

Aneuploidy of buccal epithelial cells: a phenomenon or a potential threat

Summary. Aneuploidy is regarded today [1] as a result of reducing and lengthening of large areas (translocations) chromosome movement. Most aneuploid cells die immediately, but the few that survived have thousands of genes dose of which is not the same as in normal cells. Coordinated team of enzymes, providing the synthesis of deoxyribonucleic acid (DNA) and its integrity, breaks in the double helix, have gaps, further destabilizing the genome. The higher the degree of unstable cells aneuploidy the more likely tumor cells will be in the end result. A probability of tumors in the genetic defect presence is not predictable.

The aim of the study – to learn the contraction and extension of chromosomal motion on large areas.

Materials and Methods. Modern materials used for dental prostheses include crosslinked polymers and somonomery materials to be relatively intact cells of oral mucosa. However, only acrylic detachable plate implants contain potentially hazardous substances, methyl esters of methacrylic acid, which, according to laboratory data, were protoplasmic poisons. But researchers observed the effect of only high doses of unrealistic dentures. The DNA cytometry technology fixes chromosomal lesions that can potentially cause the development of the tumor and which is likely to be a predictor of tumor growth. DNA content in nuclei of buccal epithelium cells was determined using flow cytometry

Results and Discussion. The indicators of cell cycle indicators buccal epithelium in 70 people were studied. Among them 23 patients on the background of the hypothesis of the plate crypt prosthesis, 23 – with the prosthetics on the basis of thermoplastic plastics. The comparison group consisted of 24 clinically healthy people without defects in dentition. Criteria for inclusion were patients with severe systemic diseases, tobacco smoking, burdened allergic history, complete absence of teeth, prosthetic stomatitis, chronic generalized periodontitis in acute condition, refusal of the patient to participate in the survey. The subject of the study was the buccal epithelium of the mucous membrane of the patient's oral cavity, since the superficial epithelium is the main structural and functional component of the mucous membrane. An unexpected damage to the cell cycle during treatment with acrylic prosthesis bases was the detection of aneuploid epithelium, which was detected in 2 patients. These cells are genetically unstable and a sign of readiness for tumor growth and the presence of aneuploidy is associated with more serious complications and is a marker of an adverse prognosis. The study describes aneuploid cells, but there is still a question: is this a phenomenon or a potential threat? We did not find any patient with acrylic prosthesis in whom the development of oral cavity was diagnosed, but it is necessary to know that the duration of using prosthetics was up to 2 years, which does not allow completely evaluating the oncogenic risk of this category of patients.

Conclusions. Aneuploidy is a serious violation of DNA that is fixed when using acrylic dentures. Potential carcinogenicity of this phenomenon requires further study.

Key words: aneuploidy; buccal epithelial cells; flow cytometry.

©М. П. Одуд, Е. В. Беляєв, Д. А. Лисенко

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова

Анеуплоїдія букальних епітеліальних клітин: феномен чи потенційна загроза

Резюме. Анеуплоїдію розглядають сьогодні як результат скорочення та подовження хромосомного руху великих площ (транслокацій). Більшість анеуплоїдних клітин вмирає відразу, проте ті, що вижили, мають тисячі генів, кількість яких не така як у звичайних клітинах. Скоординована група ферментів, що забезпечують синтез дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) і її цілість, розпадаються на подвійну спіраль, мають проміжки, що додатково дестабілізуються геном. Чим вищий ступінь анеуплоїдії, нестабільних клітин, тим більша вірогідність того, що під кінець будуть утворюватися пухлинні клітини. Ймовірність виникнення пухлин при наявності генетичного дефекту є не передбачуваною.

Мета дослідження – вивчити скорочення і подовження хромосомного руху великих площ.

Матеріали і методи. Сучасні матеріали, які використовують для протезування зубів, включають зшиті полімери та сомомери, що відносно нешкодують клітини слизової оболонки порожнини рота. Проте лише акрилові знімні пластинні протези містять потенційно небезпечні речовини, метилові ефіри метакрилової кислоти, які за лабораторними даними, виявилися протоплазматичними отрутами. Однак дослідники спостерігали ефект лише при високих дозах нереалістичних при застосуванні протезів. Технологія ДНК-цитометрії фіксує хромосомні ушкодження, що можуть потенційно спричинити процес розвитку пухлини, і що, ймовірно, є предиктором росту пухлини. Вміст ДНК у ядрах клітин букального епітелію визначали за допомогою протокової цитометрії.

Результати досліджень та їх обговорення. Вивчали показники клітинного циклу букального епітелію у 70 пацієнтів. Серед них 23 хворих на тлі протезування пластинових криптових протезів, 23 – із протезуванням на основі термопластичних пластмас. Група порівняння складалася з 24 клінічно здорових людей без дефектів зубних рядів. Критеріями виключення були пацієнти з наявністю серйозних системних захворювань, тютюнокуріння, обтяженої алергічної історії, повна відсутність зубів, протезний стоматит, хронічний генералізований пародонтит у гострому стані, відмова пацієнта від участі в опитуванні. Предметом дослідження був букальний епітелій слизової оболонки порожнини рота пацієнтів, оскільки поверхневий епітелій є основним структурним та функціональним компонентом слизової оболонки. Неочікуваним ушкодженням клітинного циклу під час лікування базами акрилових протезів стало виявленням анеуплоїдного букального епітелію, що було зафіксовано у 2 хворих. Такі клітини є генетично нестабільними й ознакою готовності до росту пухлини, а наявність анеуплоїдії пов'язана з більш серйозними ускладненнями і є маркером несприятливого прогнозу. В дослідженні описано анеуплоїдні клітини, але все ще залишається питання: це феномен чи потенційна загроза? Жодного пацієнта з акриловими протезами, в яких було діагностовано розвиток новоутворення порожнини рота, ми не виявили, проте необхідно зазначити, що тривалість використання протезів була до 2 років, що не дозволяє повністю оцінити онкогенний ризик цієї категорії хворих.

Висновки. Анеуплоїдія – серйозне порушення ДНК, яке фіксують при використанні акрилових протезів. Потенційна канцерогенність цього явища потребує подальшого вивчення.

Ключові слова: анеуплоїдія; букальні епітеліальні клітини; проточна цитометрія.

©М. П. Одуд, Е. В. Беляев, Д. А. Лысенко

Винницький національний медичинський університет імені Н. И. Пирогова

Анеуплоидия буккальных эпителиальных клеток: феномен или потенциальная угроза

Резюме. Анеуплоидию рассматривают сегодня как результат сокращения и удлинения хромосомного движения больших площадей (транслокаций). Большинство анеуплоидных клеток умирает сразу, однако выжившие, имеют тысячи генов, количество которых не такое как в обычных клетках. Скоординированная группа ферментов, обеспечивающих синтез дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и ее целостность, распадается на двойную спираль, имеют промежутки, дополнительно дестабилизируются геном. Чем выше степень анеуплоидии, нестабильных клеток, тем больше вероятность того, что к концу будут образовываться опухолевые клетки. Вероятность возникновения опухолей при наличии генетического дефекта непредсказуема.

Цель исследования – изучить сокращения и удлинения хромосомного движения больших площадей.

Материалы и методы. Современные материалы, используемые для протезирования зубов, включают зшитые полимеры и сомомеры, что в отношении не повреждают клетки слизистой оболочки полости рта. Однако только акриловые съемные пластинчатые протезы содержат потенциально опасные вещества, метиловые эфиры метакриловой кислоты, которые по лабораторным данным, оказались протоплазматическими ядами. Однако исследователи наблюдали эффект только при высоких дозах нереалистичных при применении протезов. Технология ДНК-цитометрии фиксирует хромосомные повреждения, которые могут потенциально повлиять на процесс развития опухоли, и, вероятно, является предиктором роста опухоли. Содержание ДНК в ядрах клеток буккального эпителия определяли с помощью проточной цитометрии.

Результаты исследований и их обсуждение. Изучали показатели клеточного цикла буккального эпителия в 70 пациентов. Среди них 23 больных на фоне протезирования пластиновыми криптовыми протезами, 23 – с протезированием на основе термопластичных пластмасс. Группа сравнения состояла из 24 клинически здоровых людей без дефектов зубных рядов. Критериями исключения были пациенты с наличием серьезных системных заболеваний, табакокурения, отягощенной аллергической исто-

рии, полное отсутствие зубов, протезный стоматит, хронический генерализованный пародонтит в остром состоянии, отказ пациента от участия в опросе. Предметом исследования был буккальный эпителий слизистой оболочки полости рта пациентов, поскольку поверхностный эпителий является основным структурным и функциональным компонентом слизистой оболочки. Неожиданным повреждением клеточного цикла во время лечения базами акриловых протезов стало выявлением анеуплоидного буккального эпителия, что было зафиксировано у 2 больных. Такие клетки есть генетически нестабильными и признаком готовности к росту опухоли, а наличие анеуплоидии связана с более серьезными осложнениями и является маркером неблагоприятного прогноза. В исследовании описано анеуплоидные клетки, но все еще остается вопрос: это феномен или потенциальная угроза? Одного пациента с акриловыми протезами, в которых было диагностировано развитие новообразования полости рта, мы не обнаружили, однако необходимо отметить, что продолжительность использования протезов была до 2 лет, не позволяет полностью оценить онкогенного риска этой категории больных.

Выводы. Анеуплоидия – серьезное нарушение ДНК, которое фиксируют при использовании акриловых протезов. Потенциальная канцерогенность этого явления требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: анеуплоидия; буккальные эпителиальные клетки; проточная цитометрия.

Summary. Aneuploidy is regarded today [1] as a condition of result and lengthening chromosome movement of large areas (translocations Most aneuploid cells die immediately, but the few that survived have thousands of genes dose of which is not the same as in normal cells. Coordinated team of enzymes, which provide synthesis of deoxyribonucleic acid (DNA) and its integrity, breaks in the double helix there are gaps, further destabilizing the genome. The higher the degree of aneuploidy, the unstable cells and the more likely that eventually will tumor cells. Probability of tumors in the presence of a genetic defect is not predictable. As we know, healthy tissues of the oral cavity, there is a dynamic balance between different populations of cells that ensure the normal functioning of both the tissue and whole body [2]. A feature of this is the ability of cells to epithelial keratinization individual sections, but this ability buccal epithelium occurs only in pathological conditions [3].

Modern materials used for dental prostheses include crosslinked polymers and somonomery materials to be relatively intact cells of oral mucosa [4]. But just acrylic removable plate prostheses contain potentially dangerous substance methyl esters of methacrylic acid in the laboratory proved to be protoplazmatyc poison while researchers observed the effect only at high doses unrealistic when using prostheses [5]. Known data [6] about the side effects during treatment with this type of prosthesis-related direct toxic effects on the cells of acrylic compounds mucosa of the mouth and their division. DNA cytometry technique captures chromosomal damage the device, which can potentially cause neoplastic development process that is likely to be a predictor of tumor growth.

Materials and Methods. The study of cell cycle indicators buccal epithelium in 70 people. Among them, 23 patients on the background of the prosthesis laminar crylic dentures, 23 patients with prosthetics based on thermoplastic plastics. Comparison group consisted of 24 clinically healthy persons free of defects dentition. Exclusion criteria were patients with examination, presence of serious systemic diseases, smoking, burdened allergic history, the complete absence of teeth, prosthetic stomatitis, chronic generalized periodontitis in the acute stage, patient refusal to participate in the survey.

The subject of the study was buccal epithelium of the oral mucosa of patients as superficial epithelium is the basic structural and functional component of the mucosa. The content of DNA in the nuclei of buccal epithelium cells determined by flow cytometry. For the flow cytometry suspension nuclei from cells of buccal epithelium person treated with a special solution for the study of nuclear DNA analysis of ploidy, cell cycle, CyStain DNA company Partec, Germany, which can simultaneously acquire nuclear suspension and perform fluorescence staining diamidinofenilindolom (DAPI) nuclear DNA. Samples were subjected to analysis in a flow cytometer «PAS» company Partec, using UV radiation and means of software FloMax, through the provision of Sub-GOG1 sites on DNA-RN1 bar graphs to peak GOG1 pointing to the nuclei of cells containing DNA <2c. The percentage of nuclei in a state apoptoz.S % + G2 / M% –indicators proliferation (proliferative index). The larger the value, the more intense proliferation and vice versa – the lower the value, the lower proliferative activity. For DAPI fluorescence excitation was

applied UV radiation. From each sample analysis the nuclear suspension subject to 10 thousand. DNA Distribution, which reflects the cell cycle and DNA fragmentation indicated on page one histogram using linear scale. Cyclical analysis of cells was performed by means of software FloMax (Partec, Germany) by providing gate RN2 (site on DNA histogram G0G1 indicates nuclei of cells containing DNA = 2c) and RN2 (site on a DNA-histogram S + G2 / M indicates the nuclei of cells in which the synthesis of DNA (DNA > 2c and < 4c, S) and preparation for separation (DNA = 4c, G2 / M DNA content > 4c).

The statistical processing of the obtained results was carried out in the license package "STATISTICA 6.1" with the use of nonparametric methods for evaluating the obtained results. Evaluated the correctness of the distribution of

characteristics for each of the variation series received, the mean of each studied feature, and the standard quadratic deviation.

Results and Discussion. The results of our study found a number of violations buccal epithelial cell cycle in the background using acrylic dentures. According to the data of our study acrylic removable dentures have negative effects on DNA buccal epithelial cells. We observed a significant increase in the level of cells that were in the range of Sub-G1 (Fig.1) in patients with such prostheses, the figure differed both from that of control and from that of the group which applied dentures with thermoplastics, which indicates not only direct contact as a factor of injury but also toxic effects material, realizing the side effects through the activation of apoptosis (Tab.1). However, unexpected damage to the cell cycle during

