

# Морфологічні зміни та рівень експресії репаративного ензиму Об-метилгуанін-ДНК метилтрансферази у тканинах пародонта щурів під впливом *Candida albicans*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus* та methylnitrosoguanidine

Morphological Changes and Expression Level of Reparative Enzyme O6-methylguanin DNA Methyltransferase in Periodontal Tissues of Rats under the Influence of *Candida Albicans*, *Staphylococcus Haemolyticus*, *Staphylococcus Aureus* and Methylnitrosoguanidine

Кузенко Є.В.<sup>1</sup>, к.мед.н., ас.,  
Романюк А.М.<sup>2</sup>, д.мед.н., проф.  
<sup>1</sup>каф. патологічної анатомії,  
Медичний інститут Сумського  
державного університету, хірург-  
стоматолог щелепно-лицевого  
відділення Сумської обласної  
клінічної лікарні

<sup>2</sup>Медичний інститут Сумського державного університету  
Kuzenko Ye.V.<sup>1</sup>, PhD, Ass. Prof.,  
Romaniuk A.M.<sup>2</sup>, DMD, Prof.

<sup>1</sup>Department of Pathology, Medical  
Institute of Sumy State University  
Surgeon of Maxillofacial Department  
in Sumy Regional Hospital

<sup>2</sup>Medical Institute of Sumy State  
University

**Мета:** Визначити, як експресується MGMT ген на рівні білка у клітинах інтактного пародонта та при запаленні, спричиненому різними бактеріальними збудниками. **Методи:** Об'єктом дослідження були тканини пародонта 30 двомісячних щурів, яких розділили на 5 груп, по 6 тварин у кожній. Тваринам першої групи в ясенну борозну вкладали нитки з чистою культурою *Candida albicans*, другої групи – *Staphylococcus haemolyticus*, третьої – *Staphylococcus aureus*. Для контролю метилування тваринам четвертої групи одноразово вводили MNNG (Methylnitrosoguanidine). Тварини п'ятої групи були інтактними, зі здоровим пародонтом і склали контрольну групу. Наявність MGMT у лізатах клітин пародонта виявили за допомогою Вестерн-блот аналізу. Контроль нанесення проводили методом денситометрії мембрани за допомогою програми OriginPro 8.5, статистичний аналіз результатів – за критерієм Стьюдента. **Результати:** Аналіз зразків пародонта показав статистично значимі залежності вибірок за критерієм Стьюдента для *Candida albicans*:  $t=2,566$  ( $P \leq 0.01$ ), для *Staphylococcus aureus*:  $t=5,059$  ( $P \leq 0,003$ ), для *Staphylococcus haemolyticus*:  $t=4,332$  при ( $P \leq 0,007$ ). Це доводить існування залежності рівня експресії MGMT на рівні білка від збудника при запаленні пародонта. При порівнянні експресії MGMT у контрольній групі та сумарного рівня у піддослідних щурів виявили достовірну різницю  $t=2,432$  ( $P \leq 0.02$ ). **Висновки:** Довели можливість неспецифічного індукованого підвищення експресії MGMT бактеріальними продуктами при модельованому пародонтиті. Виявили різну залежність рівня експресії гена MGMT при запаленні пародонта, спричиненому досліджуваними бактеріями. Встановили ймовірність кумулятивної дії ендо- та екзотоксинів бактерій на експресію гена MGMT. У подальшому необхідно дослідити пошкодження генів DNA microarray-методом у хворих на запальні захворювання пародонта.

**Ключові слова:** Об-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (MGMT), репарація, methylnitrosoguanidine (MNNG), тканини пародонта, запалення, бактерії, Вестерн-блот аналіз.

