

УДК 675.001.5+616.314-089.843 DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.4081799>

АБЕРРАНТНОЕ МЕТИЛИРОВАНИЕ LINE1 У БОЛЬНЫХ С ПАРОНДОТИТОМ НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

¹Рожко П.Д., ²Деньга О.В., ²Вербицкая Т.Г., ²Деньга А.Э.,
³Бубнов В.В.

¹Одесский национальный медицинский университет

²Государственное учреждение «Институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Национальной академии медицинских наук Украины»

³Одесский международный медицинский университет

АБЕРАНТНЕ МЕТИЛЮВАННЯ LINE1 У ХВОРИН З ПАРАНТИТОМ НА ФОНІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ ТА МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ

¹Рожко П.Д., ²Деньга О.В., ²Вербицка Т.Г., ²Деньга А.Е.,
³Бубнов В.В.

¹Одеський національний медичний університет

²Державна установа «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії Національної академії медичних наук України»

³Одеський міжнародний медичний університет

ABERRANT METHYLATION OF LINE 1 IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES PERIODONTITIS AND METABOLIC SYNDROME

¹Rozhko P.D., ²Denga O.V., ²Verbitskaya T.G., ²Denga A.E.,
³Bubnov V.V.

¹Odessa National Medical University

²State Establishment «The Institute of Stomatology and Maxillo-Facial Surgery National Academy of Medical Science of Ukraine»

³Odessa International Medical University

Summary/Резюме

The methylation state of LINE1 is of interest as a promising diagnostic biomarker and therapeutic target for the diagnosis, prognosis and therapy of multifactorial diseases. Aberrant methylation of LINE1 to assess the progression of metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus in the presence of chronic generalized periodontitis showed a significant decrease in the level of methylated LINE1 DNA in the gums and blood of such patients, which correlates with a decrease in the content of methylated IL6 gene DNA. However, there was no significant difference between methylation of LINE1 DNA in patients with chronic generalized periodontitis of varying severity.

Key words: DNA methylation, LINE1 gene, chronic generalized periodontitis, diabetes mellitus, metabolic syndrome.

Состояние метилирования LINE1 представляет интерес в качестве перс-

пективного диагностического биомаркера и терапевтической мишени для диагностики, прогнозирования и терапии многофакторных заболеваний. Аберрантное метилирование LINE1 для оценки прогрессирования метаболического синдрома, сахарного диабета 2 типа на фоне хронического генерализованного пародонтита показало достоверное снижение при этом уровня метилированной ДНК LINE1 в тканях десны и крови таких пациентов, которое коррелирует со снижением содержания метилированной ДНК гена IL6. При этом не выявлено достоверной разницы между метилированием ДНК LINE1 у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом различной степени тяжести.

Ключевые слова: метилирование ДНК, ген LINE1, хронический генерализованный пародонтит, сахарный диабет, метаболический синдром.

Стан метилювання LINE1 представляє інтерес в якості перспективного діагностичного біомаркера і терапевтичної мішені для діагностики, прогнозування і терапії багатofакторних захворювань. Аберантне метилювання LINE1 для оцінки прогресування метаболічного синдрому, цукрового діабету 2 типу на фоні хронічного генералізованого пародонтиту показало достовірне зниження при цьому рівня метильованої ДНК LINE1 в тканинах ясен і крові таких пацієнтів, яке корелює зі зниженням вмісту метильованої ДНК гена IL6. При цьому не виявлено достовірної різниці між метилюванням ДНК LINE1 у пацієнтів з хронічним генералізованим пародонтитом різного ступеня тяжкості.

Ключові слова: метилювання ДНК, ген LINE1, хронічний генералізований пародонтит, цукровий діабет, метаболічний синдром.

Введение

Состояния с высоким риском развития сахарного диабета (СД) и метаболического синдрома (МС) создают предпосылки к формированию воспалительно-деструктивных поражений пародонта, что необходимо учитывать при ортопедическом и ортодонтическом лечении таких пациентов [1].