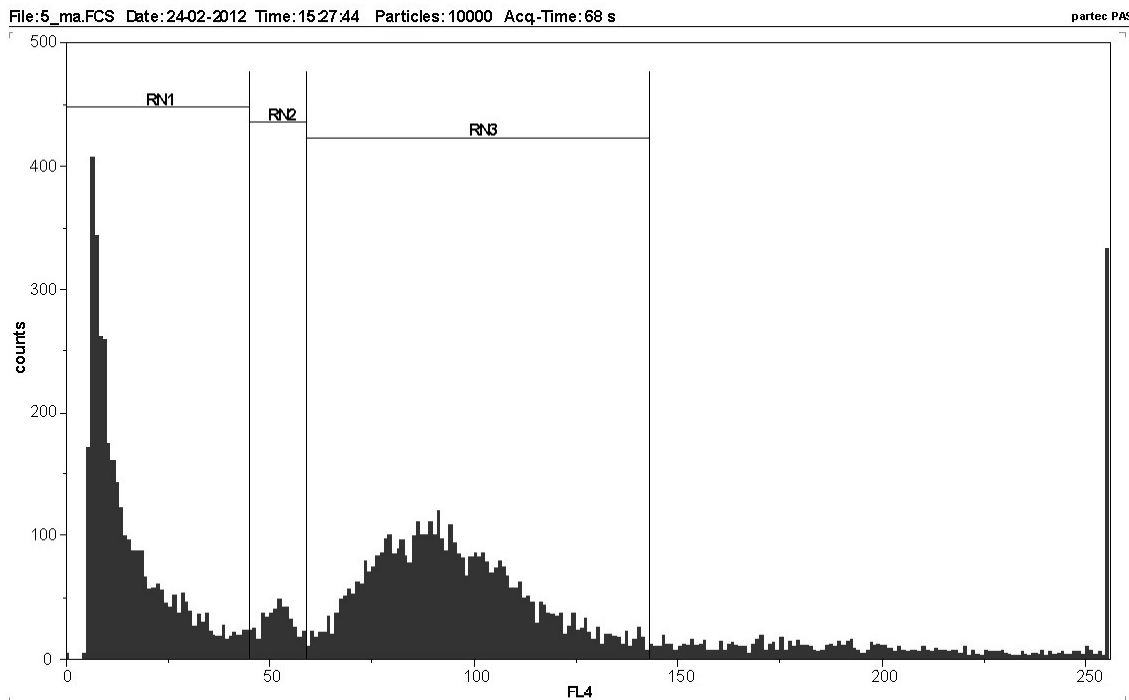


Fig. 1. Flow-cytometric analysis of nuclear DNA content in cells of buccal epithelium man with acrylic prosthesis. RN1 (Sub-G0G1) = 35.04 %, RN2 (G0G1) = 4.45 %, RN3 (S + G2 / M) = 47.35 %.

Tables 1. Indicators of the cell cycle of groups using different types of bases (M±m)

Cell cycle intervals, (%)	Group with thermoplastic bases (n=23)	Group with acrylic bases (n=23)	Control group (n=24)
Sub-G1	18.96±4.09	27.12±4.78**	15.11±4.38
S+G2/M	58.34±4.84	51.75±5.82*	64.47±5.33

Notes: 1) * – a statistically significant difference (p<0.05) was observed according to the Wilcoxon criterion relative to the control group;
2) ** – a statistically significant difference (p<0.05) was observed according to the Wilcoxon criterion for a group with thermoplastic bases.

treatment with acrylic dentures bases became detect aneuploidy buccal epithelium, which was recorded in 2 patients (Fig. 2,3). These results were surprising because, according to our sources available literature showed no publications devoted to the study aneuploidy during treatment with acrylic dentures bases. Revealed aneuploidy

may indicate a very serious potential complications paraneoplastic nature. Given the established data on the availability aneuploidy during treatment of dentures with acrylic bases can assume identify by DNA cytometry molecular signs of potential carcinogenesis. Enough interesting is that the mucous macroscopic changes are recorded

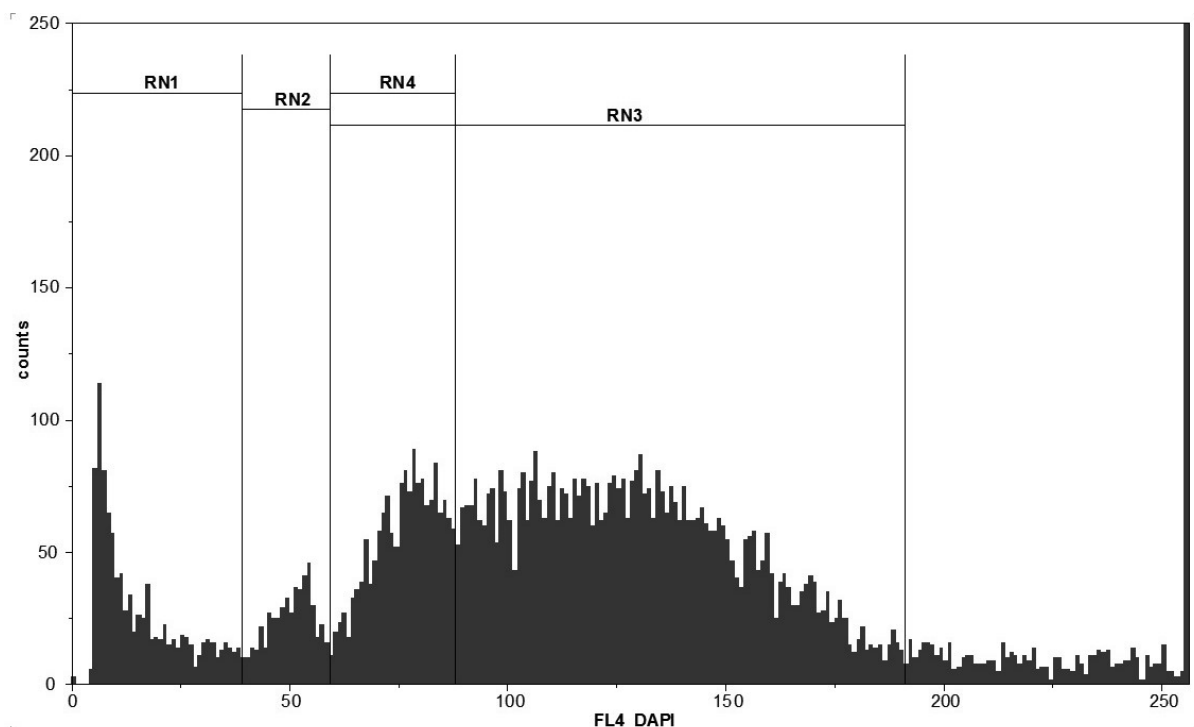


Fig. 2. Flow-cytometric analysis of nuclear DNA content in cells of buccal epithelium women with acrylic prosthesis. RN1 (Sub-G0G1) = 9.87 %, RN2 (G0G1) = 4.93 %, RN3 (S + G2 / M) = 60.46 %, RN4 (aneuploidy) = 16.12 %.

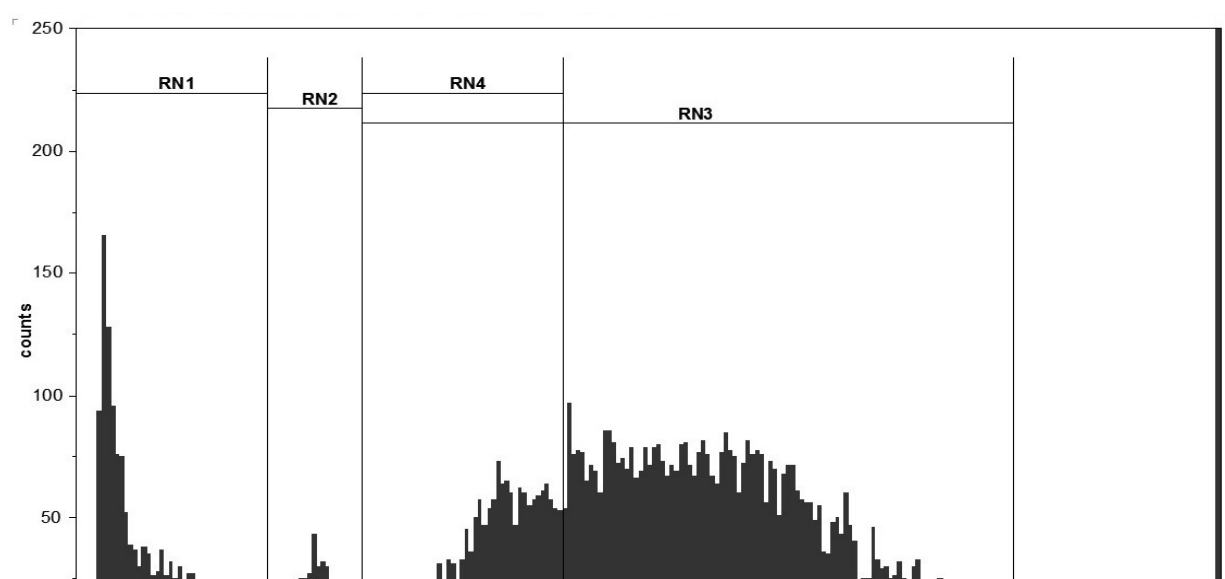


Fig. 3. Flow-cytometric analysis of nuclear DNA content in cells of buccal epithelium man with acrylic prosthesis. RN1 (Sub-G0G1) = 14.34 %, RN2 (G0G1) = 3.76 %, RN3 (S+G2 / M) = 67.92 %, RN4 (aneuploidy) = 15.78 %.

even when detecting aneuploidy, indicating that the same molecular changes have not been implemented at the cellular level.

This fact can be explained by the fact that we used the technology of DNA cytometry captures chromosomal damage that may cause the development of neoplastic process, that probably is a predictor of tumor growth.

We identified indicators require further study given that these molecular changes, such as aneuploidy often a sign of malignant growth. Since the breast tumor are identified cytologically benign diploid DNA kits and malignant tumors in 20 % of cases recorded is aneuploidy [8]. Similar results were obtained in the study of tumors of the thyroid, abdomen, brain. Researchers revealed aneuploidy often observed on the background of neoplastic progression, and against the background of resistance to cytostatic treatment [1]. Though

in agreement with previous reports specifically addressing DNA aneuploidy as a biomarker of this risk disputable. The results obtained by us showed the existence of deep cell cycle violations detected by DNA cytometry using acrylic bases, which consisted in reducing the percentage of events in the interval; in the form of an increase in cells in the Sub-G1 interval, as well as a decrease in cells in the S + G2 / M range ($p < 0.05$), ie the creation of a proliferative block, as well as the detection of aneuploidy as a marker of significant genetic disorders and a predictor of nonplastic processes.

That genetic instability cells clearly a sign of readiness to tumor growth, while its presence is associated with more severe and is a marker of unfavorable prognosis.

Our study revealed aneuploidy cells but still the question remains: is it a phenomenon or potential threat.

Literature

1. Chromosomal aberrations and aneuploidy in oral potentially malignant lesions: distinctive features for tongue / P. Castagnola, D. Malacarne, P. Scaruffi [et al.] // *BMC Cancer*. – 2011. – No. 11. – P. 445–447. PMID: PMC3229618. DOI: 10.1186/1471-2407-11-445.
2. Correlation between dysplasia and ploidy status in oral leukoplakia / van A. W. Zyl, M. B. van Heerden, E. Langenegger [et al.] // *Head Neck Pathol*. – 2012. – No. 6 (3). – P. 322–327. PMID:22430773. PMID: PMC3422580. DOI: 10.1007/s12105-012-0352-9.
3. Predictive value of dysplasia grading and DNA ploidy in malignant transformation of oral potentially malignant disorders / M. Sperandio, A. L. Brown, C. Lock [et al.] // *Cancer Prev. Res. (Phila)*. – 2013. – No. 6 (8). – P. 822–831. PMID:23761273. DOI:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0001.
3. Acrylic resin cytotoxicity for denture base-literature review / M. C. Goiato, E. Freitas, D. dos Santos [et al.] // *Adv. Clin. Exp. Med.* – 2015. – No. 24 (4). – P. 679–686. PMID:26469114. DOI:10.17219/acem/33009.
4. Ebrahimi Saravi M. Evaluation of cellular toxicity of three denture base acrylic resins / M. Ebrahimi Saravi, M. Vojdani, F. Bahrani // *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*. – 2012. – No. 9 (4). – P. 180–188. PMID:26469114. DOI:10.17219/acem/33009.
5. Patterns of cell death induced by eluates from denture

- base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells / M. R. Cimpan, L. I. Cressey, N. Skaug [et al.] // *European Journal of Oral Sciences*. – 2000. – Vol. 108, Issue 1. – P. 59–69. DOI: 10.1034/j.1600-0722.2000.00730.x.
6. Vijayavel T. Correlation between histological grading and ploidy status in potentially malignant disorders of the oral mucosa: A flow cytometric analysis / T. Vijayavel, N. Aswath // *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. – 2013. – No. 17 (2). – P. 169–175. DOI: 10.1034/j.1600-0722.2000.00730.x.
7. Genomic DNA copy number alterations from precursor oral lesions to oral squamous cell carcinoma / I. Salahshourifar, V. K. Vincent-Chong, T. G. Kallarakkal [et al.] // *Oral Oncology*. – 2014. – No. 50 (5). – P. 404–412. PMID: PMC3830221. DOI: 10.4103/0973-029X.119747.
8. Oral cancer genesis and progression: DNA near-diploid aneuploidization and endoreduplication by high resolution flow cytometry / A. Donadini, M. Maffei, A. Cavallero [et al.] // *Cell Oncol.* – 2010. – No. 32 (5–6). – P. 373–383. PMID:20448331. PMID:PMC4619238. DOI: 10.3233/CLO-2010-0525.
9. Duesberg P. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own / P. Duesberg, D. Rasnick // *Cell Motil. Cytoskeleton*. – 2000. – No. 47. – P. 81–107. PMID:11013390. DOI: 10.1002/1097-0169(200010)47:2<81::AID-CM1>3.0.CO;2-#.

References

1. Castagnola, P., Malacarne, D., Scaruffi, P., Maffei, M., Donadini, A., Di Nallo, E. ... Coco, S. (2011). *BMC Cancer*, 11, 445–447. DOI: 10.1186/1471-2407-11-445 PMID: PMC3229618 PMID:22430773 PMID: PMC3422580
2. van Zyl, A.W.1, van Heerden, M.B., Langenegger, E. & van Heerden, W.F. (2012). Correlation between dysplasia and ploidy status in oral leukoplakia. *Head Neck Pathol*, 6 (3), 322–327. PMID:22430773 PMID: PMC3422580 DOI: 10.1007/s12105-012-0352-9

3. Sperandio, M., Brown, A.L., Lock, C., Morgan, P.R., Coupland, V.H., Madden, P.B. ... Warnakulasuriya, S. (2013). Predictive value of dysplasia grading and DNA ploidy in malignant transformation of oral potentially malignant disorders. *Cancer Prev. Res. (Phila)*, 6 (8), 822–831. PMID:23761273 DOI:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0001
4. Goiato, M.C., Freitas, E., dos Santos, D., de Medeiros, R. & Sonogo, M. (2015). Acrylic resin cytotoxicity for

- denture base-literature review. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 24 (4), 679-686. PMID:26469114 DOI:10.17219/acem/33009.
5. Ebrahimi Saravi, M., Vojdani, M. & Bahrani, F. (2012). Evaluation of cellular toxicity of three denture base acrylic resins. *Journal of Dentistry (Tehran)*, 9 (4), 180-188. PMID: PMC3536452
6. Cimpan, M.R., Cressey, L.I., Skaug, N., Halstensen, A., Lie, S.A., Gjertsen B.T. & Matre, R. (2000). Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *European Journal of Oral Sciences*, (108), 1, 59-69. DOI: 10.1034/j.1600-0722.2000.00730.x
7. Vijayavel, T. & Aswath, N. (2013). Correlation between histological grading and ploidy status in potentially malignant disorders of the oral mucosa: A flow cytometric analysis. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*, 17 (2), 169-175. PMID: PMC3830221 DOI: 10.4103/0973-029X.119747
8. Salahshourifar, I., Vincent-Chong, V.K., Kallarakal, T.G. & Zain, R.B. (2014). Genomic DNA copy number alterations from precursor oral lesions to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*, 50 (5), 404-412. PMID: 24613650 DOI: 10.1016/j.oraloncology.2014.02.005
9. Malacarne, D., Di Nallo, E., ... Truini, M. (2010). Oral cancer genesis and progression: DNA near-diploid aneuploidization and endoreduplication by high resolution flow cytometry. *Cell Oncol.*, 32 (5-6), 373-383. PMID:20448331 PMID:PMC4619238 DOI: 10.3233/CLO-2010-0525
10. Duesberg, P. & Rasnick, D. (2000). Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 47 (2), 81-107. PMID:11013390 DOI: 10.1002/1097-0169(200010)47:2<81::AID-CM1>3.0.CO;2-#

Отримано 17.09.17