

ЗМІНИ ДНК ТКАНИН ПАРОДОНТУ ПРИ ЗАПАЛЕННІ

Медичний інститут СумДУ (м. Суми)

Дана робота виконана в рамках науково-дослідної роботи «Морфогенез загальнопатологічних процесів», № держ. реєстрації 013U003315.

Вступ. Людство обтяжено різними мутаціями, які накопичувались під час еволюції. Постійний мутаційний процес надає нові мутації в генофонд людства, внаслідок чого штучний відбір зберігає або примножує чи приводить до зникнення окремих генів. У людини описані наступні види мутацій: місенс, нонсенс, здвиг рамки зчитування, делеція, інверсія, порушення сплайсингу, збільшення числа експресії тринуклеїнових повторів.

Різні ендогенні та екзогенні причинні фактори захворювань пародонту грають роль довготривалих стресових агентів, які викликають зрив клітинної адаптації, внаслідок чого виникає пригнічення біологічної активності субстратів, зокрема ферментів дихання, та порушення морфогенетичних структур пов'язаних з ними [2].

Запалення тканин пародонту невід'ємно пов'язано з загально-соматичним станом хворого [12]. Одним з механізмів такого взаємозв'язку є поява продуктів, які спричиняють утворення алкілюючих агентів. Сучасні дослідники [1, 3, 4] стверджують, що перекисне окислення ліпідів та білків сприяє прогресуванню запально-дистрофічних процесів у тканинах пародонта і є ключовим патогенетичним механізмом його розвитку. Вільні радикали спричиняють пошкодження ліпідів та білків мембран та часткового окислення азотистих основ ДНК.

Накопичення супероксид-іонів є широко визнаним джерелом окисного пошкодження в патогенезі інтоксикації свинцем. Фукс та ін. [8] також отримали свідчення генотоксичного ефекту солей важких металів. Вони показали, що кінцевий продукт окислення 5-dioxovaleric є алкілюючим агентом залишків гуаніну ДНК. Дослідники повідомили про підвищення рівня 7-, 8-оксигуаніна, 8-дигідродезоксигуаніна і 5-гідроксидезоксцитозина в ДНК.

На нашу думку більш небезпечним є пошкодження ДНК пародонту яке спричинено алкілуванням. Ендогенні алкілувальні речовини в невеликій кількості утворюються в організмі у нормі. Збільшення їх кількості спричиняє різні соматично-патологічні стани [13].

Хронічне запалення тканин, яке викликане *Samrylobacter rectus* та *Helicobacter pylori*, призводить до посилення метилування промотора Igf2, hMLH1.

Аналіз даних, отриманих дослідниками, свідчить про зменшення експресії гена COX-2, PTGS2 (циклооксигенази-2 або постогландин-ендопероксидсинтези-2) внаслідок метилування [5].

Експериментально створені радикалярні кісти та гранульоми у щурів мали патологічне алкілування гена IFNG епітеліальної вистилки [10]. Подібними дослідженнями, щодо гена IFNG [9], доведена наявність патологічного метилування при гострих гінгівітах. Мішель Батіз та ін. [11] на 34 зразках тканин пародонта після кюретажу показали патологічне метилування гуаніну гена IL-10 у позиціях 373, -352, -350, -320 та -185. Епігенетичні зміни (фізіологічне метилування) у генах є природним для соматичних клітин. Зняття метильних груп з промоторної ділянки спричиняє його експресію. Гостре запалення пародонта призводить до деметилування гена IL-6 та веде до збільшення білкового продукту [7]. Гіперметилування азотистих основ генів E-Cadherin та COX-2 у хворих на пародонтити показано у роботі Вінг Лу [6].

Мета дослідження. За допомогою метода інфрачервоної спектрофотометрії дослідити зміни метилування ДНК тканин пародонту померлих від загальносоматичних захворювань.

Об'єкт і методи дослідження. Робота ґрунтується на класичному методологічному підході, що використовується у сучасних дослідженнях. Нами були використані тканини пародонту 56 померлих від соматичної патології, яким гістологічно встановлювався стоматологічний діагноз пародонтит різного ступеню тяжкості. Всі біоптати були поділені на дві групи з інтактним пародонтом N=9 та парадонт з ознаками запалення різного ступеню тяжкості N=47.

