация в гене *NOS3* — на 24,2 %, а наличие полиморфных вариантов как в гене *EDN1*, так и в гене *NOS3* увеличивало индекс КПУ на 37,9 %.

В таблице 3 представлены частоты встречаемости различных стадий КПУ у людей с различными сочетаниями полиморфных вариантов анализируемых генов.

Таблица 3.

Частота встречаемости различных степеней индекса КПУ (%) у людей с полиморфными вариантами генов *EDN1* и *NOS3*

Стадия КПУ	группа 1	группа 2	группа 3	группа 4	Значимость различий (p)
Компенсированная	41,6	8,4	20,0	25,0	$P_{1-2} = 0,886$ $P_{1-3} = 0,366$ $P_{1-4} = 0,553$
Субкомпенсированная	41,6	45,8	40,0	8,3	$P_{1-2} = 0,572$ $P_{1-3} = 0,563$ $P_{1-4} = 0,003$
Декомпенсированная	16,8	45,8	40,0	66,7	$P_{1-2} = 0,303$ $P_{1-3} = 0,323$ $P_{1-4} = 0,034$

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что группе 4 по сравнению с группой 1, частота встречаемости людей с компенсированной стадией снижалась на 16,6 %, с декомпенсированной стадией — на 33,3 %, а с субкомпенсированной стадией увеличилась на 49,9 %.

На основе проведенного молекулярно-генетического анализа по выявлению полиморфных вариантов гена, отвечающего за синтез эндотелина-1 — мощнейшего из известных в настоящее время вазоконстрикторных факторов и гена *NOS3*, отвечающего за работу эндотелиальной NO-синтазы, и, следовательно, за синтез оксида азота — мощнейшего вазодилататора эндотелиального

происхождения, можно предположить, что нарушение баланса данных вазоактивных факторов приводило к существенному изменению сосудистого тонуса у людей, имеющих в генотипе rs2070774 и rs5370.

Наличие полиморфных вариантов данных аллелей в генотипе, вероятно, может считаться фактором риска развития кариеса зубов и снижения резистентности к данному заболеванию.

Вероятнее всего, наличие данных полиморфных аллелей изменяло микроциркуляцию кровеносных сосудов в пародонте. Анализ частот встречаемости людей с различной степенью КПУ в выделенных группах показал, что наличие полиморфного аллеля любого из изучаемых генов в отдельности или их совместное присутствие в генотипе приводило к увеличению частоты встречаемости людей с декомпенсированной стадией кариеса зубов за счет резкого снижения частоты встречаемости субкомпенсированной стадии. Полученные данные согласуются с другими исследованиями, в ко-

торых, например, установлено увеличение частоты встречаемости субкомпенсированной и декомпенсированной стадий кариеса зубов при сочетанном действии полиморфизмов генов эндотелина-1 и эндотелиновых рецепторов А— и В-типа [18, 20], гена лактотрансферрина (LTF) [19].

