

Особливості експресії репаративного ензиму Об-метилгуанін-ДНК-метилтрансферази та пошкодження ДНК тканин пародонта при запаленні*

Features of an Expression of Reparative Enzyme O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase and DNA Damage Periodontal Tissues during Inflammation

Кузенко Є.В.^{1,2}, к.мед.н., ас.,
 Романюк А.М.¹, д.мед.н., проф.,
 Політун А.М.³, д.мед.н., проф.
¹каф. патологічної анатомії,
 Медичний інститут Сумського
 державного університету
²хірург-стоматолог щелепно-
 лицевого відділення Сумської
 обласної клінічної лікарні
³каф. терапевтичної стоматології,
 Приватний вищий навчальний
 заклад «Київський медичний
 університет Української асоціації
 народної медицини»
 Kuzenko Ye.V.^{1,2}, PhD, Prof. Ass.,
 Romaniuk A.M.¹, DMD, Prof.,
 Polytun A.M.³, DMD, Prof.
¹Department of Pathology, Medical
 Institute of Sumy State University
²Surgeon of Maxillofacial Department
 in Sumy Regional Hospital
³Department of Therapeutic Dentistry,
 Private Higher Education
 Establishment Kyiv Medical University
 of Ukrainian Association of Folk
 Medicine

Адреса для кореспонденції:
 Кузенко Євген Вікторович
 e-mail: kuzenko_yevhen@rambler.ru

Мета: Вивчити особливості експресії репаративного ензиму Об-метилгуанін-ДНК-метилтрансферази та пошкодження ДНК тканин пародонта при запаленні. **Методи:** Об'єктом дослідження були тканини пародонта 56 осіб, які померли від соматичної патології, обстежених гістологічно та імуногістохімічно з антитілами до MGMT. Методом фрагментації провели аналіз ступеня пошкодження ДНК. **Результати:** Рівень експресії репаративного ензиму MGMT у клітинах тканин інтактного пародонта різний. У ядрах клітин кісткової тканини інтактного пародонта експресія MGMT сягає $98,27 \pm 2,06\%$ ($p < 0,05$). Середнє значення MGMT «+» ядер шарів епітелію ясен становить $72,72 \pm 3,67\%$ ($p < 0,05$), а MGMT «+» ядер клітин фіброзної тканини періодонтальної щілини – $43,21 \pm 4,87\%$ ($p < 0,05$). Кількість острівців Маляссе з MGMT «+» ядрами у межах $55,09 \pm 4,12\%$ ($p < 0,05$). Рівень репаративного ензиму під час запалення постійно знижувався. На підставі проведеного дослідження морфологічної картини розвитку пародонтиту, фрагментації ДНК та експресії репаративного MGMT, що пов'язані із запаленням, виділили 6 стадій альтернативного ушкодження: 1) початкові клітинні ушкодження; 2) глибокі клітинні ушкодження; 3) тканинні ушкодження; 4) деструктивні ушкодження з приєднаним запальним компонентом; 5) тяжкі ушкодження із вторинною альтерацією; 6) прогресуючі некротичні ушкодження. **Висновки:** Виявили кореляційну залежність між рівнем репаративного ензиму MGMT у клітинах пародонта і фрагментацією ДНК $r = -0,76$ ($p = 0,05$).

Ключові слова: Об-метилгуанін-ДНК-метилтрансфераза (MGMT), фрагментація ДНК, запалення пародонта.

Purpose: Explore features of an expression of reparative enzyme o6-methylguanine-DNA methyltransferase and DNA damage periodontal tissues during inflammation. **Methods:** 56 periodontal tissues of patients who died of Sumy Regional Hospital Patients was examined histologically, immunohistochemically (antibodies to MGMT). DNA of patients was examined by fragmentation analysis. **Results:** The intact periodontal tissue cells have different level of the expression of enzyme MGMT. The nuclei bone intact periodontal were $98,27 \pm 2,06\%$ ($p < 0,05$). Mean MGMT «+» nuclei layer gingival epithelial was $72,72 \pm 3,67\%$ ($p < 0,05$). MGMT «+» fibrous tissue periodontal – $43,21 \pm 4,87\%$ ($p < 0,05$). Number of Malyasse MGMT «+» nuclei was $55,09 \pm 4,12\%$ ($p < 0,05$). Level reparative enzyme during inflammation constantly declining. The trend to increased reparative enzyme MGMT was observed during the initial damage in the parabasal layer of the epithelium of periodontal tissues $85,71 \pm 5,7$ ($p < 0,05$).