ДНК виділялась з тканин пародонту з використанням лізуючого буферу (30 mM Tris-Cl; 10 mM EDTA; 1% SDS; протеїназа-K). Очищення ДНК проводили стандартним фенольно-хлороформним методом з подальшим осадженням у абсолютному етанолі. Отриманий ДНК-продукт перетирали з KBr та уклали в таблетки з наступною ІЧ (інфрачервоною) спектрофотометрією за Фур'є на спектрометрі Spectrum One (PerkinElmer).

Аналіз спектрів проводили у Origin Version 8. Для статистичної обробки отриманих результатів використовували програму Statistika 8. 0 з урахуванням критерію Стюдента та перевіркою на нормальність.

Відсоток інтенсивності за шкалою пропускання ІЧ випромінювання CH₃ та CH₂ груп ДНК

	2953 (vasCH ₃)	2870 (vsCH ₃)	2922 (vasCH ₂)	2853 (vsCH ₂)	1465 (δsCH ₂)	1450 (δasCH ₃)	1375 (δsCH ₃)	724 (ρCH ₂)
Інтактний пародонт N=9								
Валентні коливання	48,05±4,3	0,37±0,01	3,17±0,16	18,97±3,77	-	-	-	-
Деформаційні коливання	-	-	-	-	0,24±0,03	8,88±1,36	7,18±0,74	-
Маятникове коливання	-	-	-	-	-	-	-	3,08±1,07
Пародонт з ознаками запалення (різні морфологічні форми та ступень тяжкості) N=47								
Валентні коливання	42,71±7,54 *	0,36±0,05	3,05±0,66	16,67±6,04				
Деформаційні коливання					0,32±0,06 ***	11,14±2,24 ***	10,39±2,44 ***	
Маятникове коливання								5,42±3,30 **

Примітка: критерій Стьюдента для незалежних вибірок *P=0.05, **P=0.01, ***P=0.001.

Результати досліджень та їх обговорення. ІЧ-спектри ДНК смуг поглинання умовно можна поділити на три області: перша – 4000-2000 см⁻¹ – коливання азотистих основ, друга – 1700-1500 см⁻¹ – коливання дезоксирибози ДНК, третя – 1300-1000см⁻¹ – коливання дезоксирибози та фосфатних груп у скелеті молекули ДНК. Смуги спектру в залежності від інтенсивності поглинання інфрачервоного випромінювання можна поділити на: сильні – ≤20%; середні – 20% -5% та слабкі – 5% ≥. У зв'язку зі складністю будови молекули ДНК виникає накладання піків аденіну, тиміну, гуаніну, цитозину, дезоксирибози та фосфорного залишку на групи CH₃, CH₂.

Найбільш важливим є диференціація CH₃ груп, патологічно приєднаних до азотистих основ, від CH₂ груп дезоксирибози. Валентні коливання зв'язку C-H алкільних фрагментів груп CH₃, CH₂ виявляються в області 3000-2840 см⁻¹. В ділянці спектру 3000-2840 см⁻¹ виникає часткове накладання піків аденіну, тиміну, гуаніну, цитозину. Для диференціювання груп CH₃, CH₂ слід пам'ятати, що валентні коливання зв'язків Csp³-H, як правило, спостерігаються нижче 3000 см⁻¹, тоді як валентні коливання зв'язків Csp²-H і Csp³-H лежать вище 3000 см⁻¹.

Валентні коливання метильних груп (CH₃) спостерігаються у вигляді двох смуг поглинання при 2962 і 2872 см⁻¹.

Перша – результат антисиметричного валентного коливання, в якому двоє зв'язків C-H метильної групи розтягуються, в той час як третій зв'язок стискається (vas CH₃).

Друга смуга зумовлена симетричними валентними коливаннями (vs CH₃), коли всі три зв'язки C-H розтягуються або стискаються в фазі. Наявність декількох метильних груп призводить до збільшення інтенсивності відповідних смуг.