### Заключение

Таким образом, учитывая, что интенсивность распространения кариеса зубов в полярных и приполярных широтах России выше, чем в Северной Европе [17], необходимо изучение распространения полиморфных вариантов генов, которые потенциально могут быть генами-кандидатами стоматологических заболеваний, в том числе и кариеса зубов. При этом изучение взаимосвязи полиморфизмов генов, участвующих в нарушении микроциркуляции в ротовой полости за счет формирования дисбаланса вазоактивных эндотелиальных факторов, с различными стоматологическими заболеваниями также является перспективным.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Левицкий С.Н., Бебякова Н.А., Курочкина Е.Л., Шабалина И.А., Радушин И.С., Вязникова Д.А. Полиморфизм гена EDN1 и резервные возможности сердечно-сосудистой системы // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2021. — № 1–2. — С. 34–35.
2. Бебякова Н.А., Первухина О.А., Фадеева Н.А., Хромова А.В. Полиморфизм генов AGT, AGT2R1 и NOS3 как фактор риска развития дисбаланса вазоактивных факторов // Экология человека. — 2020. — № 10. — С. 4–9.
3. Бебякова Н.А., Феликсова О.М., Хромова А.В., Шабалина И.А. Роль полиморфизма -786T>C эндотелиальной NO-синтазы в формировании факторов риска артериальной гипертензии // Экология человека. — 2018. — № 4. — С. 36–42.
4. Сабирова А.И. Роль сосудистого звена в развитии болезней пародонта на фоне сердечно-сосудистых заболеваний (обзор литературы) // Вестник КРСУ. — 2022. — № 5. — С. 93–97.
5. Бебякова Н.А., Левицкий С.Н., Галиева А.С., Давыдова Н.Г., Жиборт Е.Л. Полиморфизм генов вазоактивных факторов эндотелия и показатели интенсивности кариеса зубов // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: естественные и технические науки. — 2023. — № 8/2. — С. 13–17.
6. Opal S., Garg S., Jain J., Walia I. Genetic Factors Affecting Dental Caries Risk // Aust. Dent. J. — 2015. — Vol. 60. — № 1. — P. 2–11.
7. Udina I.G., Gulenko O.V. Molecular-Genetic Mechanisms of Caries Development // Russ. J. Genet. — 2018. — Vol. 54. — № 4. — P. 415–422.
8. Augeri A.L., Tsongalis G.J., Van Heest J.L., Maresh C.M., Thompson P.D., Pescatello L.S. The endothelial nitric oxide synthase -786T>C polymorphism and the exercise-induced blood pressure and nitric oxide responses among men with elevated blood pressure // Atherosclerosis. — 2009. — Vol. 204. — № 2. — P. 28–34.
9. Casas J.P., Cavalleri G.L., Bautista L.E., Smeeth L., Humphries S.E., Hingorani A.D. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review // Am J Epidemiol. — 2006. — Vol. 164. — № 10. — P. 921–935.
10. Xie X., Shi X., Xun X., Rao L. Endothelial nitric oxide synthase gene single nucleotide polymorphisms and the risk of hypertension: A meta-analysis involving 63,258 subjects // Clin Exp Hypertens. — 2017. — Vol. 39. — № 2. — P. 175–182.
11. Ebrahimi N., Asadikaram G., Mohammadi A., Jahani Y., Moridi M., Masoumi M. The association of endothelin-1 gene polymorphism and its plasma levels with hypertension and coronary atherosclerosis // Arch Med Sci. — 2019. — Vol. 17. — № 3. — P. 613–620.
12. Orhan A., Mehtar G., Metin A., Kara M. Endothelin-1 Lys198Asn and rs10478694 polymorphism in ischemic stroke // Biomedical Research. — 2017. — Vol. 28. — № 2. — P. 750–754.
13. Kanai S. M., Clouthier D. E. Endothelin signaling in development // Development. — 2023. — Vol. 150. — № 24. — P. 201786.
14. Воробьева Н.А., Кунавина К.А., Голубович А.В. Стоматологическое здоровье коренного этноса острова Вайгац Арктической зоны Российской Федерации // Экология человека. — 2021. — 4. — С. 25–29.
15. Васильева Н.А., Булгакова А.И., Солдатова Е.С. Характеристика стоматологического статуса пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта // Казанский медицинский журнал. — 2017. — Т. 8. — № 2. — С. 204–210.
16. Умнягина И.А., Блинова Т.В., Страхова Л.А., Иванова Ю.В., Трошин В.В., Колесов С.А., Фомина Ю.Н. Эндотелин-1 и метаболиты оксида азота в диагностике риска артериальной гипертензии у лиц молодого и среднего возраста, работающих во вредных условиях труда // Клиническая лабораторная диагностика. — 2021. — Т. 66. — № 9. — С. 525–532.

17. Горбатова М.А., Матвеева И.В., Дегтева Г.Н., Горбатова Л.Н., Гржибовский А.М. Распространенность и интенсивность кариеса у детей 10–14 лет Ненецкого автономного округа (Арктическая зона России) в зависимости от минерального состава питьевой воды и социально-демографических факторов // Экология человека. — 2019. — № 12. — С. 4–13.
18. Бебякова Н.А., Левицкий С.Н., Радушин И.С., Вязникова Д.А. Комбинация полиморфизмов генов эндотелина-1 и эндотелиновых рецепторов В-типа и ее влияние на показатели индекса КПУ // *Cognitio Rerum*. — 2024. — №1. — С. 10–14.
19. Вязникова Д.А., Радушин И.С., Левицкий С.Н., Галиева А.С. Полиморфные варианты гена лактоферрина (LTF) и их влияние на развитие кариеса зубов (обзор генетических баз данных dbSNP, ALFRED) // *CETERIS PARIBUS*. — 2023. — № 1. — С. 20–22.
20. Радушин И.С., Вязникова Д.А., Левицкий С.Н., Бебякова Н.А. Сочетанное влияние полиморфизма генов EDN1 и EDNRA // Перспективные исследования в психологии, спорте и здравоохранении: сборник статей международной научной конференции. — Архангельск, 2024. — СПб.: МИПИ им. Ломоносова, 2024. — С. 6–10.

---

© Бебякова Наталья Александровна (nbebyakova@mail.ru); Левицкий Сергей Николаевич (sergeylevitski@yandex.ru);  
Давыдова Надежда Геннадьевна (nadindavydova@mail.ru); Галиева Александра Сергеевна (alexgalieva@yandex.ru);  
Жиборт Екатерина Леонидовна (zhibort71@yandex.ru)  
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»