У пациентов с МС и при СД 2 типа эпигенетические механизмы могут быть вовлечены в регуляцию генов, которые дифференцированно экспрессируются. Нарушение механизмов эпигенетической регуляции напрямую или косвенно связано с множеством заболеваний. Это относится и к длинным вкрапленным последовательностям ядерного элемента 1 (LINE1), который является мар-

кером глобального метилирования ДНК генома [2]. Элементы LINE1 представляют собой семейство полученных из транспозонов последовательностей повторов, диспергированных в геноме [3]. Длинные чередующиеся ядерные элементы LINE1 или ретротранспозоны, составляют около 17 % ДНК человека. Они используют «механизм» копирования и «вставки» для распространения себя по всему геному через промежуточные РНК (ретротранспозиция) [4]. LINE1 начинаются с нетранслируемой области (UTR), которая включает в себя промотор РНК - полимеразы II, две перекрывающиеся открытые рамки считывания (ORF1 и ORF2), и заканчивается с другим UTR. Встраиваясь в геном, L1 элементы могут изменять уровень транскрипции гена. Одним из основных механизмов регуляции экс-

прессии ретротранспозона LINE1 является метилирование ДНК. В соматических клетках метилирование ДНК ответственно за поддержание и реализацию таких фундаментальных биологических процессов, как инактивация X-хромосомы, геномный импринтинг, регуляция тканеспецифичной экспрессии генов, репрессия ретротранспозонов в геноме [5]. Однако изменение уровня метилирования ДНК происходит и при патологических процессах, которые проявляются с увеличением возраста, в том числе при атеросклерозе, артериальной гипертензии, МС, СД 2 типа [6-8]. Промоторные регионы ретротранспозона содержат большое число CpG-сайтов, которые обычно характеризуются высоким уровнем метилирования. Повышенный уровень экспрессии мобильного элемента сопровождается частичным деметилированием промоторов LINE1 в 5'-UTR регионе [9]. Таким образом, состояние метилирования LINE1 представляет интерес как перспективный диагностический биомаркер и терапевтическая мишень для диагностики, прогнозирования и терапии многофакторных заболеваний.

Цель исследования: изучить возможность использования анализа aberrантного метилирования LINE1 для оценки прогрессии метаболического синдрома, диабета 2 типа на фоне хронического генерализованного пародонтита (ХГП) при дентальной имплантации.

Материалы и методы

Кровь и ткань десны были взяты от 14 пациентов с ХГП, у 5 из них был метаболический синдром, 4 пациента имели диабет 2 типа. 5 пациентов без сопутствующих заболеваний имели ХГП разной степени.

ДНК выделяли с помощью набора «QIAamp DNA Mini Kit» (Qiagen) в соответствии с рекомендациями производителя. Чистоту выделенных препаратов ДНК и концентрацию определяли спектрофотометрически. Бисульфитную обработку выделенной ДНК с концентрацией 1 мкг/мл проводили с помощью набора «EpiTect Bisulfite Kit» (Qiagen). ДНК амплифицировали методом ПЦР с использованием HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN), ПЦР-буфера, смеси dNTP (Fermentas) и специфичных праймеров по программе: начальная денатурация 95°C-15 мин.; денатурация

Таблица 1

Нуклеотидная последовательность праймеров

Ген	Праймеры (5'-3')
LINE1-F	Biotin-TTTTGGATTTGATTAGTTTGATATAAGAA
LINE1-R	CATTTTCAACCACAAACAATACTATTA
LINE1-S	AGTTAGGTGTGGGATATAGT

Примечание: F-прямой, R-обратный, S-секвенирующий, Biotin-модификация биотином

Таблица 2

Содержание метилированной ДНК в промоторе гена LINE1 у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта, метаболическим синдромом, сахарным диабетом

Группы пациентов (n = 14)	Содержание метилированной ДНК в промоторе гена LINE1, %	
	Ткань десны	Кровь
ХГП, (n = 5)	81,5 ± 1,8	81 ± 2,0
ХГП + МС, (n = 5)	77,4 ± 1,7 p = 0,01	75,5 ± 2,1 p = 0,04
ХГП + СД 2 типа, (n = 4)	68,3 ± 2,3 p = 0,005	69,1 ± 2,7 p = 0,01

Примечание: p — показатель достоверности отличий от группы «ХГП».