Валентні коливання метиленових груп (CH₂) також спостерігаються у вигляді двох смуг поглинання (2962 і 2853 см⁻¹), обумовлених антисиметричними (vas CH₂) і симетричними (vs CH₂) валентними коливаннями.

У метильній групі можуть проявлятися два деформаційні коливання: симетричне деформаційне коливання (δs CH₃), що виявляється близько 1375 см⁻¹, і антисиметричне деформаційне коливання (δas CH₃) – в області 1450 см⁻¹.

Поглинання при 1375 см⁻¹ є важливим критерієм (δs CH₃) групи. Смуга поглинання незначна у спектрі ДНК, та притаманна компартизованій інтактній ДНК. Метильна група має чотири типи деформаційних коливань (ножичні, віялоподібні, маятникові, крутильні). При цьому найбільш інформативним є поглинання в області 1465 см⁻¹, обумовлене ножичним деформаційним коливанням (δs CH₂). Тому порівняння CH₃ та CH₂ груп ДНК у інтактному пародонті та

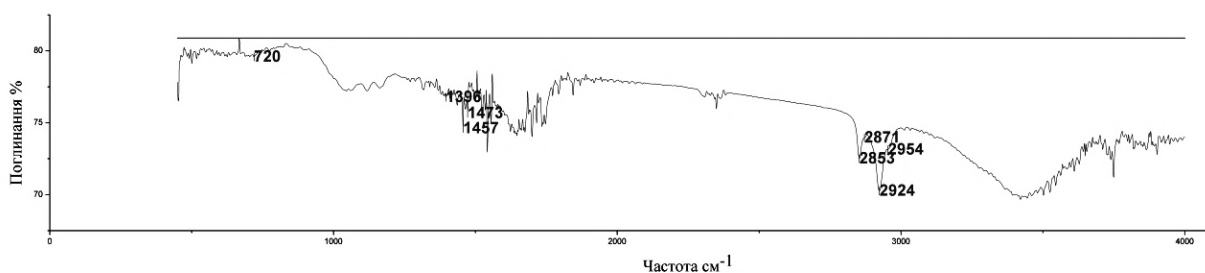


Рис. Інфрачервоний спектр ДНК інтактного пародонту.

пародонти з запаленням ми аналізуємо у вищезазначених смугах поглинання.

Значні зміни смуг поглинання ІЧ спостерігалися у $-\delta sCH_3$ групі азотистих основ. В інтактному пародонті у $-\delta sCH_3$ ІЧ смуги були без змін (**рис.**). Центр смуги коливання $-\delta sCH_3$ групи знаходився на 1375 ± 1 см⁻¹. Відсоток інтенсивності за шкалою пропускання ІЧ випромінювання склав $7,18 \pm 0,74$ %. Відсоток ІЧ поглинання смуги 1375 ± 1 см⁻¹ з запаленням пародонту дорівнював $10,39 \pm 2,44$ % (**P=0.001).

Зміни смуг поглинання ІЧ випромінювання спостерігалися у δsCH_2 групі. У інтактному пародонті δsCH_2 смуга наступна – центр смуги коливання – 1464 см⁻¹, відсоток інтенсивності за шкалою пропускання ІЧ випромінювання – $0,24 \pm 0,03$ %. Відсоток ІЧ поглинання смуги – 1464 см⁻¹ у другій групі склав $0,32 \pm 0,06$ % (**P=0.001). Відсотки інтенсивності

за шкалою пропускання валентних, деформаційних та маятникових коливань СНЗ та СН2 груп ДНК наведені у **табл.**

Висновки. На підставі проведених досліджень з упевненістю можна стверджувати, що запальні зміни у клітинах призводять до підвищення вмісту метильних груп у ДНК.

Отримані дані дозволяють зробити припущення, що однією з ланок патогенезу пародонтиту є патологічне ендо- та екзогенне метилування ДНК клітин пародонта при різних морфологічних формах запалення.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується дослідити морфологічні зміни в ядерному апараті тканин пародонту методом люмінесцентної мікроскопії.