*Кузенко Є.В., Романюк А.М., Політун А.М. Особливості експресії репаративного ензиму Об-метилгуанін-ДНК-метилтрансферази та пошкодження ДНК тканин пародонта при запаленні. Частина I, див. «Новини стоматології», №3'2014, с. 46–50.

Fibrous tissue periodontal gap throughout the experiment had different expression levels of MGMT «+» nuclei during the initial injury, the upper and middle third were characterized by a decrease in MGMT «+» fibroblast nuclei. Cell damage does not have a clear picture of the drastic changes in the amount of MGMT «+» cell nuclei periodontal tissues. Depending on the expression of MGMT possible separation of the initial tissue damage and heavy. The initial changes were characterized by a constant number of MGMT «+» of cells in the intermediate and upper layers of the epithelium in relation to cellular damage, but compared with intact periodontium has been a significant reduction of MGMT. **Conclusions:** We found the correlation between the level of enzyme MGMT and DNA fragmentation $r=-0.76$ ($p=0,05$).

Key words: O6-Methylguanine-DNA (MGMT), DNA fragmentation, periodontal inflammation.

Результати та їх обговорення

2) Стадія глибоких клітинних ушкоджень не показала різких змін у кількості MGMT «+» ядер клітин тканин пародонта. Епітелій характеризувався основними змінами у проміжному та поверхневому шарах клітин. У поверхневому шарі виявили $54,68 \pm 1,71\%$ ($p < 0,05$) MGMT позитивних клітин, у проміжному шарі – $41,35 \pm 2,75\%$ ($p < 0,01$). У парабазальному шарі стало значення MGMT позитивних клітин становило $70,03 \pm 9,85\%$. Кісткова тканина за кількістю MGMT позитивних клітин на рівні інтактного пародонта – $98,25 \pm 3,52\%$. Фібозна тканина періодонтальної щілини під час клітинних пошкоджень характеризувалась такими ж змінами, як і при початкових пошкодженнях. У верхній третині періодонтальної щілини виявили $15,55 \pm 2,17\%$ MGMT «+» ядер, у середній третині – $29,89 \pm 5,87\%$ ($p < 0,05$) MGMT «+» ядер. Сталий рівень MGMT «+» ядер відзначили у нижній третині періодонтальної щілини – $48,23 \pm 6,25\%$. В епітеліальних острівцях Маляссе спостерігали підвищений рівень MGMT «+» клітин – $63,28 \pm 5,76\%$.

3) Залежно від експресії MGMT можливий поділ тканинних ушкоджень на початкові та тяжкі. Початкові тканинні зміни характеризуються сталою кількістю MGMT «+» клітин у проміжному та поверхневому шарах епітелію, порівняно з клітинними ушкодженнями, а з інтактним пародонтом – зна-