**Purpose:** Analyze the expression of MGMT in intact cells and marginal periodontitis. **Methods:** periodontal tissues of 30 rats two months old, which were divided into 5 groups (6 on each). The animals of the first group has injected strands in gingival sulcus with *Candida albicans*, the animals of the second group - *Staphylococcus haemolyticus*, third groups of *Staphylococcus aureus*. The animals of the fourth group once has injected strands in gingival sulcus with MNNG (Methylnitrosoguanidine) (for the control of methylation). Animals fifth group has a healthy periodontium and served as a control. The presence of MGMT in periodontal we identify by Western blot analysis. Densitometry of membrane has performed by using the program OriginPro 8.5. Statistical analysis of densitometry is carried out by Student's test for independent samples. **Results:** The analysis of periodontal tissues samples experimental rats showed a statistically significant sample depending on the criterion Student for *Candida albicans*  $t=2,566$  ( $P \leq 0,01$ ), for *Staphylococcus aureus*  $t=5,059$  ( $P \leq 0,003$ ), for *Staphylococcus haemolyticus*  $t= 4,332$  at ( $P \leq 0,007$ ). This shows the existence dependent expression levels of MGMT protein with pathogen in periodontal inflammation. Compare MGMT expression in control animals and total level expression of MGMT in experimental rats we found  $t=2,432$  ( $P \leq 0,02$ ). **Conclusions:** The modeled presence of the marginal periodontitis is induced MGMT expression by bacterial products. We found a different dependence of MGMT gene expression by different bacterial pathogen. The established cumulative possibility of endo-and exotoxins of bacteria on the expression of MGMT.

**Key words:** O6-methyluanin-DNA methyltransferase (MGMT), repair, methylnitrosoguanidine (MNNG), periodontal tissue, inflammation, bacteria, Western-blot analysis.

## Вступ

Під дією алкілувальних агентів – бактеріальних токсинів, інтоксикації органічними сполуками, хіміопрепаратів, тютюнового диму – відбувається метилування білків та нуклеїнових кислот [1]. Метилування різних ділянок ДНК призводить до утворення різних аддуктів [2], а метилування O6-позиції гуаніну – до хибного розпізнавання цих нуклеотидів під час реплікації і помилкового їх спарювання. Так, O6-метилгуанін розпізнається як аденін і спарюється з тиміном замість цитозину. Якщо цей дефект ДНК не ліквідувати репаративною системою поперечних зшивок, відбудеться реплікація з подальшим утворенням на місці зшивки дволанцюгового розриву. Такі розриви відновлюються різними репараційними системами, зокрема ексцизійною та рекомбінантною, або індукують апоптоз [3–5]. Відомо, що при запаленні відбувається трансформація клітин [10] і у них може змінюватися експресія репаративних ензимів, а також MGMT.

Важливо, що бактерії своїми протеолітичними ферментами руйнують міжклітинні з'єднання, утворюють стійку до дії антибіотиків біоплівку. Ці мікробіологічні фактори призводять до поглиблення патоморфологічних процесів у пародонті та підтримують запалення. У попередніх дослідженнях доведено можливість алкілування токсинами бактерій у культурі клітин. Як відомо, при запаленні відбувається трансформація клітин, у них може змінюватися експресія різних генів [8]. Дані про порівняльний аналіз експресії генів (COL1A1, MGMT, MSH2–MSH6, OPN, MSH2) у клітинах інтактного пародонта та при запальному процесі в ньому відсутні. Мета дослідження: визначити, як експресується MGMT ген на рівні білка у клітинах інтактного пародонта та при запаленні, спричиненому різними бактеріальними збудниками.

## Матеріал і методи

Об'єктом дослідження були тканини пародонта 30 двомісячних щурів, яких

розділили на 5 груп, по 6 тварин у кожній. Тваринам першої групи в ясенну борозну вкладали нитки з чистою культурою *Candida albicans*, другої групи – *Staphylococcus haemolyticus*, третьої – *Staphylococcus aureus*. Для контролю метилування тваринам четвертої групи одноразово вводили MNNG (*Methylnitrosoguanidine*). Тварини п'ятої групи були інтактними, зі здоровим пародонтом і склали контрольну групу. Усі дослідження на тваринах виконали відповідно до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985). Експресію MGMT (O6–метилгуанін–ДНК метилтрансферази) вивчали на рівні білка методом Вестерн-блот аналізу.

До введення мікроорганізмів тварини отримували пеніцилін та стрептоміцин упродовж трьох діб. Дозу лікарського препарату розраховували за рекомендаціями Ю.Р. Риболовлевої і Р.С. Риболовлева (1979 р.) за формулою: доза для щура =  $g \times$  доза для люди-



**Мал. 1.** Тканини пародонта щурів контрольної групи забарвлення гематоксилін-еозин. 100х: а — дентин коронкової частини моляра щура; б — дентин кореня зуба; в — цемент кореня зуба; г — багат шаровий плоский зростаючий епітелій; д — з'єднувальний епітелій



**Мал. 2.** Зріз альвеолярного відростка щурів на 9 добу експерименту під впливом *Staphylococcus aureus*. 400х: а — крововилив; б — судина; в — змішаноклітинна інфільтрація; г — кісткова тканина альвеолярного відростка; д — власна пластинка

ни / R, де  $r$  — коефіцієнт видової витривалості для щура,  $r=3,62$ ; R — коефіцієнт видової витривалості для людини,  $R=0,57$  в дозі за формулою.