Література

1. Грудянов А. И. Соотношение между перекисным окислением липидов слюны и местное лечение пародонтита гелем ди-Клорана / А. И. Грудянов, В. В. Овчинникова, Л. Е. Серебрякова // *Стоматология*. – 2002. – №4. – С. 31-34.
2. Ипполитов Ю. А. Комплексное лечение хронического генерализованного пародонтита с применением аппликационной В-терапии : дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук : спец. 14. 01. 14 «Стоматология» / Ипполитов Юрий Анатолиевич. – Воронеж, 1996. – 276 с.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Epigenetic change in E-Cardherin and COX-2 to predict chronic periodontitis / Wings T. Y. Loo, Lijian Jin, Mary N. B. Cheung, [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. – 2010. – № 8. – P. 110-116.
7. 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.
8. Fuchs J. Genotoxic potential of porphyrin type photosensitizers with particular emphasis on 5-aminolevulinic acid: implications for clinical photodynamic therapy / J. Fuchs, S. Weber, R. Kaufmann. // *Free Radical Biol. Med.* – 2000. – № 28. – P. 37-48.
9. Interferon gamma promoter hypomethylation and increased expression in chronic periodontitis / S. Zhang, A. Crivello, S. Offenbacher [et al.] // *J. Clin. Periodontol. current*. – 2010. – № 37. – P. 953–961.
10. Kelma C. Methylation Pattern of IFNG in Periapical Granulomas and Radicular Cysts Basic Research / C. Kelma, C. G. Carolina, J. F. Correia-Silva // *Biology*. – 2013. – Vol. 39. – № 4. – P. 493-796.
11. Methylation pattern of IFN and IL-10 genes in periodontal tissues / M. B. Viana, F. P. Cardoso, M. G. Diniz [et al.] // *Immunobiology*. – 2011. – № 216. – P. 936– 941.
12. Propylene oxide and epichlorohydrin induce DNA strand breaks in human diploid fibroblasts / A. Kolman, M. Duiinsha, B. Cedervall [et al.] // *Mol. Mutagen.* – 1997. – Vol. 30. – P. 40-46.
13. Propylene oxide and epichlorohydrin induce DNA strand breaks in human diploid fibroblast / A. Kolman, M. Duiinsha, B. Cedervall [et al.] // *Mol. Mutagen.* – 1997. – Vol. 30. – P. 40-46.

УДК 612.014.46:616.314.28-073

ЗМІНИ ДНК ТКАНИН ПАРОДОНТУ ПРИ ЗАПАЛЕННІ

Кузенко Є. В.

Резюме. Об'єктом даного дослідження явилось метилування ДНК при запаленні пародонту не залежно від морфологічної форми та ступеню тяжкості.

Аналіз інфрачервоних спектрів ДНК проводили у Origin Version 8. Для статистичної обробки отриманих результатів використовували програму Statistika 8. 0 з урахуванням критерію Стюдента та перевіркою на нормальність.

Значні зміни смуг поглинання інфрачервоного випромінювання спостерігалися у $-\delta sCH_3$ групі азотистих основ. У хворих з інтактним пародонтом у $-\delta sCH_3$ інфрачервоної смуги змін не спостерігалось. Центр смуги коливання $-\delta sCH_3$ групи знаходився на 1375 ± 1 см⁻¹. Відсоток інтенсивності за шкалою пропускання інфрачервоного випромінювання склав $7,18 \pm 0,74$ %. Відсоток ІЧ поглинання смуги 1375 ± 1 см⁻¹ у хворих з запаленням пародонту дорівнював $10,39 \pm 2,44$ % (**P=0.001).

Висновки. На підставі проведених досліджень з упевністю можна стверджувати, що запальні зміни у клітинах призводять до підвищення вмісту метильних груп у ДНК.

Ключові слова: алкілювання, інфрачервона спектродотометрія, метилування ДНК, пародонт, запалення.

УДК 612.014.46:616.314.28-073

ИЗМЕНЕНИЯ ДНК ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

Кузенко Е. В.

Резюме. Объектом данного исследования является метилирование ДНК при воспалении пародонта независимо от морфологической формы и степени тяжести.

Анализ инфракрасных спектров ДНК проводили в Origin Version 8. Для статистической обработки полученных результатов использовали программу Statistika 8.0 с учетом критерия Стюдента и проверкой на нормальность.