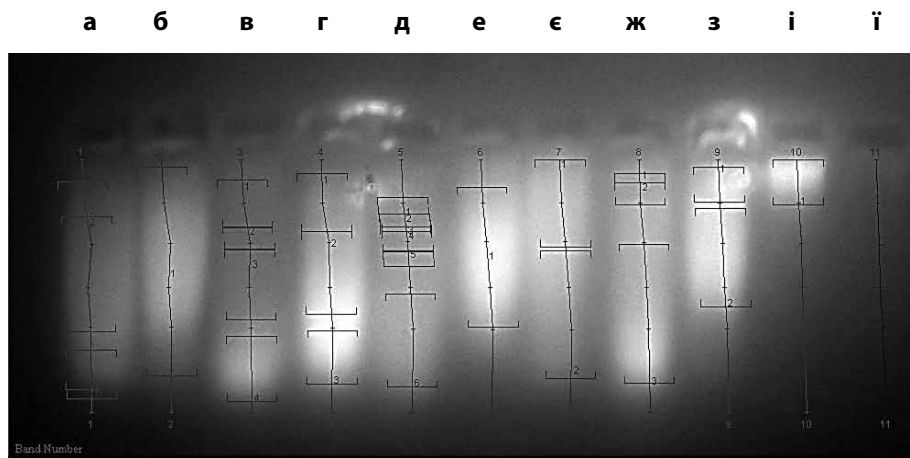
чим зниженням рівня MGMT у проміжному шарі до $43,52 \pm 6,78\%$ ($p < 0,05$), у поверхневому шарі до $55,82 \pm 3,5\%$ ($p < 0,05$). Парабазальний шар зберігав високий рівень MGMT «+» клітин, що сягав $65,31 \pm 5,87\%$. Кісткова тканина відображала сталий вміст MGMT «+» клітин з незначною тенденцією до зниження – $92,53 \pm 4,21\%$. Значних змін у кількості MGMT «+» клітин зазнала верхня третина періодонтальної щілини: зменшення до $9,03 \pm 1,78\%$. Середня та нижня третина періодонтальної щілини та острівці Маляссе мали досить високу кількість MGMT «+» клітин, що перебували на рівні початкового пошкодження та становили відповідно $29,89 \pm 5,87\%$ ($p < 0,05$), $48,23 \pm 6,25\%$ ($p < 0,05$), $63,28 \pm 5,76\%$ ($p < 0,01$). Під час тяжкого тканинного ушкодження спостерігали значне зниження MGMT «+» клітин у всіх тканинах, окрім кісткової, де цей показник перебував на рівні $95,77 \pm 0,98\%$. Епітеліальна тканина характеризувалась найбільшим зниженням у проміжному шарі до $2,1 \pm 1,71\%$. Парабазальний і поверхневий шари показали $10,24 \pm 2,71\%$ ($p < 0,01$) та $5,26 \pm 1,14\%$ ($p < 0,01$) MGMT «+» клітин відповідно. Фібозна тканина періодонтальної щілини при тяжкому тканинному пошкодженні відображала рівномірне зниження кількості MGMT «+» клітин, порівняно з інтактним пародонтом. Так, у верхній третині виявили $14,33 \pm 4,70\%$ ($p < 0,01$), що вище від початкових пошкоджень. Середня та нижня третини характери-

зувались наявністю MGMT «+» клітин на рівні $25,78 \pm 4,72\%$ ($p < 0,05$) та $21,80 \pm 3,26\%$ ($p < 0,05$). Практично вдвічі знизився рівень MGMT «+» клітин в острівцях Маляссе та дорівнював $31,50 \pm 7,20\%$ ($p < 0,05$).

4) Зниження MGMT «+» клітин до $71,34 \pm 5,38\%$ ($p < 0,05$) спостерігали у кістці під час деструктивного ушкодження з приєднаним запальним компонентом. Усі шари епітелію та острівці Маляссе характеризувалися MGMT «-» клітинами. У фібробластах фіброзної тканини верхньої третини періодонтальної щілини були практично відсутні MGMT «+» клітини – $1,57 \pm 0,36\%$. Вдвічі знизився рівень MGMT «+» клітин у середній та нижній третинах періодонтальної щілини і становив $10,27 \pm 3,85\%$ ($p < 0,05$) та $9,55 \pm 1,71\%$ ($p < 0,05$).

5) Тяжкому ураженню із вторинною альтерацією притаманна відсутність MGMT «+» клітин у всіх тканинах, окрім кісткової та парабазального шару епітелію, де показник становив $73,21 \pm 4,81\%$ ($p < 0,05$) та $15,21 \pm 4,03\%$ ($p < 0,05$).

