

УДК: 616.331.2-002-018-003.9:577.151.4

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

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

Кузенко Є.В.<sup>1,2</sup>, к.мед.н., ас.,  
Романюк А.М.<sup>1</sup>, д.мед.н., проф.,  
Політун А.М.<sup>3</sup>, д.мед.н., проф.  
<sup>1</sup>каф. патологічної анатомії,  
Медичний інститут Сумського  
державного університету  
<sup>2</sup>хірург-стоматолог щелепно-  
лицевого відділення Сумської  
обласної клінічної лікарні  
<sup>3</sup>каф. терапевтичної стоматології,  
Приватний вищий навчальний  
заклад «Київський медичний  
університет Української асоціації  
народної медицини»  
Kuzenko Ye.V.<sup>1,2</sup>, PhD, Prof. Ass.,  
Romaniuk A.M.<sup>1</sup>, DMD, Prof.,  
Politun A.M.<sup>3</sup>, DMD, Prof.  
<sup>1</sup>Department of Pathology, Medical  
Institute of Sumy State University  
<sup>2</sup>Surgeon of Maxillofacial Department  
in Sumy Regional Hospital  
<sup>3</sup>Department 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±2,06% (p<0,05). Середнє значення MGMT «+» ядер шарів епітелію ясен становить 72,72±3,67% (p<0,05), а MGMT «+» ядер клітин фіброзної тканини періодонтальної щілини – 43,21±4,87% (p<0,05). Кількість острівців Мальяссе з MGMT «+» ядрами у межах 55,09±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-methylguanin-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, imunogistohimicheski (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±2,06% (p<0,05). Mean MGMT «+» nuclei layer gingival epithelial was 72,72±3,67% (p<0,05). MGMT «+» fibrous tissue periodontal – 43,21±4,87% (p<0,05). Number of Malyasse MGMT «+» nuclei was 55,09±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±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  $r=-0.76$  ( $p=0,05$ ).

**Keywords:** 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±1,71% ( $p<0,05$ ) MGMT позитивних клітин, у проміжному шарі – 41,35±2,75% ( $p<0,01$ ). У парабазальному шарі стало значення MGMT позитивних клітин становило 70,03±9,85%. Кісткова тканина за кількістю MGMT позитивних клітин на рівні інтактного пародонта – 98,25±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±2,17% MGMT «+» ядер, у середній третині – 29,89±5,87% ( $p<0,05$ ) MGMT «+» ядер. Сталий рівень MGMT «+» ядер відзначили у нижній третині періодонтальної щілини – 48,23±6,25%. В епітеліальних острівцях Маляссе спостерігали підвищений рівень MGMT «+» клітин – 63,28±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-

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

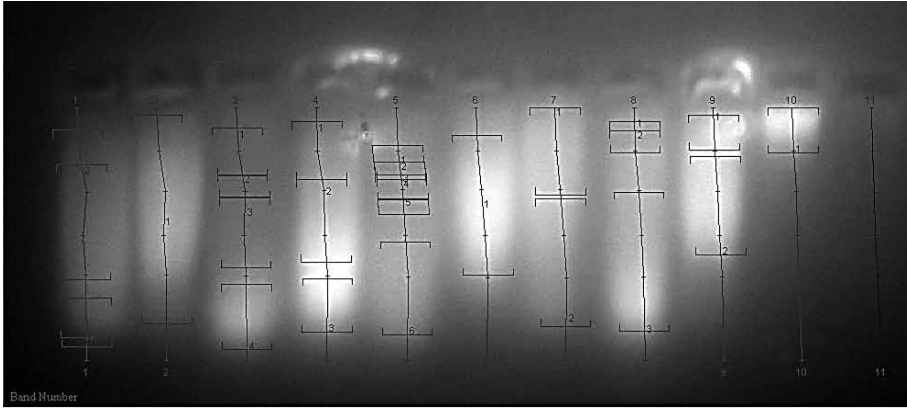
зувались наявністю MGMT «+» клітин на рівні 25,78±4,72% ( $p<0,05$ ) та 21,80±3,26% ( $p<0,05$ ). Практично вдвічі знизився рівень MGMT «+» клітин в острівцях Маляссе та дорівнював 31,50±7,20% ( $p<0,05$ ).

4) Зниження MGMT «+» клітин до 71,34±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±0,36%. Вдвічі знизився рівень MGMT «+» клітин у середній та нижній третинах періодонтальної щілини і становив 10,27±3,85% ( $p<0,05$ ) та 9,55±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±4,81% ( $p<0,05$ ) та 15,21±4,03% ( $p<0,05$ ).

6) Прогресуюче некротичне ушкодження характеризувалося лише незначною кількістю MGMT «+» клітин у парабазальному шарі епітелію – 10,23±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-

а б в г д е є ж з і ї



**Мал. 3.** Фрагментація ДНК тканин пародонта в інтактному пародонті та при запаленні: ї — 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.

## 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. Duijnsh, 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. Suffrin, 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). — P. 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. — Vol. 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.
- Белокликая Г.Ф. Современный взгляд на классификацию болезней пародонта / Г.Ф. Белокликая // *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. Cydoxygenase 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 Cydoxygenase-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. Grivello, S. Offenbacher [et al] // *J Clin Periodontol current*. — 2010. — N37. — P. 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. Кузембаева, 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. Sasai, 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 политепных 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