Значительные изменения полос поглощения ИК наблюдались в $-\delta sCH_3$ группе азотистых оснований. При интактном пародонте полосы CH_3 групп были без особенностей. Центр полосы колебания $-\delta sCH_3$ группы находился на $1375 \pm 1 \text{ см}^{-1}$. Процент интенсивности по шкале пропускания ИК составил $7,18 \pm 0,74\%$. Процент ИК поглощения полосы $1375 \pm 1 \text{ см}^{-1}$ больных с воспалением пародонта составил $10,39 \pm 2,44\%$ (***) ($P = 0.001$).

Выводы. На основании проведенных исследований можно утверждать, что воспалительные изменения в клетках приводят к повышению содержания метильных групп в ДНК.

Ключевые слова: алкилирование, инфракрасная спектродотометрия, метилирование ДНК, пародонт, воспаление.

UDC 612.014.46:616.314.28-073

DNA Changes of Periodontal Tissues during Inflammation

Kuzenko Ye. V.

Abstract. The object of this study was to analyze of DNA alkylation by infrared spectroscopy.

The infrared spectroscopy is widely used for gathering structural information on biological systems, but not used in periodontitis inflammation researchers. The study of DNA by infrared spectroscopy requires peeled DNA samples. The infrared spectra of DNA show many characteristic: denaturation, alkylation, dehydration and conformational transition.

Further studies of DNA by infrared spectroscopy are needed to determine the functional relevance of these alterations and the accomplishment of epigenetic investigations could have a future impact on diagnostic and/or therapeutic tools in treating periodontitis

The study population included 56 patients with marginal periodontitis. Only patients with available tissue represent a subset of the overall study cohorts. Recorded with a DNA IR spectrometer (SPECTRUM ONE (PerkinElmer)) with using KBr beam splitter. Interferograms were accumulated over the spectral range 450-400 $^{\circ}$ Cm The infrared spectra of DNA analyzed in OriginPro 8

Results. IR spectra of the DNA bands can be roughly divided into three areas: first – 4000-200 $^{\circ}$ Cm $^{-1}$ – variations of bases, the second – 1700-150 $^{\circ}$ Cm $^{-1}$ – DNA deoxyribose vibrations, third – 1300-1000 $^{\circ}$ Cm $^{-1}$ – deoxyribose and phosphate groups in the skeleton of the DNA molecule. The bands of the spectrum depending on the absorption of infrared radiation can be divided into: strong – $\leq 20\%$ average – $20\% - 5\%$ and weak – $5\% \geq$. Due to the complexity of the structure of DNA arises imposition peaks of adenine, thymine, guanine, cytosine, deoxyribose and phosphorus balance in the group CH_3 , CH_2 .

Significant changes were observed infrared spectroscopy absorption bands at $-\delta sCH_3$ group. In patients with intact periodontium features in CH_3 – IR bands were observed. Center band oscillations – $-\delta sCH_3$ group was at $1375 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$. Percentage intensity on a scale infrared spectroscopy transmittance was $7,18 \pm 0,74\%$. Percentage of infrared absorption bands $1375 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ first patients with periodontal inflammation equal to $10,39 \pm 2,44\%$ ($P = 0.001$). Changes in IR absorption bands observed in δsCH_2 group. In intact periodontal δsCH_2 next strip center strip vibrations 1464 cm^{-1} , the percentage of intensity on a scale transmission of infrared radiation – $0,24 \pm 0,03\%$. Percentage of infrared spectroscopy absorption band 1464 cm^{-1} in the second group was $0,32 \pm 0,06\%$ ($P = 0.001$).

Conclusion. On the basis of studies pevnistyly can be argued that inflammatory changes in the cells leads to an increase in the content of a methyl group to DNA. These data suggest prypushennya that one of the pathogenesis of periodontitis is abnormal endogenous and exogenous DNA methylation periodontal cells with different morphologic forms of inflammation.

Key words: alkylation by infrared spectroscopy, DNA methylation, periodontitis inflammation.

Рецензент – проф. Скрипніков П. М.

Стаття надійшла 10. 01. 2014 р.