95°C – 30 сек., отжиг праймеров 52°C – 30 сек, элонгация 72°C – 30 сек, 39 циклов; финальная элонгация 72°C – 10 мин. Последовательности праймеров представлены в таблице 1.

Пиросеквенирование проводили с использованием наборов PyroMark Gold Q24

в соответствии с протоколом изготовителя на приборе PyroMark Q24 (Швеция). Содержание метилированной ДНК в пробе оценивали с помощью программы PyroMark CpG software 2.01. Для статистической обработки данных использовали программу Statistica, версия 10.

Результаты исследования и их обсуждение

Было проведено изучение метилирования длинных повторяющихся последовательностей LINE1 у больных, направленных на дентальную имплантацию, с ХГП (5 человек), с ХГП, протекающим на фоне СД 2 типа (4 человека), и с ХГП, протекающим на фоне МС (5 человек). Анализ метилирования проводили в тканях десны и в крови пациентов.

В результате проведенного анализа было показано, что в тканях десны метилирование ДНК LINE1 у больных с ХГП и МС было достоверно ниже ($77,4 \pm 1,7$), чем у пациентов с ХГП ($81,5 \pm 1,8$) (табл. 2).

Аберрантное метилирование LINE1 в тканях пародонта у пациентов с ХГП на фоне СД 2 типа было достоверно ниже ($68,3 \pm 2,3$), чем у больных с МС ($77,4 \pm 3,0$). Изучение содержания метилированной ДНК LINE1 в крови у пациентов с ХГП и сопутствующим сахарным диабетом и метаболическим синдромом показало достоверное отличие в содержании метилированной ДНК LINE1 в крови у пациентов с сахарным диабетом по сравнению с пациентами с пародонтитом и пациентами с метаболическим синдромом.

В крови пациентов с метаболическим синдромом содержание метилированной ДНК LINE1 было ниже ($75,5 \pm 2,1$) чем у пациентов с ХГП ($81 \pm 2,2$), но выше чем у пациентов с

сахарным диабетом $69,1 \pm 2,7$. Т.е. закономерность изменения степени метилирования ДНК LINE1 в тканях пародонта и крови одинакова, что предполагает возможность в дальнейшем использование крови, как более удобного биологического образца, для клинических и эпидемиологических целей (табл. 2).

Достоверное снижение уровня метилированной ДНК LINE1 в крови больных с диабетом и метаболическим синдромом по сравнению с пациентами без этой патологии говорит о заинтересованности эпигенетического контроля функции ретротранспозонов в развитии сахарного диабета и метаболического синдрома.

На рисунке 1 представлены данные количественного секвенирования последовательности LINE1 в тканях пародонта у больных с пародонтитом, СД 2 типа и МС.

В работе [8] были проанализированы уровни метилирования ДНК LINE1 в связи с риском развития метаболического синдрома. Показано, что уровень метилирования ДНК LINE1 от 67 до 73,8 % ассоциирован с высоким риском развития тяжелого метаболического синдрома (OR 4,4; $p=0,004$). При степени метилировании в диапазоне 75-77,3% риск был ниже (OR 1,8; $p=0,2$).

По нашим данным у группы пациентов с ХГП и с диабетом 2 типа уровень метилированной ДНК LINE1 также соответствует высокому риску развития МС. Оценка уровня метилирования ДНК у пациентов с ХГП различной степени выраженности (без диабета и МС) не выявила достоверной разницы.