Після закінчення термінів експерименту тварин декапітували під ефірним наркозом та видалили у них нижні щелепи. Для вивчення патологічних змін у пародонті препарати забарвлювали гематоксилін-еозином після фіксації матеріалу у нейтральному формаліні та декальцинації в 17% ЕДТА рН 15.5.

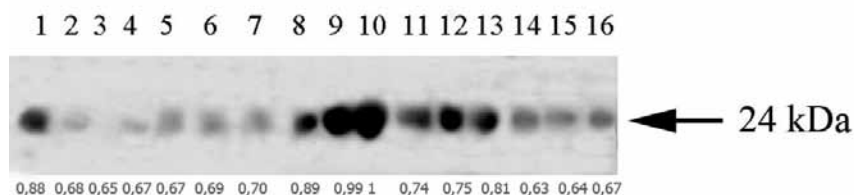
Наявність MGMT у лізатах клітин пародонта виявляли Вестерн-блот аналізу. Це напівкількісний метод, що використовують для визначення наявності певного білка у зразках клітин, з його допомогою можна виявити основні тенденції до зміни рівня експресії білка. Для цього шматки досліджуваних тканин розтирали у ступці з додаванням рідкого азоту до порошкоподібного стану і лізували у буфері 0,05 М Трис-НCl (рН 8,0), 0,15 М NaCl, 0,005 М ЕДТА, 0,003 М 1,3-дитіотрейтол, 0,002 М фенілметилсульфонілфлюорид упродовж 30 хв. на льоду. До лізатів додавали інгібітор

протеаз та *phenylmethylsulfonyl fluoride* (по 6 мкл на 0,5 мл) і соніфікували ультразвуком на льоду тричі по 10 с з інтервалом 30 с. Далі зразки центрифугували 30 хв. при 16000 об./хв. і температурі +4 °C. Супернатант відбирали і зберігали при температурі -70 °C. Концентрацію загального білка у клітинному екстракті вимірювали за методом Бредфорда [6]. Білковий екстракт, що містив 50 нг загального білка, досліджували за допомогою SDS електрофорезу у 12% поліакриламідному гелі за Леммлі [7]. Для Вестерн-блот аналізу білки з гелю переносили на полівінілдифлюоридну (PVDF) мембрану («Millipore», США) методом напівсухого перенесення у буфері 39 мМ гліцину, 48 мМ трису основного, 0,037% SDS, 20% метанолу (рН 8,3) на приладі фірми «BioRad», США. Після блокування неспецифічного зв'язування антитіл упродовж години 5% розчином знежиреного сухого молока у трис-фосфатному буфері (0,01 М Трис-НCl рН 7,5; 0,15 М NaCl; 0,1% Tween-20) мембрану інкубували упродовж години з моноклональними антитілами

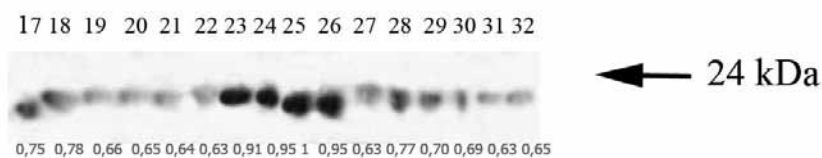
проти MGMT (1:1000) («Novus Biologicals Littleton, Co», США). Використовували видоспецифічні конюговані вторинні антитіла з пероксидазою хрому (1:5000) («Jackson Immuno Research», США), де мембрану інкубували одну годину. Від первинних та вторинних антитіл мембрану промивали тричі у трис-фосфатному буфері з додаванням 0,1% Tween-20 упродовж 10 хв. Хемілюмінесцентну реакцію проводили 1 хв. у 100 мМ Трис-НCl (рН 8,5), 1,237 мМ 3-мінофталгідрозиду (люмінолу), 0,673 мМ транс-4-гідроксикоричної кислоти (p-Coumaric acid) і 0,011% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Мембрану експонували в ChemiDoc («BioRad», США), контролювали нанесення методом денситометрії мембрани за допомогою програми OriginPro 8.5. Статистичний аналіз результатів денситометрії проводили за критерієм Ст'юдента для незалежних вибірок.