6) Прогресуюче некротичне ушкодження характеризувалося лише незначною кількістю MGMT «+» клітин у парабазальному шарі епітелію – $10,23 \pm 2,98\%$. MGMT «+» клітини в інших тканинах практично відсутні. Зміна типу експресії MGMT тканин пародонта вказує на локальні розлади у тканинах пародонта. Зокрема експресії MGMT є наслідком локальних мета-



Мал. 3. Фрагментація ДНК тканин пародонта в інтактному пародонті та при запаленні: і — маркер; і — інтактний пародонт; а-ж — фрагментація ДНК різного ступеня

Таблиця 1. Рівень експресії MGMT у тканинах пародонта в нормі та при запаленні

Стадії /тканини	Інтактний пародонт	Початкові клітинні ушкодження	Глибокі клітинні ушкодження	Тканинні ушкодження		Деструктивні ушкодження з приєднаним запальним компонентом	Тяжкі ушкодження з вторинною альтерацією	Прогресуючі некротичні ушкодження
				Початкові	Тяжкі			
Одиниці вимірювання та кількість у групі	%, n= 9	%, n=6	%, n=7	%, n=6	%, n=7	%, n=6	%, n=6	%, n=9
Парабазальний шар епітелію	75,31±7,83	85,71±5,7	70,03±9,85	65,31±5,87	10,24±2,71	0	15,21±4,03	10,23±2,98
Проміжний шар епітелію	72,84±2,78	71,32±3,73	41,35±2,75	43,52±6,78	2,1±1,71	0	0	0
Поверхневий шар епітелію	70,33±3,24	61,22±2,71	54,68±1,71	55,82±3,5	5,26±1,14	0	0	0
Кісткова тканина	98,27±2,06	95,89±1,82	98,25±3,52	92,53±4,21	95,77±0,98	71,34±5,38	73,21±4,81	0
Фібозна тканина верхньої третини періодонтальної щілини	41,56±7,83	12,47±3,57	15,55±2,17	9,03±1,78	14,33±4,70	1,57±0,36	0	0
Фібозна тканина середньої третини періодонтальної щілини	44,37±2,10	32,47±5,24	29,89±5,87	31,91±2,72	25,78±4,72	10,27±3,85	0,89±0,09	0
Фібозна тканина нижньої третини періодонтальної щілини	43,71±1,74	57,86±10,86	48,23±6,25	51,71±2,34	21,80±3,26	9,55±1,71	0,97±0,12	0,24±0,05
Острівці Маляссе	55,09±4,12	51,26±7,33	63,28±5,76	57,89±7,23	31,50±7,20	0	1,72±1,00	0,78±0,06

болічних порушень різного генезу. Рівень експресії ензиму у нормі та патології наведено у табл. 1. Однією із специфічних стадій пошкодження ДНК є міжнуклеосомна фрагментація. Дослідження фрагментації ДНК у тканинах пародонта в умовах запалення показало, що початкові стадії пошкодження ДНК розвиваються упродовж

першої доби (мал. 3 в). Цей процес має відносно стабільний перебіг. Через три-п'ять діб починається руйнування високомолекулярної ДНК (мал. 3 б, д-є) і в досліджуваних зразках виникають низькомолекулярні фрагменти (мал. 3 а). Проведене дослідження доводить відносно повільний перебіг процесу фрагментації. Фрагменти

ДНК на електрофореграмі відповідали розмірам 25000, 35000 та інколи 15500 т.п.н. (мал. 3 г-ж), тобто пошкодження ДНК на початкових стадіях становило 0,02-0,08 на 1000 пар нуклеотидів. Проведений кореляційний аналіз середнього значення експресії MGMT і пошкодження ДНК показав зворотну лінійну залежність $r=-0,76$;

$p=0,05$. Довели існування потужної алкілувальної патогенетичної ланки у захворюваннях пародонта. Це дозволило виокремити ще один патогенетичний механізм ушкодження тканин пародонта – патологічне алкілування білків та ДНК.

Висновки

Рівень репаративного ензиму MGMT знижується при запаленні та відіграє важливу роль у перебігу патологічного процесу. При пародонтиті виявили кореляційну залежність між ступенем по-

шкодження ДНК та змінами експресії MGMT, що опосередковано свідчить про наявність патологічного метилування ДНК. Надалі необхідно дослідити методом ІК-спектроскопії рівень метилування азотистих основ у ДНК тканин пародонта в нормі та при патології.

Список використаної літератури

- Окислительный стресс и комплексная антиоксидантная энергокоррекция в лечении пародонтита / И.А. Омаров С.Б. Болевич Т.Н. Саватеева-Любимова [и др.] // Стоматология. — 2011. — № 1. — С. 10—17.
- Карпенко И.Н. Современные представления об этиологии и патогенезе быстро прогрессирующего пародонтита / И.Н. Карпенко, Н.В. Булкина, Е.В. Понукалина // Архив патологии. — 2009. — № 1. — С. 57—59.
- Грудянов А.И. Соотношение между перекисным окислением липидов слюны и местное лечение пародонтита гелем Диклоран / А.И. Грудянов, В.В. Овчинникова, Л.Е. Серебрякова // Стоматология. — 2002. — № 4. — С. 31—34.
- Propylene oxide and epichlorohydrin induce DNA strand breaks in human diploid fibroblasts, / A. Kolman, M. Duijnsha, B. Cedervall [et al] // Mol. Mutagen. — 1997. — Vol. 30. — P. 40—46.
- «S-adenosyl methionine: A connection between nutritional and genetic risk factors for neurodegeneration in Alzheimer's disease / F. Tchanchou, M. Graves, D. Ortiz [et al] // J. Nutr Health Aging. — 2006. — № 10 (6). — P. 541—545.
- RlmN and Cfr are radical SAM enzymes involved in methylation of ribosomal RNA / Feng Yan, Jacqueline M. LaMarre, Rene Röhrich [et al] // J. Am. Chem. Soc. — 2010. — N. 132 (11). — P. 3953—3964.
- Sudhakar veeranki defective homocysteine metabolism: potential implications for skeletal muscle malfunction / Sudhakar Veeranki, Suresh C. Tyagi // International Journal of Molecular Sciences. — 2013. — № 14. — P. 15074—15091.
- Janice R. Marine-Derived Metabolites of S-Adenosylmethionine as Templates for New Anti-Infectives / Janice R. Sufrin, Steven Finckbeiner, M. Colin // Oliver Marine Drugs. — 2009. — Vol. 7. — P. 401—434.
- S-Adenosylmethionine and methylation. / R.K. Gordon, J. Tal, G.C. Zeng, [et al] // J.FASEB. — 1996. — Vol. 10. — P. 471—480.
- RD6-2198, a novel betain-type fluoroalkylated oligomer, inhibits the replications of human immunodeficiency virus type 1 and other enveloped viruses. / M. Fujiwara, N. Ashida, M. Okamoto [et al] // Antiviral Res. — 1998. — Vol. 38(2). — 141—150.
- The effect of betain on biology and morphology of developmental stages of Eimeria acervulina in broiler chicks experimentally infected / Teixeira M, Niang TM, Gomes AV, Lopes CW. // Rev Bras Parasitol. — 2006. — Vet. 15(4). — P. 193—201.
- Carcinogenicity of 1,3-butadiene, ethylene oxide, vinyl chloride, vinyl fluoride, and vinyl bromide / Yann Grosse, Robert Baan, Kurt Straif [et al] // The Lancet Oncology. — 2007. — Vol. 8, Iss.8. — P. 679—680.
- Белоключка Г.Ф. Современный взгляд на классификацию болезней пародонта / Г.Ф. Белоключка // Современная стоматология. — 2007. — № 3 (39). — С. 59—64.
- Alteration of PTGS2 Promoter Methylation in Chronic Periodontitis / S. Zhang, S.P. Barros, M.D. Niculescu [et al] // J Dent Res. 2010. — Vol. 89(2). — P. 133—137.
- 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. 52—60.
- Human Cyclooxygenase-2 is a Sequence Homodimer That Functions as a Conformational Heterodimer / Dong, L., Vecchio A.J., Sharma N. P. [at al] // Journal of Biological Chemistry. — 2011. — Vol. 21. — P. 286—307.
- Kelma C. Methylation Pattern of IFNG in Periapical Granulomas and Radicular Cysts Basic Research / Kelma C., Carolina C. G., J. de F. Correia-Silva // Biology. — 2013. — Vol. 39. — N4. — P. 493—796.
- Interferongamma promoter hypomethylation and increased expression in chronic periodontitis / S. Zhang, A. Crivello, S. Offenbacher [et al] // J Clin Periodontol current. — 2010. — N37. — 953—961.
- Methylation pattern of IFN- and IL-10 genes in periodontal tissues / M.B. Viana, F.P. Cardoso, M.G. Diniz [et al] // Immunobiology. — 2011. — N216. — P. 936—941.
- Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues Florenc / S. Abdanur, M.B. Viana, A.C. Dupim [et al] // Immunobiology. — 2013. — Vol. 7. — P. 2—5.
- Epigenetic change in E-Cardherin and COX-2 to predict chronic periodontitis / W. TY Loo, L. Jin, M. NB Cheung, [et al] // Journal of Translational Medicine. — 2010. — N.8. — P. 110-116.
- Тілігузіна Н.А. Курение и пародонтит / Н.А. Тілігузіна, М.О. Кузємбаєва, О.І. Пустовіт // Современная стоматология. — 2010. — Vol. 3. — P. 52—54.
- DNA methylation status of IL8 gene promoter in oral cells of smokers and nonsmokers with chronic periodontitis / N.F.P. Oliveira, G.R. Damm, D.C. Andia [et al] // J Clin Periodontol. — 2009. — N36. — P. 719—725.
- Gerson S. L. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. / S. L. Gerson // Nat. Rev. Cancer. — 2004. — № 3. — P. 296—307.
- O6-methylguanine-DNA methyltransferase is downregulated in transformed astrocyte cells: implications for anti-glioma therapies / K. Sasaki, T. Akagi, E. Aoyanagi [et al.] // Mol. Cancer. — 2007. — № 6. — P. 36.
- Protein phosphorylation is a regulatory mechanism for O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human brain tumor cell / K.S. Srivenugopal, S.R.S. Mullapudi, J. Shou [et al.] // Cancer Res. — 2000. — Vol. 60, № 2. — P. 282—287.
- Kanugula S. Alkylation damage repair protein O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase from the hyperthermophiles Aquifex aeolicus and Archaeoglobus fulgidus / S. Kanugula, A. E. Pegg // Biochem. J. — 2003. — Vol. 375, № 9, Pt. 2. — P. 449—455.
- Индукция направленных разрывов в ДНК политенных хромосом при действии алкилирующих производных олигодезилатов. / Г.А. Зайниев, И.Э. Шилова, Г.Г. Карпова [и др.] // Мол. биол. — 1981. — № 15. — С. 86—95.
- Эффективность репарации ДНК лимфоцитов их гибель, а также эффективность белков MLR1, MSH2, FasR как факторы прогноза клеточного обмена на химиотерапию больных диссеминированной меланомой / В.А. Тронов, Д.Н. Артамонов, М.Е. Абрамов [и др.] // Цитология. — 2011. — № 1 (т. 53). — С. 10—16.
- Кузенко Є.В. Морфологічні зміни у тканинах пародонта при запаленні / Є.В. Кузенко, А.М. Романюк, Л.І. Карпенко // Український морфологічний альманах. — 2013. — № 2 (т. 11). — С. 58—60.
- Колесова Н.А. Концепция гетерогенности болезней пародонта, определяющей особенности лечебной тактики / Н.А. Колесова, А.М. Политун, Н.В. Колесова // Современная стоматология. — 2006. — № 1. — С. 61—64.
- Колесова Н.А. Структурні зміни кісткової тканини альвеолярного відростка за генералізованого пародонтиту [Текст] / Н.А. Колесова, Н.В. Колесова // Вісник проблем біології і медицини. — 2011. — № 2 (т. 1). — С. 186—187.

Стаття надійшла в редакцію 17 грудня 2013 року