Снижение содержания метилированной ДНК LINE1 в тканях десны у пациентов с ХГП в нашем случае прямо пропорционально коррелирует со

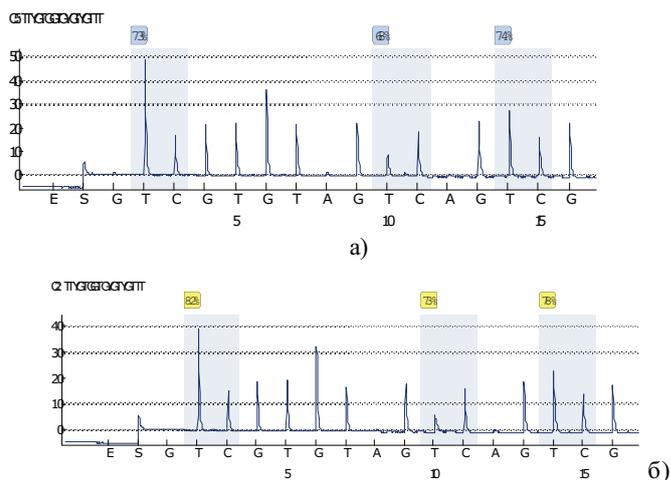


Рис. 1 Пирограмма секвенирования CpG сайтов метилирования LINE1 в тканях десны у больных сахарным диабетом (а) и метаболическим синдромом (б) на фоне хронического генерализованного пародонтита

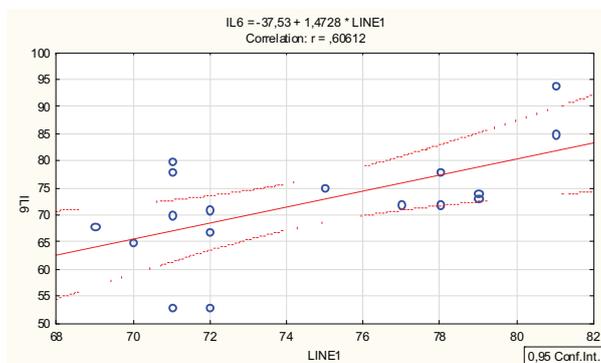


Рис. 2 Корреляция между содержанием метилированной ДНК LINE1 и гена IL6 в образцах ткани дёсен у пациентов с ХГП

снижением содержания метилированной ДНК гена IL6, $r = 0,61$ (рис. 2). Ген IL6 играет важную роль в развитии сахарного диабета и резистентности к инсулину [10]. Обычно, снижение содержания метилированной ДНК гена IL6 приводит к повышению экспрессии цитокина и развитию провоспалительных реакций [11].

Бисульфитное секвенирование повторяющихся элементов, выполняемое для LINE1, является быстрым и простым методом оценки глобального метилирования ДНК, который можно использовать для разработки таргетной терапии и оценки её эффективности при ортопедическом и орто-

донтическом лечении.

Выводы

Выявлено у пациентов с ХГП достоверное дополнительное снижение уровня метилированной ДНК LINE1 в тканях десны и крови с СД 2 типа и МС по сравнению с пациентами без метаболических нарушений.

Содержание метилированной ДНК LINE1 в тканях десны у пациентов с ХГП коррелирует с содержанием метилированной ДНК гена IL6.

Не выявлено достоверной разницы между метилированием ДНК LINE1 у больных с ХГП различной степени тяжести (без СД 2 типа и МС).

Литература

1. Романенко И.Г. Генерализованный пародонтит и метаболический синдром. Единство патогенетических механизмов развития / И.Г. Романенко, Д.Ю. Крючков // Крымский терапевтический журнал. – 2011. – №1. – С. 60-67.
2. Nelson H.H. Global methylation in exposure biology and translational medical science / H.H. Nelson, C.J. Marsit, K.T. Kelsey // Environ Health Perspect. – 2011. – №119. – P.1528–1533.
3. Lander E.S. Initial sequencing and analysis of the human genome / Lander E.S., Linton L.M., Birren B // Nature. – 2001. – №409. – P. 860–921.
4. Дейчман А.М. Повторы, нестабильность генома и онкогенез. Возможный биосинтез олигонуклеотидов вне генома / Дейчман А.М. Монография – М.: Мир науки, 2015. – 169 с. ISBN 978-5-9906296-7-7
5. Лебедев И. Н. Эпимутации импринтированных генов в геноме человека: классификация, причины возникновения, связь с наследственной патологией / И. Н. Лебедев, Е. А. Саженова