### Результати та їх обговорення

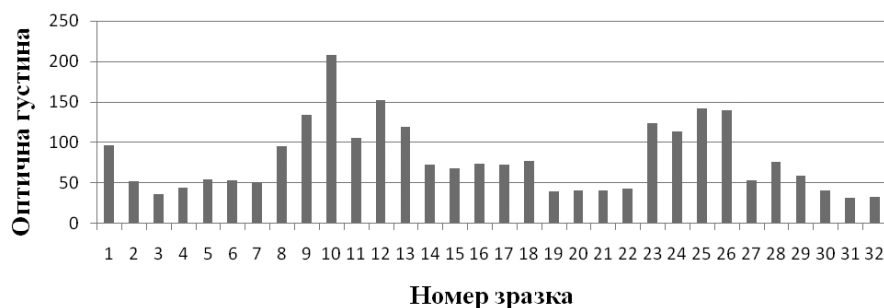
При дослідженні пародонта щурів контрольної групи виявили нормальний стан вільної частини ясен, міцно



**Мал. 3.** Вестерн-блот аналіз 30 зразків тканин пародонта щурів



**Мал. 4.** Денситограма результатів Вестерн-блот аналізу зразків тканин пародонта щурів: 1, 17 — позитивний контроль; 2, 3, 4, 18, 19, 20 — зразки нормального пародонта; 5, 6, 7, 21, 22, 23 — зразки пародонта, оброблені MNNG; 8, 9, 10, 24, 25, 26 — зразки пародонта, оброблені *Staphylococcus haemolyticus*; 11, 12, 13, 27, 28, 29 — зразки пародонта, оброблені *Staphylococcus aureus*; 14, 15, 16, 30, 31, 32 — зразки пародонта, оброблені *Candida albicans*



з'єднаних з окістям. Багат шаровий плоский епітелій не зазнав патологічних змін, як і власна пластинка, добре васкуляризована (мал. 1). Тканини пародонта щурів, яким вводили чисті культури бактерій, мали морфологічні прояви запальної реакції різного ступеня. Під впливом *Candida albicans* спостерігали незначний крововилив та лейкоцитарну інфільтрацію власної пластинки ясен. У з'єднувальному епітелії помітили ознаки гідропічної дистрофії. Морфологічні зміни у тканинах пародонта під впливом *Staphylococcus haemolyticus* та *Staphylococcus aureus* були ідентичні – масивні крововиливи та змішаноклітинна інфільтрація м'яких тканин, що свідчить про значне підвищення проникності судин (мал. 2). У тканинах пародонта тварин четвертої групи під впливом MNNG спостерігали незначні крововиливи, змішаноклітинна чи лейкоцитарна інфільтрація відсутня. Відомо, що MGMT ссавців має молеку-

лярну масу 22–24 кДа. Експресію MGMT на рівні білка проаналізували у 30 зразках тканин пародонта (мал. 3, 4). Різні типи клітин одного організму відрізняються за рівнем MGMT. Це особливо цікаво, оскільки у літературі не виявили жодної інформації про дослідження репаративних ензимів при модельованому запаленні тканин пародонта. У зразках тканин MGMT у нормі, за наявності алкілувальної речовини MNNG його кількість збільшується, бо спричинені цією речовиною пошкодження ДНК є специфічними індукторами експресії ензиму. Зростання експресії MGMT спостерігали і за наявності токсинів усіх використаних мікроорганізмів. Виявили, що усі вони мають алкілувальний ефект. Токсини *Candida albicans* підвищували експресію ензиму на рівні MNNG, а токсини *Staphylococcus haemolyticus* і *Staphylococcus aureus* показали сильніший індукційний ефект. Особливо зростала експресія MGMT за наявнос-

ті токсинів *Staphylococcus haemolyticus*. Цей результат пояснюється тим, що бактеріальні токсини є індукторами експресії ензиму MGMT через підвищення кількості пошкоджень ДНК. Алкілувальна здатність бактеріальних токсинів не має селективного цитотоксичного механізму дії, вони спричиняють метилування ДНК в усіх клітинах організму. У відповідь на ці пошкодження у клітинах підвищується експресія генів, продукти яких усувають метильні радикали, зокрема MGMT. Саме тому на початкових стадіях модельованого пародонтиту у щурів рівень MGMT підвищувався в усіх типах клітин пародонта, адже при запаленні посилюється метаболізм. Клітини з інтенсивним метаболізмом мають високі рівні репаративних ензимів. Це може бути пов'язано з більшою швидкістю окислювального гліколізу та активністю нітроксидсинтази. Вказані реакції призводять до зростання рівнів таких ендогенних

алкіляторів, як продукти перекисного окислювання жирів, нітритоаміни та амінокислоти. Значний синтез ендогенних алкіляторів посилює експресію відповідних захисних ензимів, зокрема MGMT, за принципом зворотної відповіді [9].

Аналіз зразків пародонта піддослідних щурів показав статистично значимі залежності вибірок за критерієм Стюдента для *Candida albicans*:  $t=2,566$  ( $P \leq 0,01$ ), для *Staphylococcus aureus*:  $t=5,059$  ( $P \leq 0,003$ ), для *Staphylococcus haemolyticus*:  $t=4,332$  при ( $P \leq 0,007$ ). Це підтверджує існування залежності

рівня експресії MGMT на рівні білка від збудника при запаленні пародонта. Порівнюючи експресію MGMT у контрольних тварин та сумарний рівень у піддослідних щурів, виявили достовірну різницю  $t=2,432$  ( $P \leq 0,02$ ). При порівнянні морфологічних змін у пародонті під впливом *Candida albicans*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus* та метилувальної речовини *Methylnitronitrosoguanidine* (MNNG) з рівнем експресії репаративного ензиму MGMT виявили залежність рівня експресії від мікрофлори, що спричиняє запальний процес.

## Висновки

Довели можливість неспецифічного індукованого підвищення експресії MGMT бактеріальними продуктами при модельованому пародонтиті. Виявили різну залежність рівня експресії гена MGMT при запаленні пародонта, спричиненому досліджуваними бактеріями. Встановили імовірність кумулятивної дії ендотоксинів бактерій на експресію гена MGMT. У подальшому необхідно дослідити пошкодження генів DNA мікроаггау-методом у хворих на запальні захворювання пародонта.

## Список використаної літератури

1. Hecht S.S. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines / S.S. Hecht // Chem. Res. Toxicol. — 1998. — № 11. — P. 559—603.
2. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents / B. Kaina, M. Christmann, S. Naumann [et al.] // DNA Repair (Amst). — 2007. — № 6. — P. 1079—1099.
3. Kaina B. DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs / B. Kaina, M. Christmann // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. — 2002. — № 40. — P. 354—367.
4. Lips J. DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts / J. Lips, B. Kaina // Carcinogenesis. — 2001. — № 22. — P. 579—585.
5. Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks / L.F. Batista, W.P. Roos, M. Christmann [et al.] // Cancer Res. — 2007. — № 67. — P. 11886—11895.
6. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a dye-binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. — 1976. — Vol. 72, № 1—2. — P. 248—254.
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. 4 / U.K. Laemmli // Nature. — 1970. — Vol. 227, № 5259. — P. 680—685.
8. Kurumbail R. Cyclooxygenase enzymes: Catalysis and inhibition / R. Kurumbail, J.R. Kiefer, L.J. Marnett // Current Opinion in Structural Biology. — 2001. — Vol. 11 (6). — P. 752—760.
9. Роль репаративного ферменту O6-метилгуанін-ДНК метилтрансферази у хіміотерапії злоякісних гліом / Л.А. Шапошник, О.Я. Главацький, А. Хассан та інші // Вісник СумДУ, серія Медицина. — 2012. — № 1. — С. 205—213.
10. Кравченко О.О. Активність Ca<sup>2+</sup>-залежних протеїназ в епітеліюцитах слизової оболонки товстої кишки щурів за умов розвитку коліт-асоційованого канцерогенезу / О.О. Кравченко, О.В. Дробінська, Л.І. Остапченко // Доповіді Національної академії наук України. — 2008. — № 12. — С. 154—160.

Стаття надійшла в редакцію 13 грудня 2012 року