- // Генетика. – 2008. – Т. 44. – С. 1356-1373.
- Cash, H. L. Cardiovascular disease risk factors and DNA methylation at the LINE1 repeat region in peripheral blood from Samoan Islanders / H. L. Cash, S. T. McGarvey, E. A. Houseman // Epigenetics. – 2011. – №6(10). – P. 1257–1264.
 - The shortening of leukocyte telomere length relates to DNA hypermethylation of LINE1 in type 2 diabetes mellitus / Y. Wu, W. Cui, D. Zhang[et al.] // Oncotarget. – 2017. – №8. – P. 73964–73.
 - Turcot V. LINE1 methylation in visceral adipose tissue of severely obese individuals is associated with metabolic syndrome status and related phenotypes / V. Turcot, A. Tchernof, Y. Deshaies // Clinical epigenetics. – 2012. – №4(1). – P. 10.
 - Васильев С.А. Эпигенетическая регуляция ретротранспозона LINE1 и его роль в эмбриогенезе / С.А. Васильев, Е.Н. Толмачёва, И.Н. Лебедев // Генетика. – 2016. – Т.52. – № 12. – С. 1349–1357.
 - Литвинова Л.С. Патогенез инсулинорезистентности при метаболическом ожирении / Л.С. Литвинова, Е.В. Кириенкова, И.О. Мазунин // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61. – №1. – С. 70-82.
 - Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis / C.J. Nile, R.C. Read, M. Akil, [et al.]// Arthritis Rheum. – 2008. – 58(9). – P. 2686-93.
- ### References
- Romanenko I.G., Kryuchkov D.Yu.. Generalized periodontitis and metabolic syndrome. The unity of pathogenetic mechanisms of development. *Kryms'kiy terapevtichnyj zhurnal*. 2011;1:60-67.
 - Nelson HH, Marsit CJ, Kelsey KT. Global methylation in exposure biology and translational medical science. *Environ Health Perspect*. 2011;119:1528–1533.
 - Lander ES, Linton LM, Birren B. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860–921.
 - Deichman A.M. Repetitions, genome instability and oncogenesis. Possible biosynthesis of oligonucleotides outside the genome. Monograph - Moscow: World of Science, 2015: 169. ISBN 978-5-9906296-7-7
 - Lebedev I.N. Sazhenova E. A. Epimutations of imprinted genes in the human genome: classification, causes, connection with hereditary pathology. *Genetics*. 2008;44:1356-1373.
 - Cash H.L., McGarvey S.T., Houseman E.A Cardiovascular disease risk factors and DNA methylation at the LINE1 repeat region in peripheral blood from Samoan Islanders. *Epigenetics*. 2011;6(10): 1257–1264.
 - Wu Y, Cui W, Zhang D, Wu W, Yang Z. The shortening of leukocyte telomere length relates to DNA hypermethylation of LINE1 in type 2 diabetes mellitus. *Oncotarget*. 2017;8:73964–73. doi: 10.18632/oncotarget.18167
 - Turcot V., Tchernof A., Deshaies Y. LINE1 methylation in visceral adipose tissue of severely obese individuals is associated with metabolic syndrome status and related phenotypes. *Clinical epigenetics*. 2012;4(1):10.
 - Vasiliev S. A., Tolmacheva E. N., Lebedev I. N. Epigenetic regulation of LINE1 retrotransposon and its role in embryogenesis. *Genetics*. 2016;52(12):1349–1357.
 - Litvinova L.S., Kirienkova E.V., Mazunin I.O., Vasilenko M.A., Fattakhov N.S. Pathogenesis of Insulin Resistance in Metabolic Obesity. *Biomedical Chemistry*. 2015;61(1):70-82.
 - Nile CJ, Read RC, Akil M, Duff GW, Wilson AG. Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(9):2686-93.

Впервые поступила в редакцию 23.01.2020 г.
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования