



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

GENETIKOS MAGISTRO II KURSAS
IVETA AŽELYTĖ

**Seserinių chromatidžių mainų analizė I-o ir II-o tipo diabetu
sergančių pacientų limfocituose**

Magistro darbas

Darbo vadovas:
prof. habil. dr. J. R. Lazutka

Darbas atliktas:
VU GMC
Biomokslų institute

Vilnius, 2020

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS.....	3
ĮVADAS.....	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
1.1 Diabetas ir metabolizmo sutrikimai.....	6
1.1.1 Diabeto tipai ir patogenezė.....	6
1.1.2 Mitybos įtaka, sergant diabetu.....	12
1.1.3 Metabolizmo sutrikimai, sergant diabetu.....	12
1.1.4 Laisvųjų radikalų susidarymas, sergant diabetu.....	14
1.1.5 Oksidacinio streso biologiniai žymenys, sergant diabetu.....	17
1.2 Laisvieji radikalai ir DNR pažeidimai.....	18
1.2.1 Laisvųjų radikalų sukeltos oksidacinės DNR pažeidimai.....	18
1.2.2 Oksidacinių pažeidimų reparacijos keliai.....	19
1.2.3 Oksidacinių pažeidimų sukeltos mutacijos.....	20
1.2.4 4-nitrochinolino 1-oksidas (4NQO) ir jo savybės.....	21
1.3 DNR pažeidimų ir citogenetiniai tyrimai diabetu sergančių pacientų ląstelėse.....	22
1.3.1 DNR pažeidimų tyrimai.....	22
1.3.2 Citogenetiniai tyrimai.....	23
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	26
2.1.1 Tyrimų objektas.....	26
2.1.2 Naudotos medžiagos.....	30
2.1.3 Žmogaus periferinio kraujo limfocitų kultūros auginimas SCM analizei.....	30
2.1.4 Seserinių chromatidžių mainų analizės kriterijai.....	33
2.1.5 Statistinė analizė.....	34
3. TYRIMŲ REZULTATAI.....	36
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	42
IŠVADOS.....	44
SANTRAUKA.....	45
SUMMARY.....	46
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	47

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

BrdU – 5-brom-2-deoksiuridinas.

CA – chromosomų aberacija.

CAT – katalazė

CBMN – (*cytokinesis-block micronucleus assay*) sustabdytos citokinezės MB tyrimas.

DBL – dvibranduolė ląstelė.

DM – dekstrano apvalkalą turinčios magnetinės nanodalelės.

FPG - (angl.) *Fluorescent plus Giemsa*

GLUT-4 – gliukozės transporteris

GLP-1 - į gliukagoną panašus peptidas-1

MB – mikrobranduolys.

PKC β - baltymo kinazės C β izoforma

PKL – periferinio kraujo limfocitai.

ROS- reaktyvios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species*).

SCM – seserinių chromatidžių mainai.

TCF7L2 - Transkripcijos faktorius 7

4NQO - 4-nitrochinolino 1-oksidas

.

ĮVADAS

Cukrinis diabetas yra metabolinė liga, turinti didelę įtaką pasaulio visuomenės sveikatai, ja serga daugiau nei 425 milijonai žmonių visame pasaulyje. Sergančių žmonių skaičius paprastai didėja, daugiausia dėl nutukimo, rizikos veiksnio, glaudžiai susijusio su II tipo cukriniu diabetu, dažniausiai pasitaikančia diabeto forma. Hiperglikemija yra ryškiausias ligos požymis, tai yra padidėjęs gliukozės kiekis kraujyje, palyginti su sveikais individualais. Tai gali būti pagrindinė prasto insulino sekrecijos, jautrumo insulinui taikininiuose audiniuose stoka arba jų abiejų derinys (Taylor, 1999; DeFronzo et al., 2015).

Vienas didžiausių nuogastavimų dėl blogos glikemijos kontrolės pacientams, sergantiems diabetu, yra susijęs su mikro ir makrovaskulinėmis diabeto komplikacijomis. Kadangi pradžioje, sergant II tipo diabetu, specifinių ūminių simptomų nėra, 50% sergančių suaugusiųjų nežino, kad serga būtent šia liga. Lėtinė hiperglikemija sukelia daugybę komplikacijų, tokių kaip retinopatija, neuropatija ir nefropatija. Ilgainiui didelis gliukozės kiekis kraujyje taip pat gali sukelti endotelio disfunkciją, o tai padidina širdies ir kraujagyslių ligų išsivystymo riziką (Lima et al., 2019).

Yra keletas tyrimų, naudojamų DNR pažeidoms tirti. Vienas jų – seserinių chromatidžių mainų (SCM) metodas. Seserinių chromatidžių mainai (SCM), sąlygoja abipusį DNR grandinių pasikeitimą homologiškuose seserinių chromatidžių lokusuose replikacijos procese ir tam tikru dažniu vyksta spontaniškai visose ląstelėse. SCM reiškinys yra plačiai naudojamas kaip patikimas ir jautrus chromosomų (DNR) nestabilumo rodiklis. Yra žinoma, kad SCM padidėja, kai ląstelės yra veikiamos įvairių genotoksinių kancerogenų, ir atrodo, kad tai atspindi DNR pažeidimų atstatymą (Salimi et al., 2016).

4-nitrochinolino 1-oksidas (4NQO) yra stipri kancerogeninė medžiaga kurios kancerogeninį poveikį, manoma, sukelia fermentinis nitro grupės atskilimas. 4NQO gali natūraliai atsirasti aplinkoje, tačiau paprastai gaminamas mokslinių tyrimų tikslais (LaVoie et al., 1983). Žinoma, kad 4NQO imituoja biologinį ultravioletinės šviesos poveikį įvairiems organizmams, indukuoja oksidacines DNR pažeidas, dėl ko ląstelėje įsijungia reparacinės sistemos (Ikenaga et al., 1975).

Šiame darbe tyrėme diabetu sergančių pacientų limfocitų jautrumą 4NQO. Ląstelės buvo veikiamos 0,1 µg/l koncentracijos 4NQO, pamatuotas susidariusių SCM skaičius bei

atlikta statistinė duomenų analizė, sąsajoms tarp 4NQO paveiktų/nepaveiktų ląstelių bei pacientų demografinių bei klinikinių rodiklių apžvelgti.

Darbo tikslas: naudojant seserinių chromatidžių mainų analizės metodą, nustatyti ar tarp tiriamųjų asmenų yra jautrumo 4-nitrochinolino 1-oksido skirtumų.

Darbo uždaviniai:

1. Patikrinti 4-nitrochinolino 1-oksido veikimo efektyvumą.
2. Atsirinkti pacientus tolimesniems tyrimams, kurie yra jautresni pažaidoms.
3. Įvertinti įvairių demografinių ir klinikinių rodiklių poveikį jautrumui 4NQO.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Diabetas ir metabolizmo sutrikimai

1.1.1 Diabeto tipai ir patogenezė

Cukrinis diabetas gali būti klasifikuojamas skirtingai, viena klasifikavimo formų:

1. **I tipo cukrinis diabetas** - vystosi dėl autoimuninės kasos beta ląstelių destruktijos, dažniausiai sukeliančios absoliutų insulino stygių.
2. **II tipo cukrinis diabetas** – vystosi dėl vyraujančio audinių atsparumo insulinui, ilgaiui sąlygojančio insulino trūkumą dėl insulino sekrecijos sutrikimo.
3. **Gestacinis diabetas** - angliavandenių apykaitos sutrikimas, pasireiškiantis padidėjusiu gliukozės kiekiu kraujyje, pirmą kartą diagnozuotas nėštumo metu.
4. **Kiti specifiniai diabeto tipai** – vystosi dėl kitų priežasčių: genetinių beta-ląstelių, insulino veikimo defektų, egzokrininių kasos ligų, kitų endokrinopatijų, vaistų ar cheminių medžiagų toksinio poveikio (PSO, 2016).

I tipo cukrinis diabeto patogenezė. I tipo cukriniam diabetui būdinga lėtinė hiperglikemija (gliukozės koncentracijos padidėjimas kraujyje) ir angliavandenių, riebalų, baltymų apykaitos sutrikimas dėl kasoje gaminamo insulino sekrecijos ar veikimo sutrikimo. I tipo cukrinis diabetas (CD) išsivysto dėl absoliutaus insulino trūkumo. Tai gali būti idiopatinės kilmės (kai nežinoma ligos atsiradimo priežastis) arba dėl autoimuninio proceso sukulto kasos beta ląstelių destruktijos (Asmat et al., 2016).

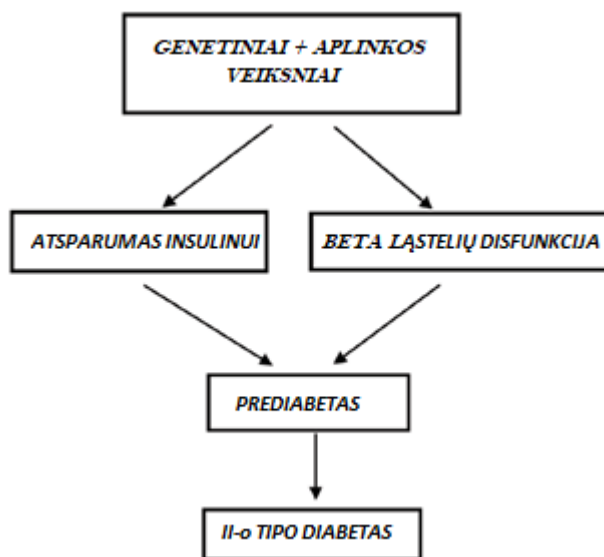
II tipo cukrinis diabeto patogenezė. II tipo cukriniam diabetui būdingas insulino sekrecijos sutrikimas ir/ar sumažėjęs organizmo reagavimas į insuliną (rezistentiškumas insulinui) bei sutrikusi angliavandenių, riebalų, baltymų apykaita. Manoma, genetinis polinkis ir nutukimas kartu sukelia hiperglikemiją ir diabetą (Stumvoll et al., 2005; Taylor, 2013).

II tipo diabetas yra progresuojanti liga, kuri vystosi etapais. Jos eiga prasideda 10–20 metų iki klinikinės ligos pradžios, kaip ikiklinikinis atsparumo insulinui laikotarpis (Ferranini et. al., 2011).

Iš pradžių, išsivysčius hiperinsulinemijai (kenksminga organizmo būklė, kai insulino kiekis kraujyje viršija normaliąją vertę) yra dar įmanoma palaikyti normalų gliukozės kiekį kraujyje. Ši stadija yra susijusi su padidėjusiu laisvųjų riebalų rūgščių kiekiu insulinui atsparumą įgavusiems viršsvorį turinčiais pacientais (Durruty et al., 2019).

Atsparumas insulinui neišvengiamai sukelia insulino sekrecijos padidėjimą, - taip organizmas siekia įveikti tą pasipriešinimą. Jeigu kasos β ląstelės sveikos, padidėja insulino sekrecija ir pradžioje palaikomas normalus ląstelės metabolizmas. Jei β ląstelės yra pažeistos, jos nebegali gaminti tiek insulino. Gliukozės toleravimo sutrikimas ir sutrikusi glikemija nevalgius apibrezia prediabeto stadiją. Šiuo laikotarpiu lėtinė hiperglikemija yra svarbus kasos β ląstelių pažeidimo veiksnys; išlaikant atsparumo insulinui būseną, glikemijos lygis palaipsniui didėja, kol galiausiai nustatomas klinikinis diabetas.

Diabeto patogenezės etapai parodyti 1 pav. Insulino sekrecijos defektai, stebimi diabeto metu, prisideda prie insulino atsparumo. Diabeto vystymosi metu atsparumas insulinui išlieka, o insulino sekrecinis pajėgumas palaipsniui mažėja ir atsiranda insulino hipersekrecija, kurios metu gali būti reikalinga pradėti gydymą insulinu. Hiperglikemija diabete apibūdina ne tik biocheminį ligos pasireiškimą, bet taip pat yra būtinas veiksnys diabetinės būklės palaikymui (Durruty et al., 2019).



1.1 pav. II tipo diabeto patogenezės etapai, pagal Durruty et al., 2019

Genetiniai veiksniai. Yra manoma, kad II tipo cukrinis diabetas turi stiprų paveldimumą. Net 35–50% pacientų turi giminaičių, taip pat sergančių diabetu (Durruty et al., 2019). Framingham palikuonių tyrime (angl. *Framingham Offspring Study*) buvo nustatyta,

kad jei vienas iš tėvų sirgo diabetu, santykinė rizika susirgti vaikams - 3,6; jei abu tėvai sirgo šia liga, rizika padidėja iki 6,0. Šis tyrimas rodo, kad diabetu sergančių tėvų sūnų ir dukterų rizika susirgti yra panaši, nesvarbu, ar liga serga tėvas, ar motina (Meigs et al., 2000). Monozigotinių dvynių atveju diabeto pasireiškimo tikimybė abiejuose vaikuose siekia iki 96%, dizigotinių dvynių atveju <50%.

Visi genai, koduojantys fermentus arba baltymų veiksnius, susijusius su insulino sekrecija ir veikimu, yra galimi šios ligos kandidatai. Yra nustatyta, kad insulino sekrecijos defektui didesnę įtaką turi paveldimumas negu aplinkos veiksniai. Insulino atsparumui pasireikšti įtakos turi tiek genetiniai, tiek aplinkos veiksniai.

1 lentelėje pateikti svarbiausi genai kandidatai, susiję su II tipo diabetu. Visi jie susiję su insulino sekrecijos defektu ir insulino atsparumu. 10% tirtų diabetu sergančių pacientų, šie genai buvo rasti pakitę. Ligai išsivystyti, asmuo turi turėti bent 10 defektų turinčių genų (Durruty et al., 2019).

1.1 lentelė. II tipo diabetą sukeltantys genai kandidatai, pagal Durruty et al., 2019

Atsparumo insulinui genai	
1.	Tiesiogiai susijęs su mažu gliukozės įsisavinimu <ul style="list-style-type: none"> • insulino receptoriaus substrato genas • fosfoinositido 3-kinazės genas
2.	Aiškinantys nutukimo ir II-o tipo diabeto ryšį <ul style="list-style-type: none"> • β-3 adrenerginis receptoriaus genas • naviko nekrozės faktoriaus alfa genas • peroksisomų proliferatorių suaktyvintas receptoriaus genas
3.	Adipocitokinai, susiję su nutukimu <ul style="list-style-type: none"> • leptino genas • rezistino genas • adiponektino genas
4.	Lipidų metabolizmas <ul style="list-style-type: none"> • lipoproteinų lipazės genas • riebalų rūgštis jungiantis baltymų genas
5.	Aiškinantys termogenezės ir nutukimo ryšį <ul style="list-style-type: none"> • atskiriančių baltymų genas
Insulino sekrecijos genai	
	<ul style="list-style-type: none"> • insulino receptoriaus substrato genas • kalpaino-10 genas • K^+ vidinio lygintuvo kanalo genas

Genai, koduojantys skirtingus baltymų komponentus, kurie dalyvauja insulino sintezės ir sekrecijos mechanizme, yra potencialūs kandidatai II tipo diabetui pasireikšti (Buraczynska

et al., 2013; Kimber et al., 2007). Tarp labiausiai tikėtinų išskiriamas *IRS-2* genas, kurio polimorfizmas numato anomalijas tiek insulino sekrecijoje, tiek veikime.

Pastaraisiais metais genetiniu jautrumu II tipo diabetui išsiskyrė dar vienas genas. Tai transkripcijos faktorius (*TCF7L2*), kurio polimorfizmas buvo nustatytas keliose etninėse diabetu sergančių pacientų grupėse. Šis faktorius susijęs su sumažėjusiu į gliukagoną panašaus peptido-1 (GLP-1) atsaku. *GLP-1* ekspresiją enteroendokrininėse ląstelėse reguliuoja *TCF7L2*. Pakitimai gene sukelia β ląstelių proliferaciją ir insulino sekrecijos nepakankamumą. Taigi, *TCF7L2* geno variantai padidina II tipo diabeto riziką.

Galima sakyti, kad II tipo diabetas yra poligeninė liga, turinti daugybę jautrumo genų, kurių kiekvienas turi nedidelį poveikį jo patogenezei, tačiau dėl jų genetinių skirtumų duoda prielaidą atsirasti keliems II tipo diabeto pogrupiams. Genetinis nevienalytiškumas tarp skirtingų asmenų ir etninių grupių lemia įvairius insulino sekrecijos ir veikimo pokyčius (Durruty et al., 2019).

Aplinkos veiksniai. Aplinkos veiksniais yra laikomos visos aplinkybės, palaikančios II tipo diabeto vystymąsi, tokios kaip: nutukimas, amžius, psichologinis stresas, gliukotoksiškumas, oksidacinis stresas, endoplazminio tinklo stresas ir endotelio disfunkcija, mityba.

Nutukimas. Nutukimas yra viena iš pagrindinių priežasčių, galinčių sąlygoti diabetą. Apskaičiuota, kad 80% visų sergančiųjų 2 tipo cukriniu diabetu yra nutukę. Dėl padidėjusio visceralinio (pilvo srities) riebalinio audinio, išaugęs laisvųjų riebalų rūgščių (LRR) kiekis aktyvuoja baltymo kinazės C (*PKCβ*) β izoformą taip slopindamas gliukozės (*GLUT-4*) transporterio persikėlimą į ląstelės membraną ir sumažindamas gliukozės patekimą į audinius. Tai sukelia oksidacinį stresą ir atsparumą insulinui. Riebaliniame audinyje vyksta lėtinis uždegiminis procesas, kurio metu išskiriami priešuždegiminiai citokinai sukelia kasos β - ląstelių disfunkciją, sumažėjusią insulino sekreciją ir hiperglikemiją. Visa tai iššaukia II tipo diabeto atsiradimą (Eckel et al., 2011; Durruty et al., 2019).

Amžius. Gliukozės tolerancija blogėja senstant, kai yra prarandama raumenų masė ir padidėja riebalinis audinys (ypač sėdimo gyvenimo būdo pasekmė) bei padidėja jautrumas insulino atsparumui (Mujica et al., 2014).

Psichologinis stresas. Ūmus psichologinis stresas daugelį metų buvo pripažįstamas kaip veiksnys, skatinantis diabeto atsiradimą. Taip yra todėl, kad simpatinis aktyvinimas mažina kasos β ląstelių funkcionalumą ir sumažina insulino sekreciją. Tuo pačiu metu raumenyse mažėja jautrumas insulinui, gliukozės įsisavinimas ir glikogeno nusėdimas - visa tai padidina glikemiją ir skatina II tipo diabeto vystymąsi (Durruty et al., 2019).

Gliukotoksiškumas. Šiuo metu gliukotoksiškumas yra apibrėžiamas kaip neigiamas lėtinės hiperglikemijos poveikis ląstelių struktūroms ir funkcijoms. Hiperglikemijos metu sumažėjęs insulino iRNR kiekis sukelia hormonų sintezės slopinimą, todėl gliukozė tampa pajėgi sukelti žalą genetinės informacijos lygyje, kuri yra būtina teisingai insulino sintezei užtikrinti (Durruty et al., 2001). Gliukozė, veikdama kaip laisvasis radikalas, taip pat gali sukelti citotoksiškumą β ląstelėms, sukeldama gausią β ląstelių apoptozę (Durruty et al., 2019).

Oksidacinis stresas. ROS, atsirandantys dėl hiperglikemijos ir padidėjusio laisvųjų riebalų rūgščių lygio, vaidina svarbiausią vaidmenį ligos vystymesi bei eigoje. β ląstelėse ROS sukelia insulino sintezės ir sekrecijos sumažėjimą; kadangi β ląstelės turi mažą antioksidacinį pajėgumą, dėl per didelės ROS gamybos susidaro redokso būsenos disbalansas, pusiausvyra pakreipiama link oksidacijos. Periferiniuose audiniuose, kurie yra insulino taikiniai, ROS skatina inaktyvuoti insulino signalo perdavimą (Mancuso et al., 2016; Durruty et al., 2019).

Endoplazminis retikulinis stresas ir endotelio disfunkcija. Endoplazminis retikulumas aktyviai dalyvauja baltymų sintezėje; panaudodamas šaperonus, teisingai sulanksto baltymus. Aktyvinantys signalai, tokie kaip hiperglikemija, padidina insulino sintezės poreikį, sukeldami endoplazminį retikulinį stresą β ląstelėse; tai iššaukia apoptozę, kaip normalų adaptacinį metabolinį atsaką į metabolinį krūvį. II tipo diabeto atveju, endoplazminis retikulinis stresas, kurį sukelia gliukotoksiškumas ir uždegiminiai citokinai, gali sukelti β ląstelių disfunkciją ir mirtį (Ghemrawi et al., 2018).

β ląstelių mitochondrijos dalyvauja insulino sintezėje ir egzocitozėje. Sergant cukriniu diabetu, pasireiškia mitochondrijų disfunkcija: sumažėja mitochondrijų membranos baltymų kiekis, o jų formavimosi metu vyksta transkripcijos pokyčiai. Mitochondrijų disfunkcija, kurią sukelia gliukotoksiškumas, sukelia β ląstelių nepakankamumą, padidėja ROS ir oksidacinis stresas (Durruty et al., 2019).

Mityba. Dietinių riebalų poveikis II tipo diabetui nėra visiškai išaiškintas, tačiau sutariama, kad riebalų kokybė yra svarbesnė už bendrą jų kiekį. Dietiniai riebalai yra energijos šaltinis, veikiantis ląstelių metabolizmą. Mononesočiosios riebalų rūgštys ir transriebiosios rūgštys nėra siejamos su II tipo diabeto išaugimo rizika. Dieta, kurioje yra daug mononesočiųjų riebiųjų rūgščių (alyvuogių aliejaus) ir jūrinės kilmės nesočiųjų riebalų rūgščių, yra susijusi su žema II diabeto tipo rizika (Mirmiran et al., 2018). Didelis fruktozės kiekis maiste skatina peroksizomų proliferatorių suaktyvinto gama receptoriaus (PPAR- γ), atsakingo už insulino atsparumą, lipogenezę ir II tipo diabeto, aktyvaciją. Be to, fruktozės krūvis ir dėl to atsirandantis kepenų stresas sukelia proinflammatorinių citokinų, tokių kaip TNF α , išsiskyrimą, kuris indukuoja insulino atsparumą ir skatina II tipo diabeto vystymąsi (Durruty et al., 2019). Asmenims, kuriems taikoma dieta su dideliu gliutimo kiekiu 20–28 metų laikotarpyje II tipo diabetui būdingi rodikliai buvo stebimi maži (Zong et al., 2018). To priežastis ta, kad asmenys, valgantys maistą, kuriame gausu gliutimo, taip pat gauna padidėjusį grūdų pluošto kiekį. Mechanizmas, per kurį gliutimas mažina II tipo diabeto riziką, nežinomas, tačiau greičiausiai susijęs su palankiais žarnyno mikrobiotos pokyčiais (Durruty et al., 2019).

Insulino sekrecijos trūkumas. II tipo diabetu sergantiems pacientams insulino sekrecijos deficitas yra jo patogenezės pagrindas. Nustatyta, kad sukelti sutrikimai yra kiekybiniai ir kokybiniai ir pacientams būna įvairaus laipsnio. Atsiradus sekrecijos sutrikimui, pasireiškia hiperglikemija. Ligai besivystant metų eigoje, II tipo diabetu sergančių pacientų insulino atsakas į gliukozę blogėja. Tai akcentuoja nuolatinė hiperglikemija (gliukotoksiškumas). Padidėjus glikemijai, susidaro užburtas ratas, nes gliukozė pati savaime sukelia β ląstelių pokyčius, paradoksaliai sulėtindama insulino sekreciją (Stumvoll et al., 2003; Robertson et al., 2003).

Atsparumas insulinui. Insulino atsparumas, apibūdinamas kaip normalaus insulino jautrumo nebuvimas, yra pirmasis nukrypimas, aptinkamas II tipo diabeto vystymosi eigoje, matomas jau ir priešdiabetiniame būsenoje. Insulino atsparumas kartu su insulino sekrecijos defektu vaidina pagrindinį vaidmenį II tipo diabeto vystymesi. Skirtingu intensyvumu priklausomai nuo audinio ir individo, insulino atsparumas skirtingu intensyvumu pasireiškia kepenyse, raumenyse ir riebaliniame audinyje. Hiperglikemija pasireiškia trimis būdais: perteklinė kepenų gliukozės gamyba (gliukoneogenezė), sumažėjęs įsisavinimas periferiniuose audiniuose (raumenyse ir riebaliniame audinyje) ir lipolizės adipocituose

sukeltas padidėjęs laisvųjų riebalų kiekis. Laisvosios riebalų rūgštys konkuruoja su gliukoze kaip energijos šaltinis, padeda padidinti glikemiją ir slopinti gliukozės patekimą per ląstelės membraną (Durruty et al., 2014; 2019).

1.1.2 Mitybos įtaka, sergant diabetu

Diabetas yra visuotinė sveikatos problema. Šiuo metu ši liga buvo gydoma medikamentais, tokiais kaip metforminas, kuriais siekiama sumažinti gliukozės kiekį kraujyje, siekiant užkirsti kelią daugybei ląstelių metabolizmo pokyčių, kuriuos sukelia lėtinė hiperglikemija. Tačiau gydymo sėkmė yra ribota, todėl reikia kitokio pobūdžio intervencijų (daugiausia mitybos ir reguliaraus fizinio aktyvumo), susijusių su paciento gyvenimo būdu. Daugelio pacientų, sergančių II tipo diabetu amžius yra nuo 40 iki 59 metų, o tai yra labai svarbu ligai. Šiuo laikotarpiu, kaip ir vėlesniuose etapuose, progresuojant senėjimo procesui, baltymų homeostazė vis dažniau sutrinka, kartu su sumažėjusiu DNR reparacinės sistemos ir antioksidantų apsaugos efektyvumu, pažaidos ląstelei kaupiasi (Kenyon, 2010; Haigis, 2010; Hipp et al., 2014; Madabhushi et al., 2014).

Daugybė diabetu sergančių pacientų turi atsvorį ar nutukimą. Įrodyta, kad gyvenimo būdo pokyčiai yra būtini kontroliuojant gliukozės kiekį kraujyje. Be to, įrodyta, kad II tipo diabetu sergantiems pacientams, kuriems buvo taikoma 7 dienų intervencija, siekiant užtikrinti tinkamą gliukozės kiekį kraujyje, buvo pastebėtas žymus DNR pažaidų lygio sumažėjimas (Xavier et al., 2014). Taip pat, įrodyta, kad kai kurie mitybos pokyčiai, taip pat kalorijų ar baltymų ribojimas yra labai veiksmingi veiksniai ne tik mažinant gliukozės kiekį kraujyje, bet ir teikiant teigiamą naudą prailginant gyvenimo trukmę, kaip įrodyta. keliuose modeliniuose organizmuose. Be to, tokie pokyčiai sumažina su senėjimu susijusių ligų dažnį (Lima et al., 2019).

1.1.3 Metabolizmo sutrikimai, sergant diabetu

Sergant diabetu, komplikacijų atsiradimo tikimybė yra labai didelė. Komplikacijos gali būti makrovaskulinės (koronarinė širdies liga, periferinių kraujagyslių ligos ir insultas), mikrovaskulinės (neuropatija, retinopatija ir nefropatija) ir mikro-, ir makrovaskulinės (diabetinė pėda). *In vivo* tyrimai patvirtina hiperglikemijos vaidmenį oksidacinio streso metu, kuris sukelia endotelio disfunkciją diabetu sergančių pacientų kraujagyslėse (Ceriello, 2006). Diabetu sergantiems pacientams, kurie kenčia nuo padidėjusio gliukozės ir insulino kiekio bei

dislipidemijos, išsivysto makroangiopatijos, sukeliančios oksidacio streso iššaukiamą aterosklerozę. Diabeto mirštamumas yra labiau susijęs su makrovaskuline degeneracija, palyginti su mikrovaskulinių komplikacijų rizika vyresnio amžiaus pacientuose (Asmat et al., 2016).

Apskritai, cukrinio diabeto komplikacijas galima suskirstyti į dvi grupes:

1. **Metabolinės ūminės komplikacijos:** Tai trumpalaikės ir apima hipoglikemiją, ketoacidozę ir hiperosmolinę neketoninę komą.
2. **Sisteminės vėlyvosios komplikacijos:** tai ilgalaikės lėtinės komplikacijos, apimančios diabetinę nefropatiją, mikroangiopatiją, diabetinę neuro- ir retinopatiją, aterosklerozę ir infekcijas. (Wallace, 2004; Mohan, 2002)

1.2 lentelė. Diabeto komplikacijos, pagal: *Asmat et al., 2016*

Ūminės komplikacijos (metabolinės)	Lėtinės komplikacijos (sisteminės)
Infekcijos	Aklumas, retinopatija
Diabetinė ketoacidozė	Neuropatija
Hiperosmolinė ne ketoninė koma	Aterosklerozė
Polidipsija, poliurija, nuovargis, neryškus matymas	Periferinių kraujagyslių liga
	Infekcija, amputacija
	Uždegiminės galvos smegenų kraujagyslių ligos
Makrovaskulinės komplikacijos	Mikrovaskulinės komplikacijos
Insultas	Retinopatija ir katarakta
širdies ligos ir hipertenzija	inkstų liga
Periferinių kraujagyslių liga	Neuropatija
Pėdų skausmai	Pėdų skausmai

Gliukozės homeostazės pokyčiai yra kritinis metabolinių ligų vystymosi veiksnys. Paprastai, norint palaikyti optimalų gliukozės kiekį kraujyje, kasa išskiria du hormonus. Reaguodamos į aukštą gliukozės kiekį kasos β ląstelės išskiria insuliną, kuris skatina gliukozės pasisavinimą periferiniuose audiniuose, mažina gliukoneogenezę ir mažina glikogeno bei trigliceridų skilimą. Tačiau, kai sumažėja gliukozės kiekis kraujyje, α -ląstelės išskiria gliukagoną, kuris panaikina aukščiau aprašytą procesą.

Apskritai atsparumas insulinui yra viena iš pagrindinių gliukozės homeostazės sutrikimų priežasčių; kai insulino receptoriai nereaguoja į pagaminto insulino kiekį,

organizmui trūksta įsisavinimo ir absorbcijos. Kaip kompensacinis mechanizmas, kasos β ląstelės padidina insulino išsiskyrimą, tačiau jei gliukozės kiekis išlieka didelis dėl insulino nesugebėjimo patenkinti organizmo poreikio, gali išsivystyti diabetas. Atsparumas insulinui pacientams stebimas ir prediabetinėje stadijoje - kai asmenų gliukozės lygis viršija normalią vertę, tačiau net toks didelis, kad būtų diagnozuojama liga. Reikia paminėti, kad šiame etape sveika mityba, fizinis aktyvumas ir svorio kontrolė gali padėti individams atgauti normalų gliukozės kiekį kraujyje (Lima et al., 2019).

Ilgainiui didelis gliukozės kiekis kraujyje gali sukelti daugybę ląstelių ir molekulinų pokyčių organizme, ypač dėl laisvųjų radikalų (ROS) susidarymo (Evans et al., 2002). Gerai žinoma, kad mitochondrijos yra pagrindinis ROS šaltinis; šios labai dinamiški organelės nuolat patiria struktūrinius pokyčius, greitai reaguodamos į fiziologinius aplinkos pokyčius. Ląstelių poveikis hiperglikeminėms sąlygoms yra susijęs su keliais mitochondrijų pakitimais. Yra duomenų, kad mitochondrijų skaičius ir morfologija yra būtini palaikant ląstelių funkciją. Šiame kontekste hiperglikemija yra gliukozės metabolizmo induktorius, kuris gali skatinti kelis konformacinius mitochondrijų pokyčius, elektronų pernešimo grandinės perkrovą, lemiančią ROS perprodukciją, ir mitochondrijų disfunkciją (Yu et al., 2006; Kauffman et al., 2016; Connolly et al., 2017; Shah et al., 2013).

Yra įrodyta, kad prediabetinės stadijos pacientuose yra randama padidėjusi mitochondrijų masė, o tai rodo, kad norint palaikyti homeostazę, pradinis gliukozės kiekio kraujyje padidėjimas gali sukelti adaptacinį atsaką, padidindamas mitochondrijų biogenezę. Šie rezultatai yra siejami su padidėjusia mitofagija, manant, kad prediabetinėje stadijoje, bandant sumažinti mitochondrijų oksidacinį stresą, pažeistos mitochondrijos yra pašalinamos (Asmat et al., 2016).

1.1.4 Laisvųjų radikalų susidarymas, sergant diabetu

Žmogaus kūnas yra nuolat veikiamas įvairių tipų veiksnių, dėl kurių susidaro reaktyviosios deguonies formos, vadinamos laisvaisiais radikalais (ROS / RNS) (Asmat et al., 2016). ROS yra normalūs aerobinio kvėpavimo šalutiniai produktai, susidedantys iš radikalų, tokių kaip vandenilio peroksidas (H_2O_2) ir laisvieji radikalai, kaip hidroksilo radikalas ($OH\bullet$) ir superoksido anionas (O_2^-). Įprastose situacijose antioksidantų fermentai (glutatio peroksidazė, katalazė ir superoksido dismutazė) sugeba pašalinti ROS ir palaikyti organizmo homeostazę. Tačiau hiperglikemijos metu mitochondrijų elektronų pernešimo grandinė tampa

hiperaktyvi, tokiu būdu sukeldama per didelę ROS gamybą, viršijančią antioksidacinės gynybos sistemos pajėgumus. Dėl disbalanso tarp prooksidantų ir antioksidantų gynybos sistemos susidaro būklė, vadinama **oksidaciniu stresu**, kai reaktyviosios molekulės gali pakenkti lipidams, baltymams ir nukleorūgštims, duodant pradžia išsivystyti patologinėms būklėms, tarp kurių yra **diabetas** (Lima et al., 2019).

Normaliems medžiagų apykaitos procesams reikalingas tam tikras kiekis oksidacinio streso / ROS, nes ląstelėse ROS atlieka įvairius reguliacinius procesus (Gomes et al., 2012). ROS gaminami neutrofilų ir makrofagų, oksidacinio sprogo metu (angl. *oxidative burst*), siekiant pašalinti antigenus (Freitas et al., 2010). Jie taip pat stimuliuoja kelių genų signalus, koduojančius transkripcijos veiksmus, diferenciaciją ir vystymąsi, taip pat stimuliuoja ląstelių-ląstelių adheziją, ląstelių signalizaciją (angl. *cell signaling*), dalyvavimą kraujagyslių reguliavime, fibroblastų proliferaciją ir padidėjusią antioksidantų fermentų ekspresiją. Tačiau pernelyg didelė ir (arba) nekontroliuojama ROS gamyba yra žalinga. Dėl oksidacinio streso metaboliniai diabeto sutrikimai sukelia mitochondrijų superoksido perteklių tiek didelių, tiek mažų kraujagyslių endotelio ląstelėse, taip pat miokarde (Tiwari et al., 2013).

Laisvuosius radikalus galima suskirstyti į tris tipus:

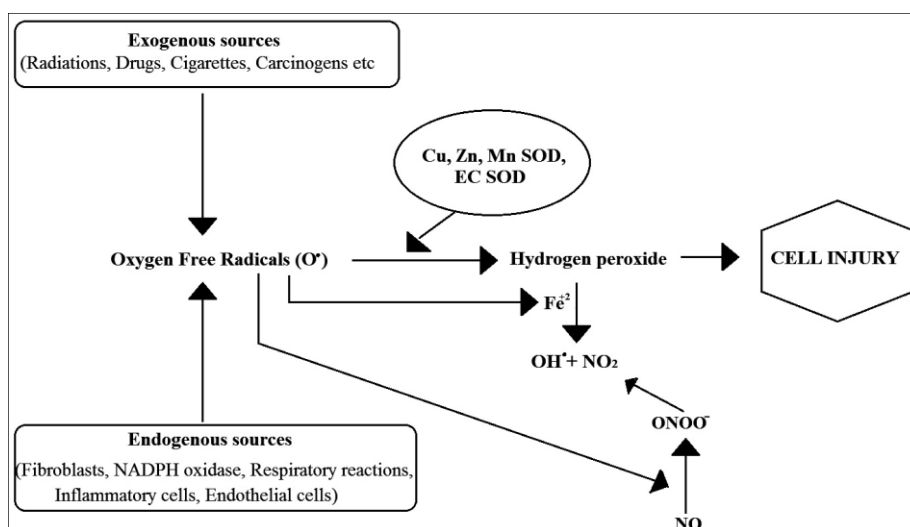
1. Reaktyviosios deguonies formos (**ROS**).
2. Reaktyviosios azoto formos (**RNS**)
3. Reaktyviosios chloro formos (**RCS**)

Laisvieji radikalai yra svarbūs signalinių kelių ląstelės viduje aktyvinimui, tokių kaip Mitogenu aktyvuotos baltymo kinazės (MAPK) ir tarpląsteliniu signalu reguliuojamos kinazės (ERK) kelių, keičiančių genų ekspresiją, taip pat superoksido dismutazės pagalba prisidedančių prie ląstelių žūties (Cho et al., 2003). Pavyzdžiui, neuronų gaminami RNS veikia kaip neurotransmiteriai, o makrofagų gaminami RN - kaip imuniteto tarpininkai. Jie taip pat atsakingi už leukocitų adheziją, trombozę, angiogenezę ir kraujagyslių tonusą. ROS panašiai dalyvauja genų transkripcijoje, signalo perdavime ir kitoje veikloje ląstelės reguliavime (Fang et al., 2002; Asmat et al., 2016).

Tiek **egzogeninės** (suvartotos), tiek **endogeninės** (viduje susintetintos) medžiagos gamina laisvuosius radikalus ląstelėse ir už jos ribų. Jie gali būti gaminami ne enzimatinių organinių junginių reakcijų su deguonimi metu, taip pat tų, kurie prasideda dėl jonizuojančiosios spinduliuotės (Pham-Huy et al., 2008). Šis procesas taip pat gali vykti

mitochondrijose oksidacinio fosforilimo būdu. Įvairūs šaltiniai yra radiacija, ROS, RNS, neutrofilų ir makrofagų gamyba, chemikalai, cigarečių, cigarų rūkymas bei pramoninės nuotekos (Sen et al., 2010). Norint pašalinti žalingą šių laisvųjų radikalų poveikį, organizmas turi skirtingus mechanizmus, gaminančius endogeninius ar egzogeninius antioksidantus, kurie neutralizuoja padidėjusį laisvųjų radikalų kiekį ir išlaiko ląsteles apsaugotas nuo jų toksinio poveikio, sukeltas ligas (Pham-Huy et al., 2008).

Antioksidantai. Deguonis yra labai reaktyvi forma, galinti virsti potencialiai kenksmingų ir žalingų molekulių (laisvųjų radikalų) dalimi. Oksidacinis stresas priverčia sveikas kūno ląsteles prarasti savo funkcijas ir struktūrą. (Percival, 1996) Dėl oksidacijos sukeltos DNR, baltymų ir kitų makromolekulių pažaidos yra susijusios su įvairių ligų, ypač vėžio ir širdies, patogenezė. (Halliwell, 1994) Terminas „antioksidantas“ gali būti suteikiamas visoms medžiagoms, kurių buvimas bent maža koncentracija slopina arba uždelšia substrato oksidaciją. Yra keletas endogeninių ar egzogeninių formų ar molekulių, kurios vaidina svarbų vaidmenį antioksidantų gynyboje ir gali būti laikomos oksidacinio streso biomarkeriais. Antioksidantus galima suskirstyti į grandinę ardančius antioksidantus ir į prevencinius antioksidantus, atsižvelgiant į jų veikimo mechanizmą. Į biologinius antioksidantus įtraukiami, pavyzdžiui, glutationas (oksiduotas / redukuotas), vitaminas C ir E, cistinas ir kt. (Asmat et al., 2016).



1.2 pav. Laisvųjų radikalų sukeltos ląstelių pažaidos, U. Asmat et al., 2016

Manoma, kad oksidacinis stresas svarbus kraujagyslių komplikacijų vystymesi, sergant cukriniu diabetu, ypač II tipo diabetu (Pham-Huy et al., 2008). ROS lygio padidėjimą, sergant diabetu, gali sukelti sumažėjusi destrukcijos arba (ir) padidėjusi katalazės (CAT – fermentinis / ne fermentinis), superoksido dismutazės (SOD) ir glutationo peroksidazės (GSH – Px) antioksidantų gamyba. Dėl šių fermentų lygio pokyčių audiniai tampa jautrūs oksidaciniam stresui, todėl vystosi diabetinės komplikacijos. Remiantis epidemiologiniais tyrimais, be hiperglikemijos, mirštamumas nuo diabeto visų pirma gali būti paaiškintas padidėjusiomis kraujagyslių ligomis (Lipinski et al., 2001).

1.1.5. Oksidacinio streso biologiniai žymenys, sergant diabetu

Daugybė eksperimentų įrodymų parodė ryšį tarp diabeto ir oksidacinio streso, matuojant įvairius biologinius žymenis, kurie apima DNR pažaidų žymenis ir lipidų peroksidacijos produktus. Manoma, kad laisvieji radikalai atlieka svarbų vaidmenį diabetinių komplikacijų vystymesi ir progresijoje, dėl jų gebėjimo pažeisti lipodus, baltymus ir DNR (Ayepola, 2014).

Baltymai. ROS reaguoja su kai kuriomis aminorūgštimis *in vitro*, prisidedant prie modifikuotų, denatūruotų ir neveikiančių baltymų gamybos, kurie gali būti atsakingi už oksidacinį stresą. Diabetinė hiperglikemija dėl laisvųjų radikalų susidarymo sukelia baltymų glikaciją ir oksidacinę degeneraciją. Tokio baltymo glikacijos laipsnis įvertinamas naudojant kai kuriuos biologinius žymenis, tokius kaip glikuotas hemoglobinas (HbA1c) ir fruktozamino koncentracija kraujyje. Antioksidacinių baltymų fermentų funkcijos ir struktūros pokyčius taip pat gali lemti neenzimatinė glikacija, todėl laisvųjų radikalų detoksikacija padidina oksidacinį stresą sergant cukriniu diabetu (Maritim et al., 2003; Asmat et al., 2016).

Lipidai. Cukrinis diabetas sutrikdo kūno lipidų profilį, todėl ląstelės tampa jautresnės lipidų peroksidacijai (Patricia, 2009). Eksperimentiniai tyrimai rodo, kad polinesočiosios riebalų rūgštys ląstelių membranoje dėl daugybinių jungčių yra linkusios pasiduoti laisvųjų radikalų atakoms. Lipidų hiperperoksidai (LHP) per tarpines radikalių reakcijas sukuria tokias riebalų rūgštis, kurios generuoja labai reaktyvius ir toksiškus lipidų radikalus, kurie sudaro naują LHP. Kritinis oksidacinio streso biologinis žymuo yra lipidų peroksidacija, kuri yra labiausiai ištirta su ROS susijusių tyrimų sritis (Asmat et al., 2016).

Vitaminai. Vitaminai yra labai svarbi biologinės sistemos dalis, nes jie vaidina svarbų vaidmenį skirtinguose biocheminiuose procesuose. Tarp tokių vitaminų A, C ir E vitaminai veikia kaip antioksidantai, detoksikuodami laisvuosius radikalus. Bet koks jų lygio pokytis yra reikšmingas oksidacinio streso biologinis žymuo. Šie vitaminai taip pat skatina toksiškumą, tam tikromis sąlygomis gamindami prooksidantus. Yra įrodyta, kad vitamino E kiekis organizme priklauso nuo diabeto. Taip pat yra prieštaringų pranešimų, kurie rodo žalingą vitamino E poveikį diabeto sukeltiems kraujagyslių pokyčiams (Maritim et al., 2003; Asmat et al., 2016).

Glutacionas. Diabetas skatina fermentų glutationo peroksidazės ir glutationo reduktazės aktyvumo pokyčius. Šie fermentai randami ląstelėje, kuri metabolizuoja peroksidą į vandenį ir paverčia glutationo disulfidą atgal į glutationą. Bet koks jų lygio pokytis sukelia oksidacinį stresą ir tokiu būdu sužaloja ląsteles (Maritim et al., 2003; Asmat et al., 2016).

Katalazė - reguliuoja vandenilio peroksido metabolizmą, dėl kurio pertekliaus gali būti padaryta didelė žala lipidams, RNR ir DNR. CAT kataliziškai paverčia peroksidą į vandenį ir deguonį ir tokiu būdu jį neutralizuoja. Kai yra katalazės trūkumas, kasos β ląstelės, turinčios daug mitochondrijų, patiria oksidacinį stresą, sukurdamos perteklinį ROS, sukeltantį b-ląstelių disfunkciją ir galiausiai cukrinį diabetą (Asmat et al., 2016).

Superoksido dismutazė - suteikia pirmąją apsaugą nuo ląstelių pažeidimų, susijusių su ROS, katalizuodama superoksido, pirminio ROS deguonies apykaitoje, dalį į molekulinį deguonį ir peroksidą. Galima sakyti, kad superoksidai yra išskaidomi į kitus junginius, kurie yra mažiau toksiški (Tiwari et al., 2013).

1.2 Laisvieji radikalai ir DNR pažeidimai

1.2.1 Laisvųjų radikalų sukeltos oksidacinės DNR pažeidimai

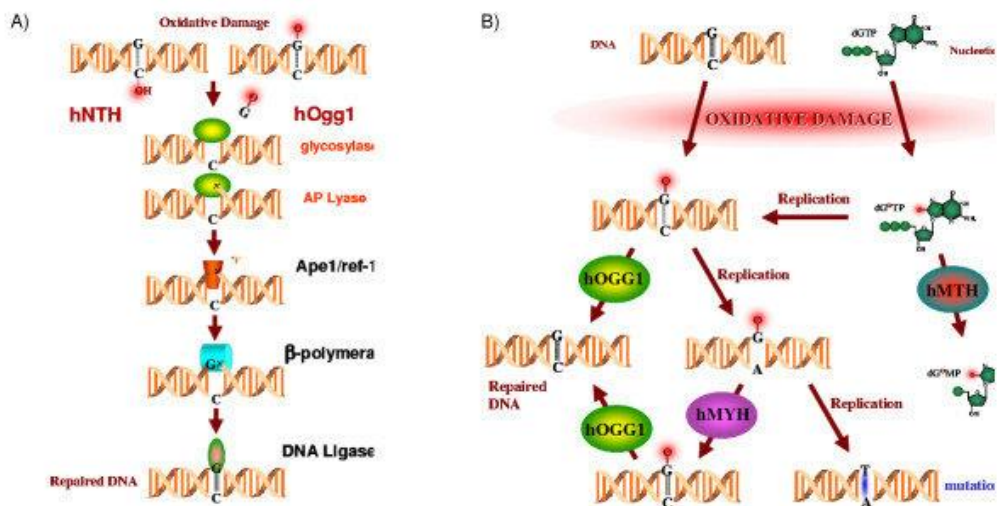
Dažniausiai diabete sutinkamos ROS sukeltos DNR pažeidimai, yra 8-oksoguaninas (8-oksoG) ir 8-oksodezoksiguanozinas (8-oksoDG), kuriuose gali atsirasti tiek DNR, tiek nukleotidų telkinyje. Pastarieji gali būti įtraukti į DNR replikacijos ar reparacijos metu. Jie gali generuoti kelias skirtingas ROS, įskaitant hidroksilo radikalus, pavienius deguonies,

peroksilo radikalus ir peroksinitritą, ONOO⁻, galinčius sukelti kitas DNR bazių modifikacijas, taip pat grandinių pertraukas ir įvairius kitus DNR pažeidimus. Kai kurie diabeto DNR pažeidimai gali būti koreliuojami su klinikiniais žymenimis (Blasiak et al., 2004; Lima et al., 2019).

1.2.2 Oksidacinių pažeidimų reparacijos keliai

Ląstelėse yra keletas skirtingų DNR reparacijos sistemų, ištaisančių skirtingų tipų DNR pažeidas. Yra trys pagrindiniai reparacijų tipai: tiesioginė reparacija, ekscizinė reparacija ir rekombinacinė reparacija. Ekscizinės reparacijos atveju išpjaunamos pažeistos purino arba pirimidino bazės (vadinamoji **BER** reparacija), arba pažeisti nukleotidai (vadinamoji **NER** reparacija). Abi šios sistemos yra aktyvios nepriklausomai nuo ląstelės ciklo fazės ir yra gyvybiškai svarbios organizmo išgyvenimui (Slyskova et al., 2014).

Tiek 8-OHdG, tiek 8-okso-dG yra didelę žalą sukeliančios pažeidos, todėl yra svarbu jas kuo greičiau pašalinti. BER reparacijos sistema, kurią atrado Tomas Lindahl (1974), ir du fermentai: hOGG1 (Ba et al., 2018) ir hMTH1 (žmogaus MutT homologas), yra atsakingi už tokių DNR struktūros anomalijų pašalinimą (Akiyama et al., 1989). hMTH1 perneša 8-okso-dGTP molekulę į citozolį 8-okso-dG, ją hidrolizavus, taip užkirsdamas kelią modifikuotai bazei įsijungti į DNR grandinę (Urbaniak et al., 2020). Tada 8-okso-DNR glikozilazė (hOGG1), atpažinusi DNR pažeidimą (8-okso-dG) pašalina ją iš DNR struktūros (Ba et al., 2018). Pašalinus bazę lieka atvira vieta be bazės, vadinamasis AP-saitas. APE1 endonukleazė skelkia fosfodiesterinį ryšį, taip sukurdama plyšį DNR grandinėje, prie kurio gali prieiti β polimerazė ir susintetinti komplementarų nukleotidą. Plyšys galutinai užpildomas DNR ligazės (Kremer et al., 2004).



1.3 pav. Oksidacinių DNR pažeidimų taisymas, BER mechanizmo schema, *Kremer et al., 2004*

1.2.3 Oksidacinių pažeidimų sukeltos mutacijos

Devintojo dešimtmečio pradžioje buvo eksperimentiškai įrodyta, kad didelė gliukozės koncentracija (30 mmol/L) gali sukelti DNR grandinės nutrūkimą išaugintose žmogaus endotelio ląstelėse. Šis pastebėjimas buvo patvirtintas vėlesniame tyrime, kuriame kaip eksperimentiniai modeliai buvo panaudotos pelės ir žmogaus inkstų ląstelės. Be DNR grandinės nutrūkimo, didelė gliukozės koncentracija gali padidinti 8-oksodG lygį endotelio ir inkstų kanalėlių ląstelėse. Kadangi žinoma, kad DNR pažeidos sukelia įvairias mutacijas, ir kad didelis gliukozės kiekis gali skatinti DNR pažeidimų susidarymą, iškyla klausimas – „Ar didelis gliukozės kiekis gali sukelti ar skatinti mutagenę?“ (Sanket Joshi et al. 2015).

Atsižvelgiant į pagrindinį glikolizės vaidmenį naviko vystymesi, galime teigti, kad padidėjęs gliukozės kiekis kraujyje užtikrina gausų gliukozės išteklių kiekį ir koncentracijos gradientą, kurį patogiu naudoti vėžio ląstelėms. Be tiesioginio metabolinio vaidmens, hiperglikemija per mitochondrijų kvėpavimą gali sukelti padidėjusį ROS susidarymą navikinių ląstelių pogrupyje, kuris iki tam tikro lygio gali sukelti DNR pažeidimų susidarymą, ne tiek aukštą, kad sukeltų apoptozę, tačiau pakankamą sukelti mutacijas protoonkogenuose, naviko slopinimo genuose ar sukelti kitus pokyčius, naudingus navikui. Iš tiesų, Zhang et al. (2007) ištyrė padidinto gliukozės kiekio įtaką fosforibosiltransferazės ir timidinkinazės lokusų stabilumui žmogaus limfoblastoidų ląstelių linijose ir pranešė apie reikšmingą mutacijų

padidėjimą abiejuose lokusuose esant padidintam gliukozės kiekiui. Naudojant pelės embrioną kaip eksperimentinį modelį, Lee et al. (1999) nustatė, kad didelis gliukozės kiekis padidino Lac I mutaciją *in vitro* ir *in vivo*. Be to, kadangi didelis gliukozės kiekis gali sukelti mutacijas, o manoma, kad DNR mutacija vaidina svarbų vaidmenį kancerogenezeje, logiška spėlioti, kad didelė gliukozės koncentracija gali skatinti vėžio vystymąsi.

8-oksoG, oksidacinio streso metu modifikuota DNR molekulė, gali sudaryti porą tiek su adeninu, tiek su citozinu, taip sukeldama G:C → T:A transversiją DNR replikacijos metu. Tokio tipo mutacijos atsiranda būtent oksidacinio streso metu. Tai patvirtino Koch et al. (1994) paveikdamas *Salmonella tryphimurium* 4NQO, taip pat Ide et al. (2001) tą patį atlikęs su vėžinėmis ląstelėmis. Šie tyrimai parodė, kad ląstelių veikimas 4NQO skatina 8-oksoG gamybą, taip sukeldamas mutacijas, kurios ilgaainiui duoda pradžią kancerogenezei (Arima et al., 2006).

Oksidacinės DNR pažaidos geriausiai apibūdinamos kaip silpnai mutageniškos; pavyzdžiui, 8-OH-dG mutacijų dažnis žinduolių ląstelėse yra 2,5–4,8%, nors pažaidų formavimasis, patvarumas ir kaupimasis *in vivo* galėtų šią reikšmę pakelti. Sakoma, kad oksidaciniai reiškiniai daugiausia lemia spontanišką mutagenezę (Marcus S. Cooke, 2003).

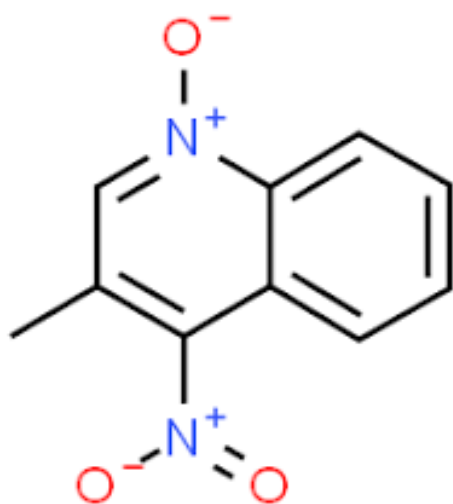
1.2.4. 4-nitrochinolino 1-oksidas (4NQO) ir jo savybės

4-nitrochinolino 1-oksidas (4NQO) yra stipri kancerogeninė medžiaga kurios kancerogeninį poveikį, sukelia fermentinins nitro grupės atskilimas. Keturių elektronų redukcijos produktas 4-hidroksiaminochinolino 1-oksidas (4HAQO) yra artimiausias kancerogeninis 4NQO metabolitas. Metabolizuojamas į elektrofilinį reagentą selyl-4HAQO, jis reaguoja su DNR, sudarydamas stabilius chinolino monoadduktus, kurie yra atsakingi už jo mutageniškumą ir genotoksiškumą.

8-oksoguaninas (8-oksoG) yra tam tikra oksidacinės DNR pažaidos forma, kuri gali atsirasti spontaniškai arba yra sukeliama įvairių veiksnių, tokių kaip tam tikros cheminės medžiagos (Matsui et al., 1999), rentgeno spinduliuotė (Kasai et al., 1991), UV švitinimas (Nishigori et al., 2003), taip pat biologiniai šaltiniai, pvz.: aktyvuoti polimorfonukleariniai leukocitai (Dizdaroglu et al., 1993).

Arima et al. (2006) nustatė, kad 8-oksoG susidarymas yra priklausomas nuo mutageno dozės. Užtenka mažesnės negu 1,0 μM 4NQO koncentracijos sukelti pastebimą

žalą ląstelių replikacijos proceso metu. Ši koncentracija yra pakankama ir todėl reikšminga genotoksiškumui, kai ląstelių replikacija nėra visiškai sutrikusi, tačiau pasiduodanti mutacijų atsiradimui. 8-oksoG lygis prie 0,1 μM 500 μM H₂O₂ koncentracijos stebimas toks pat. Tai rodo, kad 4NQO šiuo atžvilgiu yra daug stipresnis mutagenas nei H₂O₂.



1.4 pav. 4-nitrochinolino 1-oksido (4NQO) cheminė struktūra.

1.3 DNR pažeidimų ir citogenetiniai tyrimai diabetu sergančių pacientų ląstelėse

1.3.1 DNR pažeidimų tyrimai kometų metodu

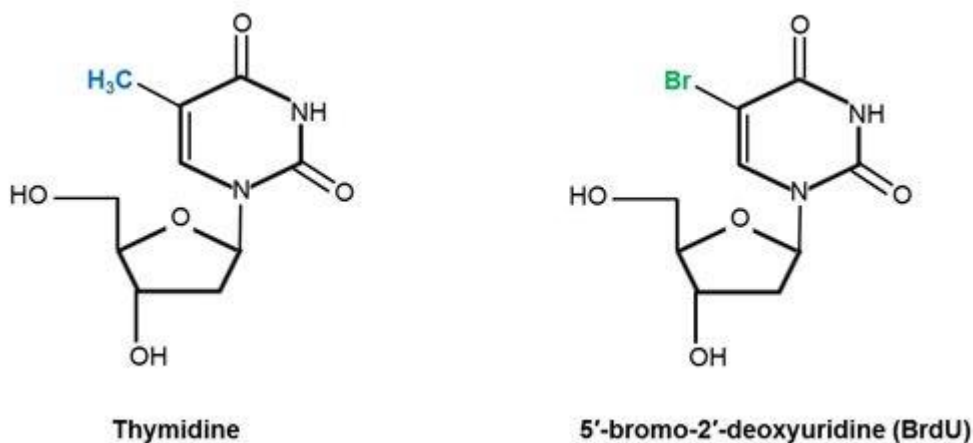
Kometų metodas (comet assay) leidžia įvertinti DNR grandinės trūkius eukariotinėse ląstelėse. Kometos tyrimu aptinkamos DNR pažeidimos gali turėti sąsajų su kancerogeneze.

J. Blasiak et al. (2004) savo tyrime nustatė DNR pažeidimų mastą, DNR atstatymo efektyvumą ir jautrumą egzogeniniams mutagenams II tipo diabeto sergančių asmenų ląstelėse. DNR pažeidimos ir jų reparacija buvo įvertinti kometų metodu, naudojant vandenilio peroksidą ir doksorubiciną. Norėdami įvertinti oksidacinių DNR pažeidimų vaidmenį diabete, autoriai panaudojo tris fermentus: endonukleazę III (Endo III), formamidopirimidino-DNR glikozilazę (Fpg) ir 3-metiladenino-DNR glikozilazę II (AlkA). Pagrindinis endogeninių DNR pažeidimų

lygis buvo reikšmingai didesnis ($P < 0,05$) nei sveikų kontrolinių grupių pacientams. Cukriniu diabetu sergančių pacientų endo II ir Fpg atpažįstamas oksidacinių DNR pažeidimų lygis buvo reikšmingai didesnis (atitinkamai $<< 0,05$ ir $0,01$) nei kontrolinių asmenų. Tarp AlkA nustatytų alkilatinių DNR pažeidimų pacientuose ir kontrolinėse grupėse ($P > 0,05$) skirtumų nebuvo matyti. Todėl šio tyrimo autoriai teigia, kad II tipo diabetas gali būti susijęs ne tik su padidėjusiu oksidacinių DNR pažeidimų lygiu, bet ir su padidėjusiu jautrumu mutagenams bei sumažėjusiu DNR atstatymo efektyvumu.

1.3.2 Citogenetiniai tyrimai

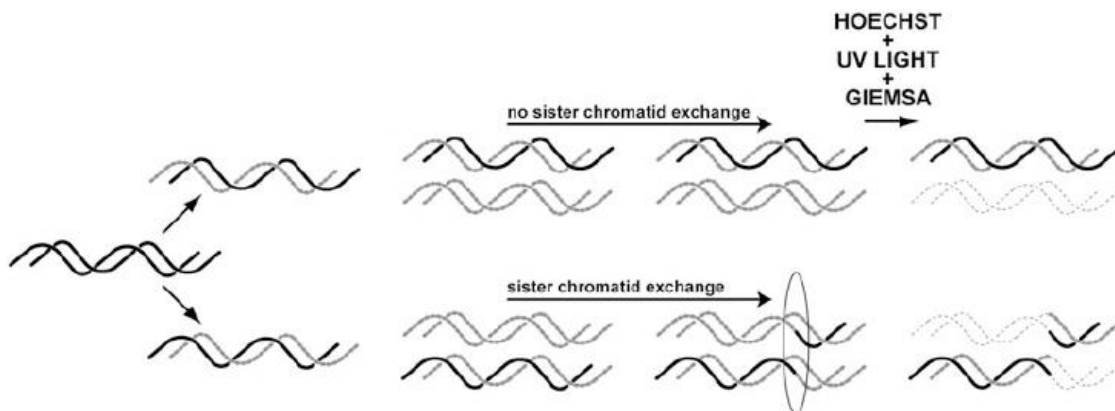
Seserinių chromatidžių mainų (SCM) egzistavimą pastebėjo ir 1938 m. pirmą kartą aprašė B. McClintock, o tik 1957 m. J. H. Taylor citologiškai įrodė jų egzistavimą augalų ląstelėse naudojant tričiu žymėtą timidiną - H^3 . Dabar, norint išvengti radioizotopų, vietoj radioaktyviojo timidino yra naudojamas jo analogas - 5-bromo-2'-deoksiuridinas (BrdU). Tokius metodo pakitimus atliko P. Perry ir S. Wolff (1974), pasiūlydamas (angl.) *fluorescence plus Giemsa* metodą (McClintock et al., 1938; Taylor et al., 1957).



1.5 pav. Cheminė timidino (kairėje) ir 5-bromo-2'-deoksiuridino (dešinėje) struktūra.

BrdU, savo struktūra, yra labai artimas timidinui (1.5 pav.), todėl gali sėkmingai įsijungti į besireplikuojančią DNR. Po dviejų replikacijos ciklų, suporuotos metafazinės seserinės chromatidės skiriasi viena nuo kitos BrdU kiekiu. Pirmoje seserinėje chromatidėje vienas timidinas, esantis DNR grandinėje, yra pakeistas BrdU, kitoje ne, antroje seserinėje chromatidėje abiejuose DNR grandinėse esantis timidinas pakeistas BrdU (1.6 pav.). Toliau

DNR paveikus ultravioletinę (UV) šviesą sugeriančiu interkaliuojančiu „Hoechst 33258“ dažų ir paveikus UV šviesa, DNR yra „išbalinama“, jo intensyvumas priklausomas nuo BrdU kiekio DNR. Pašvitintas chromosomas nudažius „Giemsa“ dažais, mikroskopu galima stebėti spalvinį kontrastą tarp seserinių chromatidžių (vizualiai matoma šviesioji ir tamsioji chromatidės), kur dvigubai BrdU pakeista DNR grandinė nusidažo žymiai blyškiau negu pusiau pakeista (Stults et al., 2020).



1.6 pav. BrdU interkaliavimo į DNR schema seserinėse chromatidėse, veikiant FPG dažymo metodu, *Stults et al., 2020*

Ląstelės, paveiktos BrdU, yra ypač jautrios šviesai; todėl tokios ląstelių kultūros turėtų būti saugomos nuo šviesos ir būti inkubacijos laikotarpiu laikomos tamsoje. Be to, labai svarbu neleisti tikrinant ląstelių kultūras, paveiktas BrdU, šviesiniu mikroskopu būti apšviestoms ilgesniu laikotarpiu negu būti preparato kokybės įvertinimui. DNR grandinė su įsitvirtinusi BrdU po dažymo Hoechst 33258 dažų ir UV apšvitos tampa labai jautri. (angl.) *Fluorescent plus Giemsa*“ (FPG) metodas pagrįstas teorija, kad fluorescenciniai dažai gali skatinti selektyvią BrdU pakeistos DNR grandinės degradaciją. Paprastai SCM tiriami siekiant nustatyti DNR pažeidimus ir genotoksinį poveikį. Žinoma, kad ląstelių veikimas kancerogeninėmis ar mutageninėmis cheminėmis medžiagomis, ultravioletine šviesa ar jonizuojančia spinduliuote sukelia SCM (Sunada et al., 2019).

Sveiko žmogaus periferinio kraujo limfocituose yra aptinkama maždaug 6–8 SCM vienoje ląstelėje. Tyrimų duomenimis, pacientams, sergantiems krūties, prostatos, skrandžio, kiaušidžių ar gimdos kaklelio vėžiu, SCM kiekis gali išaugti net tris kartus normos (Salawu et al., 2018).

Nors patys SCM neturi žinomo kenksmingo medicininio poveikis, didesnis mainų dažnis susijęs su tam tikromis patologinėmis ligomis. Kadangi pacientams, sergantiems cukriniu diabetu padidėja įvairių kraujagyslių ir kitų komplikacijų rizika, yra tikėtina, kad

DNR pažaidų laipsnis yra daug didesnis diabetu sergančiuose pacientuose, palyginti su sveikomis kontrolėmis (Sheth et al., 2006). Pavyzdžiui, Binici et al. (2013) tyrė SCM ir MN dažnį II tipo diabetu sergančiuose pacientuose ir rezultatus palygino su sveikomis kontrolinėmis grupėmis. SCM ir MN analizė parodė, kad kontrolinėje grupėje normalus dažnis ($4,96 \pm 0,92$ SCM ir $1,79 \pm 0,67$ MN; $P < 0,001$). Priešingai, diabetu sergančių pacientų ląstelės pasižymėjo aukštesniu SCM ($7,11 \pm 1,14$; $P < 0,001$) ir MN ($3,45 \pm 1,01$; $P < 0,001$) dažniu, tai rodo didelį DNR pažaidų kiekį, kurį galėjo sukelti oksidacinis stresas. Šie rezultatai rodo, kad diabetas yra būklė, turinti genominį nestabilumą, kuriai būdingas padidėjęs SCM ir MN lygis, ir kad hiperglikemijos sukeltas oksidacinis stresas gali būti padidėjusio SCM ir MN dažnio pagrindinis veiksnys.

Mikrobranduolių dvibranduoliuose limfocituose metodas (CBMN) yra dažnai naudojamas *in vitro* ir *in vivo* genotoksiškumo tyrimams, yra jautrus genomo pažaidų žymuo. Mikrobranduoliai (MN) yra centriniai chromosomų fragmentai arba išsistos chromosomos, kurios paliekamos mitozinio ląstelių dalijimosi metu ir atsiranda interfazinių ląstelių citoplazmoje kaip maži papildomi branduoliai (Salimi et al., 2016).

M. Salimi et al. (2016) tyrė MN dažnį II tipo diabetu, diabetine nefropatija (DN) ir nefropatija, sergančius pacientus ir palygino su kontroliniais mėginiais. Duomenys parodė, kad DNR pažaidų dažnis, buvo žymiai didesnis pacientų grupėse, palyginti su įprastomis kontrolinėmis grupėmis. Taip pat, buvo pastebimas žymiai padidėjęs MN dažnis priklausomai nuo diabetinės būklės trukmės. Duomenys taip pat parodė didesnę MN dažnį pacientams, sergantiems nefropatija ir sergantiems cukriniu diabetu, ir nesergantiems cukriniu diabetu, neturintiems nefropatijos komplikacijų požymių.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Tyrimų objektas

Šiame darbe buvo tirtas 4-nitrochinolino 1-oksido genotoksiškumas diabetu sergančiuose pacientuose, periferinio kraujo limfocitų kultūroje, SCM metodu. Diabetu sergančių asmenų kraujo mėginiai buvo surinkti VU Santaros klinikų Endokrinologijos skyriuje. Tyrimams atlikti buvo gautas biomedicininio tyrimo leidimas Nr. 2019/6-1146-635, tiriamieji pasirašydavo informuoto sutikimo formą. Pacientų demografiniai ir klinikiniai rodikliai pateikti 2.1 ir 2.2 lentelėse.

2.1 lentelė. Tirtų asmenų demografiniai rodikliai

	Pacientas	Amžius, m.	Lytis (V/M)	KMI	Rūkymas		
					Niekada	Anksčiau	Dabar
1.	19BMT33 - 2	52	M	25,15	+		
2.	19BMT33 - 5	49	V	28,70	+		
3.	19BMT33 - 24	56	V	28,00		+	
4.	19BMT33 - 26	75	V	38,30	+		
5.	19BMT33 - 27	59	M	22,23	+		
6.	19BMT33 - 28	55	M	29,40		+	
7.	19BMT33 - 29	74	M	30,80	+		
8.	19BMT33 - 36	21	V	23,09	n/d	n/d	n/d
9.	19BMT33 - 38	61	M	35,56	+		
10.	19BMT33 - 39	54	M	27,80	+		
11.	19BMT33 - 40	78	M	35,43	+		
12.	19BMT33 - 41	67	M	32,00	+		
13.	19BMT33 - 42	66	M	31,50	+		
14.	19BMT33 - 45	74	M	45,30	+		
15.	19BMT33 - 46	70	V	37,56	+		
16.	19BMT33 - 48	64	M	24,60	+		
17.	19BMT33 - 49	56	V	24,50			+
18.	19BMT33 - 51	35	V	27,50	n/d	n/d	n/d
19.	19BMT33 - 52	29	M	38,16	+		

	Pacientas	Amžius, m.	Lytis	KMI	Rūkymas		
					Niekada	Anksčiau	Dabar
20.	19BMT33 - 53	63	V	29,07		+	
21.	19BMT33 - 54	69	V	22,07		+	
22.	19BMT33 - 55	43	V	38,16		+	
23.	19BMT33 - 62	25	V	29,07			+
24.	19BMT33 - 63	45	V	22,70			+
25.	19BMT33 - 67	48	V	26,32			+
26.	19BMT33 - 68	44	V	24,69			+
27.	19BMT33 - 69	69	V	24,00		+	
28.	19BMT33 - 70	60	V	31,46			+
29.	19BMT33 - 72	75	M	21,08	+		
30.	19BMT33 - 73	57	M	28,50	+		
31.	19BMT33 - 74	71	M	22,40	+		
32.	19BMT33 - 76	71	V	28,50	+		
33.	19BMT33 - 77	81	M	22,40	+		
34.	19BMT33 - 94	30	M	30,72	+		
35.	19BMT33 - 96	40	V	40,49		+	
36.	19BMT33 - 97	42	M	32,02	+		

Lentelėje: KMI – kūno masės indeksas, n/d/ - nėra duomenų.

Iš viso buvo tirta – 36 (I-o ir II-o tipo) diabetu sergantys pacientai. Pagal tirtų asmenų demografinių rodiklių duomenis (žr. 3 lentelę):

17 – moterys ir 19 – vyrai;

Amžiaus vidurkis - $56 \pm 15,72$ m.;

KMI - $29,49 \pm 5,95$, kai viršsvoris yra skaičiuojamas nuo $>24,9$;

21 nerūkantys, 7 – rūkė anksčiau, ir 6 – yra dabar rūkantys, 2 – duomenų nėra gauta.

Visi tirti asmenys naudojo įvairias leidžiamo insulino formas.

2.2 lentelė. Tirtų asmenų klinikiniai rodikliai ir dažniausiai naudojami vaistai

	CD tipas	DKA	DR	LIL	DN	PDN	PAH	DS	ŠP	Medikamentai	
										Statinai	Nebivololis
1.	2					+					
2.	2						+	+	+	+	+
3.	1	+	+			+	+				+
4.	2			+	+	+	+				+
5.	1							+		+	
6.	2		+			+	+	+	+		
7.	2					+	+	+	+	+	+
8.	1	+							+		
9.	2						+	+	+	+	
10.	1		+		+	+	+	+	+	+	+
11.	2			+		+	+	+	+	+	
12.	2					+	+	+	+	+	
13.	2					+	+	+	+	+	
14.	2		+			+	+	+			+
15.	2		+		+	+	+	+	+	+	
16.	2		+			+	+		+		
17.	2			+	+	+	+	+	+	+	
18.	1		+		n/d	n/d	n/d	n/d	n/d		
19.	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
20.	1		+			+	+	+			
21.	2					+	+		+		

	CD tipas	DKA	DR	LIL	DN	PDN	PAH	DS	ŠP	Medikamentai	
										Statinai	Nebivololis
22.	1		+	+	+	+	+		+		
23.	1										
24.	1					+	+	+	+		
25.	1		+	+	+	+	+	+	+	+	
26.	1					+	+	+			
27.	2		+			+	+	+	+	+	+
28.	1		+		+	+		+			
29.	1		+			+	+	+	+	+	
30.	1		+			+	+	+		+	
31.	2		+			+	+	+	+		
32.	2		+	+	+	+	+	+			
33.	2		+	+		+	+	+	+	+	
34.	1							+			
35.	1	+							+		
36.	2								+		+
Viso:		4	18	8	9	27	27	26	23	16	8

Lentelėje: CD tipas – cukrinio diabeto tipas (I/II), DKA – diabetinė ketoacidozė, LIL – lėtinės inkstų ligos, DN – diabetinė nefropatija, PDN – poli-neuropatija, PAH – pirminė arterinė hipertenzija, DS – dislipidemija, ŠP – šeiminis paveldėjimas, n/d – nėra duomenų.

Pagal tirtų asmenų klinikiniai rodiklių lentelę (žr. 4 lentelę) I-o tipo diabetu sergantys pacientai – 17, II-o tipo diabetu sergantys – 19.

2.2. Naudotos medžiagos

Mitybinė terpė RPMI 1640 – Sigma Chemical Co., USA;
Veršiuko serumas – Sigma Chemical Co., USA;
Fitohemagliutininas (FHA) – Sigma Chemical Co., USA;
Gentamicinas K – Sigma Chemical Co., USA;
Kolchicinas – Aldrich Chemical Co., USA;
5-bromo-2'-deoksiuridinas (BrdU) – Sigma Chemical Co., USA;
Metanolis – Merck KgaA, Germany;
Ledinė acto rūgštis – Merck KgaA, Germany;
Natrio chloridas – Merck KgaA, Germany;
Kalio chloridas – Merck KgaA, Germany;
Giemsas dažai – Merck KgaA, Germany;
bisBenzimidinas (Hoechst 33258) – Sigma Chemical Co, USA;
Serenseno buferis, pH 6,8 – Riedelde Haen, Germany;
Kalio chloridas – Merck KgaA, Germany.

2.3 Žmogaus periferinio kraujo limfocitų kultūros auginimas SCM analizei

Žmogaus periferinio kraujo limfocitai yra svarbus ląstelių šaltinis tiriant žmogaus chromosomas. Iš periferinio kraujo limfocitų gaunamos chromosomos yra pranašios kitų ląstelių kultūrų atžvilgiu tuo, kad jas galima analizuoti praėjus vos trimis dienoms po kultivavimo. Dauguma periferinio kraujo limfocitų yra interfazės stadijoje ir sudaro sinchronizuotą populiaciją. Tam, kad ląstelės pereitų į mitozę, *in vitro* sąlygomis limfocitai gali būti stimuliuojami mitogenais. Ši sistema gali būti veiksmingai naudojama įvairių cheminių ir fizikinių veiksnių chromosomų pokyčiams įvertinti, taigi naudojama mutageniškumo tyrimams.

Indų paruošimas. Ląstelių kultūros auginimui turi būti naudojami sterilūs indai. Stikliniai indai (menzūros, flakonai kultūros auginimui ir mitybinio mišinio paruošimui, pipetės) turi būti 30 minučių virinti distiliuotame vandenyje su detergentu. Indai plaunami

šepetėliu, juos gerai išskalavus tekančiu vandeniu, pakartotinai (8–10 kartų). Tada indai 30 min. virinami distiliuotame vandenyje. Po to indai džiovinami kaitinimo krosnyje; suvyniojus į popierių, kaitinami 160°C temperatūroje 2–3 valandas. Guminiai kamštukai virinami 30 min. distiliuotame vandenyje prieš pat naudojimą.

Reagentų paruošimas

- 1. Mitybinė terpė.** Kraujo kultūros auginimui yra naudojama RPMI 1640 mitybinė terpė. Ji gali būti paruošta naudojimui (skysta, sterili), arba miltukų pavidalo, kurią reikėtų paruošti pagal gamintojo rekomendacijas ir tada sterilizuoti.
- 2. Serumas.** Embrioninis veršiukų serumas laikomas užšaldytas mažais kiekiais (50-100 ml). Prieš kraujo kultūros auginimą, serumas atitirpdomas iki kambario temperatūros.
- 3. Fitohemagliutininas (FHA).** Darbinis FHA tirpalas ruošiamas iš liofilizuoto preparato. FHA – P Lectin (5 mg, Sigma Chemical Co, USA) praskiedžiamas 2ml mitybinės RPMI 1640 terpės. Nepanaudotas tirpalo likutis užšaldomas. Imama 0,32 ml FHA/100 ml kraujo (galutinė FHA koncentracija kultūroje – 7,8 µg/ml).
- 4. Antibiotikai.** Gentamicino tirpalas (10 mg/ml) dedamas į šviežiai paruoštą mitybinę terpę RPMI 1640 (galutinė gentamicino koncentracija terpėje – 40-50 µg/ml).
- 5. Kolchicinas.** Darbinis kolchicino tirpalas (100 µg/ml). Jis ruošiamas ištirpinus 1 mg kolchicino 10 ml distiliuoto vandens. Tirpalas gali būti laikomas 4°C temperatūroje (šaldytuve) iki 3 mėnesių.
- 6. Hipototinis tirpalas.** 2,75 g KCl (koncentracija - 0,075 M KCl) ištirpinama 500 ml distiliuoto vandens.

Kraujo mėginių surinkimas. Kraujo mėginiai paimami iš alkūninės venos į vakuteinerius – tai vakuuminiai mėgintuvėliai kraujo mėginių surinkimui su heparinu (Vacutainer®). Heparinizuotas kraujas tyrimams naudojamas tą pačią dieną, o iki tyrimo laikomas šaldytuve 4°C temperatūroje.

Mitybinio mišinio paruošimas ir limfocitų kultūros užsėjimas. Visi mitybinio mišinio paruošimo ir limfocitų kultūros užsėjimo etapai atliekami steriliomis sąlygomis. Heparinizuotas kraujas sumaišomas su mitybine terpe, santykiu 1:15. Mitybinės terpės mišinys susideda iš:

mitybinės terpės RPMI 1640 – 12 dalių;

jaučio serumas – 3 dalys;

kraujas – 1 dalis;

FHA (galutinė koncentracija - 7,8 µg/ml);

Gentamicinas K – 0,1 ml/100 ml terpės;

5-bromo-2'-deoksiuridinas, BrdU (galutinė koncentracija 10 µg/ml).

Mišinys išpilstomas į eksperimentui reikalingą flakonų kiekį po 9,3 ml kiekviename bei įpilama 0,7 ml heparinizuoto kraujo. Mišinys užkemšamas steriliais guminiiais kamšteliais. Flakono tūris turi 2–3 kartus viršyti terpės tūrį. Rekomenduotinas flakono aukščio ir dugno skersmens santykis 2,5 : 1. Ląstelės kultivuojamos steriliuose gintarinės spalvos flakonuose termostate 37°C temperatūroje 72 valandas, visiškoje tamsoje. Tiriamoji medžiaga į kultūrą įvedama 48 auginimo valandą. Likus trims valandoms iki fiksacijos į kultūrą įvedamas kolchicinas (galutinė koncentracija 0,6 µg/ml). Po trijų valandų kultūra fiksuojama.

Kultūros fiksacija. Pasibaigus ląstelių kultivavimo laikui, kultūra iš flakonų perpilama į centrifuginius mėgintuvėlius ir centrifuguojama 10 min. 600 x g. Nucentrifugavus viršnuosėdinis sluoksnis nusiurbiamas, paliekant 0,5-1,0 ml suspensijos, o nuosėdos resuspenduojamos 8–10 ml pašildytame iki 40°C hipotoniniame (0,075 M KCl) tirpale. Tada ląstelės inkubuojamos 37°C temperatūroje 25–30 min. Po inkubacijos termostate kultūra nucentrifuguojama, nusiurbiamas viršnuosėdinis sluoksnis. Ląstelės resuspenduojamos tirpalo likutyje, o ant viršaus užpilamas nedidelis kiekis atšaldyto fiksatoriaus – metanolio ir ledinės acto rūgšties mišinio, santykiu 3 : 1. Mišinys greitai suplakamas iki kol susidaro homogeniška suspensija ir palenkus mėgintuvėlį smarkia srovele supilamas likęs fiksatoriaus kiekis. Užfiksuota kultūra dedama į šaldytuvą 20-25 min. Po to fiksacijos etapai kartojami dar du kartus. Užfiksuota ląstelių kultūra gali būti laikoma šaldytuve iki 30 parų, o šaldiklyje – neribotą laiką. Po fiksacijos ruošiami preparatai.

Preparatų paruošimas. Preparatams naudojami objektiniai stikleliai valomi etilo alkoholio ir eterio mišiniu (santykiu 1 : 1), juost merkiant į stiklinę su distiliuotu vandeniu. Objektiniai stikleliai, kartu su stikline, dedami į šaldymo kamerą, kur jie yra laikomi iki tol, kol ant vandens paviršiaus pasidaro matomas susiformavęs ledo kristalų sluoksnis. Kultūra centrifuguojama 10 min. 600 x g, nusiurbiamas viršnuosėdinis sluoksnis. Su stikline Pastero pipete nuosėdos švelniai suplakamos likusiame nedideliame fiksatoriaus kiekyje (0,3–0,6 ml). Ląstelių suspensija užlašinama ant nuriebalinto atšaldyto objekcinio stiklelio (4–5 lašai),

palenktu 20–30° kampu iš 60–80 cm aukščio. Preparatai džiovinami objektinį stiklę pervedant virš spiritinės lempos liepsnos 3-4 kartus, o likęs vandens kiekis paliekamas savaime išdžiūti. Preparatai „sendinami“, juos 1-3 paras paliekant kambario temperatūroje.

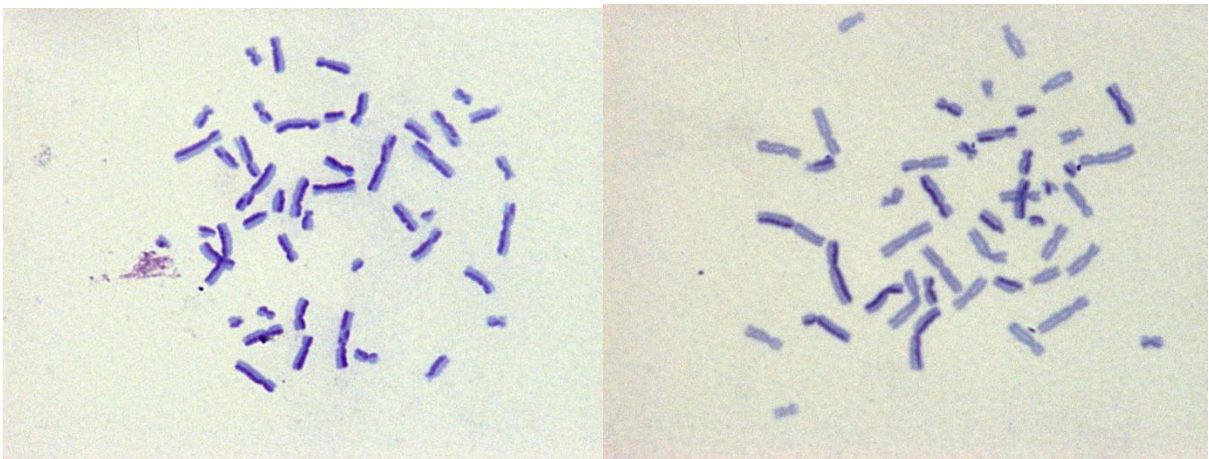
Preparatų dažymas. Prieš dažymą, preparatų kokybė yra patikrinama mikroskopu. Stebimas metafazinių plokštelių išsibarstymas ir ląstelių suspensijos tankis. Preparatai dažomi standartizuotu diferenciniu seserinių chromatidžių dažymo metodu (Lazutka et al., 1999). Pirmiausia preparatai 15 min dažomi tamsoje Hoechst 33258 fluorescensiniu dažu fosfatiniame Serenseno buferyje (galutinė koncentracija 10 µg/ml, pH 6,8). Po to stikleliai nuplaunami ir džiovinami. Tada ant preparatų užlašinami 3 lašai citratinio McIlveno buferio (19,45 ml 0,2 M NaHPO₄ ir 0,55 ml 0,1 M citrinos rūgštis, pH 8,0). Lašeliai uždengiami 3 mažais dengiamaisiais stikleliais, apėmus visą stiklelio plotą, ir švitinami 12:50-13:10 min., 250 W galingumo UV lempa 20 cm atstumu. Buvo bandyta švitinti ir su 20 W galingumo lempa, tačiau kontrastas tarp šviesios ir tamsios chromatidžių nebuvo pakankamai ryškus, todėl eksperimentas toliau buvo tęsiamas su 250 W galingumo lempa. Švitinimo laikas priklauso nuo ląstelių tankio ir pasiskirstymo. Per trumpas švitinimo laikas neduoda kontrasto tarp seserinių chromatidžių (pilnai neišsiskiria BrdU), per ilgas švitinimo laikas – sukepina chromosomas, ko pasekoje SCM analizė negalima. Todėl švitinant yra labai svarbu stebėti, kad buferis neišgaruotų. Maždaug kas 3 min. ties visais dengiamųjų stiklelių sudūrimais lašinamas buferis. Po švitinimo preparatai lengva srovele nuplaunami distiliuotu vandeniu ir išdžiovinami (virš stalinės lempos, arba termostate). Tada preparatai 8 min dažomi 10% Giemza dažais paruoštais fosfatiniame Serenseno buferyje, santykiu 1 : 9. Preparatai nuplaunami distiliuotu vandeniu, išdžiovinami ir analizuojami mikroskopu (20x ir 100x didinančiuoju objektyvu).

2.4 SCM analizės kriterijai

Seserinių chromatidžių mainai skaičiuojami gerai nudažytose, praejusiose du replikacinius ciklus ląstelėse. Skaičiuojamos mainų vietos tarp šviesios ir tamsios chromatidžių. (7 pav.) Kiekvienam variantui dažniausiai analizuojama po 50 ląstelių, o replikaciniui dažniui (RI) skaičiuojamos 100-200 ląstelių. Po to apskaičiuojamas vidutinis SCM dažnis vienai ląstelei.

Idealiu atveju seserinių chromatidžių mainams aptikti analizuojamos metafazinės plokštelės atitinka tam tikrus reikalavimus:

- Chromosomos tolygiai pasiskirsčiusios per visą preparato plotą, neuždengiančios viena kitos;
- Chromosomos yra tiesios (nesusisukusios), pailgos, bet ne „siūlinės“;
- Chromosomos yra sveikos, „neiškepusios“;
- Pilnas chromosomų rinkinys;
- Matomas ryškus spalvinis kontrastas tarp pirmosios ir antrosios chromatidžių;



2.1 pav. Metafazinės plokštelės, dažytos Giemza dažais. Kairėje matomas aiškus antras ląstelės dalijimosi ciklas, dešinėje – trečias.

2.5 Statistinė analizė

Tiesinei dauginei regresijai skaičiuoti naudotas Stats.Blue on-line statistinių programų paketas (<http://stats.blue/index.html>), poriniams testams (t-testui ir Wilcoxon testui) skaičiuoti naudotas Statistical Kingdom on-line kalkuliatorius (<http://www.statskingdom.com/index.html>). Rezultatų skirtumų patikimumas buvo tikrintas Stjudento T – testu.

Statistiškai patikimas skirtumas buvo laikomas tada, kai $p < 0,05$.

Ląstelių proliferacijos kinetikos apskaičiavimas. Įvertintas ląstelių dalijimosi greitis tirtoje kultūroje, kurį apibūdina replikacinis indeksas:

$$RI = (M1 + 2M2 + 3M3)/n,$$

kur M1 – metafazės, esančios pirmame dalijimosi cikle, M2 – antrame, M3 – trečiame. n – bendras ištirtų metafazių kiekis.

Taip pat buvo apskaičiuotos SCM ir RI populiacijų vidurkių paklaidos (SEM), pasitelkus *Excell*.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

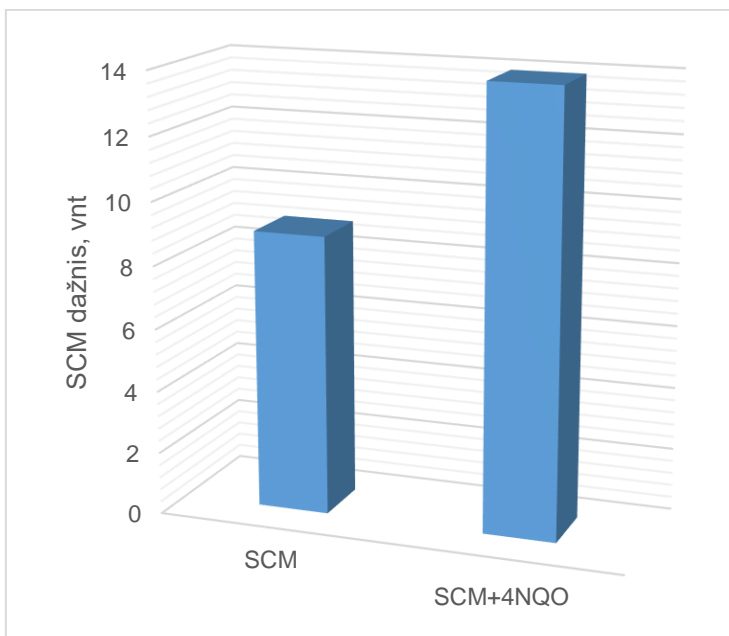
Atliekant SCM tyrimus *in vitro* buvo analizuojamos I ir II tipo diabetu sergančių pacientų periferinio kraujo limfocitų kultūros paveiktos ir nepaveiktos 0,1 µg/l 4NQO. SCM ir IR reikšmės pateiktos 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė Diabetu sergančių asmenų citogenetinio tyrimo rezultatai

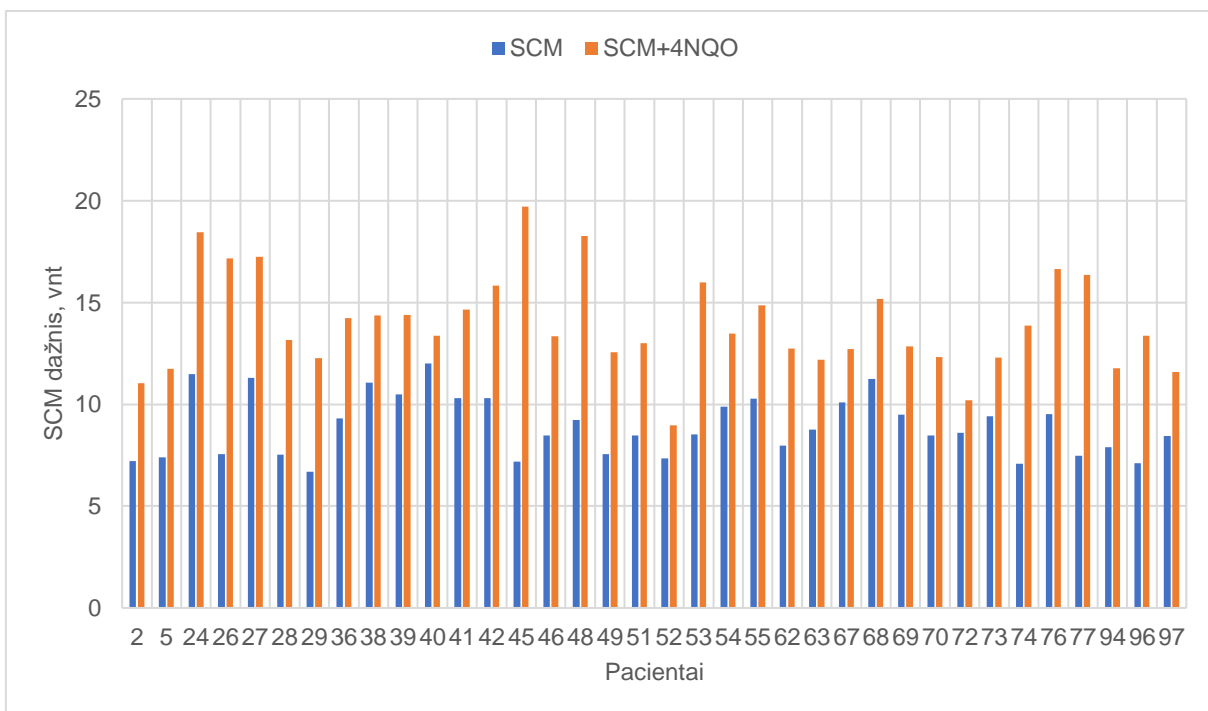
	Paciento BMT kodas	SCM ± SEM*	RI ± SRI	SCM (+NQO) ± SEM*	RI (+NQO) ± SRI
1.	19BMT33 - 2	7,22±0,35	2,69±0,04	11,04±0,52	2,47±0,05
2.	19BMT33 - 5	7,40±0,40	2,36±0,05	11,74±0,58	2,27±0,05
3.	19BMT33 - 24	11,49±0,65	2,48±0,07	18,46±0,96	2,55±0,07
4.	19BMT33 - 26	7,55±0,38	2,08±0,06	17,18±1,23	1,27±0,03
5.	19BMT33 - 27	11,29±0,70	2,41±0,08	17,24±1,10	2,46±0,07
6.	19BMT33 - 28	7,54±0,48	1,65±0,06	13,16±0,83	1,80±0,06
7.	19BMT33 - 29	6,70±0,32	2,12±0,06	12,26±0,64	2,15±0,06
8.	19BMT33 - 36	9,32±0,57	2,81±0,04	14,22±1,51	2,81±0,04
9.	19BMT33 - 38	11,06±0,56	2,32±0,05	14,36±0,77	2,41±0,05
10.	19BMT33 - 39	10,48±0,66	2,62±0,05	14,40±1,07	2,56±0,05
11.	19BMT33 - 40	12,00±0,74	1,96±0,05	13,38±0,83	2,20±0,05
12.	19BMT33 - 41	10,30±0,58	1,29±0,07	14,65±0,77	2,05±0,04
13.	19BMT33 - 42	10,30±0,55	1,81±0,07	15,84±0,85	1,74±0,04
14.	19BMT33 - 45	7,18±0,57	2,04±0,05	19,70±1,81	1,96±0,07
15.	19BMT33 - 46	8,46±0,49	2,13±0,07	13,34±0,97	2,00±0,07
16.	19BMT33 - 48	9,24±0,47	1,88±0,08	18,26±1,72	2,03±0,05
17.	19BMT33 - 49	7,56±0,48	2,28±0,06	12,56±0,64	2,47±0,05
18.	19BMT33 - 51	8,48±0,44	2,46±0,07	13,00±0,64	2,63±0,07
19.	19BMT33 - 52	7,34±0,47	2,28±0,08	8,98±0,59	1,65±0,08
20.	19BMT33 - 53	8,52±0,59	2,05±0,06	16,00±0,80	1,95±0,08
21.	19BMT33 - 54	9,89±0,74	1,59±0,06	13,48±0,68	1,67±0,06
22.	19BMT33 - 55	10,28±0,53	1,47±0,06	14,86±0,88	1,44±0,06
23.	19BMT33 - 62	7,98±0,42	2,18±0,07	12,74±0,84	1,78±0,08
24.	19BMT33 - 63	8,76±0,53	2,67±0,07	12,20±0,72	2,65±0,06
25.	19BMT33 - 67	10,10±0,61	2,58±0,06	12,72±0,92	2,48±0,07
26.	19BMT33 - 68	11,24±0,60	1,82±0,08	15,18±1,05	2,09±0,08
27.	19BMT33 - 69	9,48±0,59	1,79±0,06	12,84±0,72	2,12±0,07
28.	19BMT33 - 70	8,48±0,59	2,66±0,06	12,32±0,80	2,13±0,08
29.	19BMT33 - 72	8,60±0,60	2,56±0,07	10,20±0,69	2,39±0,08
30.	19BMT33 - 73	9,42±0,53	2,49±0,07	12,30±0,78	2,65±0,06
31.	19BMT33 - 74	7,08±0,51	1,96±0,06	13,86±1,37	1,54±0,07
32.	19BMT33 - 76	9,51±0,50	1,69±0,07	16,64±1,37	1,40±0,05
33.	19BMT33 - 77	7,48±0,52	2,11±0,08	16,36±0,92	1,78±0,07
34.	19BMT33 - 94	7,90±0,38	2,82±0,03	11,76±0,58	2,72±0,04
35.	19BMT33 - 96	7,12±0,41	2,58±0,05	13,36±0,71	2,29±0,06
36.	19BMT33 - 97	8,44±0,35	2,73±0,04	11,60±0,63	2,57±0,05

* p < 0,05

Visų pacientų SCM dažnių vidurkis nepaveiktose ląstelėse siekė $8,92 \pm 0,25$, o 4NQO veiktose $13,95 \pm 0,40$. Matomas ryškus 4NQO poveikis ląstelių kultūroms; tiek visų pacientų SCM dažnių vidurkiai (3.1 pav.), tiek atskirų pacientų SCM dažniai (3.2 pav.) parodė SCM šuolį tarp 4NQO neveiktų ir 4NQO veiktų ląstelių.



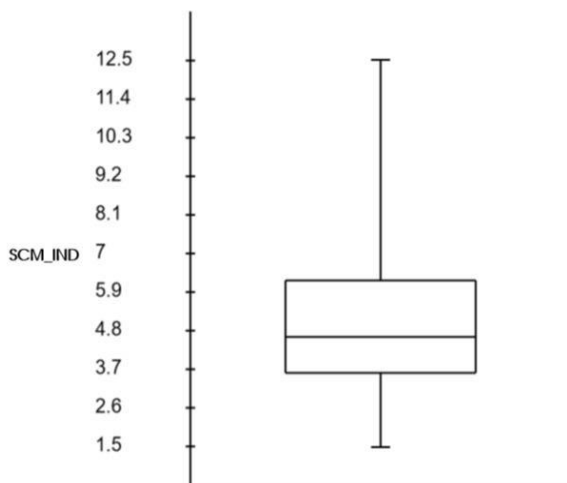
3.1 pav. SCM dažnio vidurkiai 4NQO neveiktuose ir 4NQO veiktuose pacientuose



3.2 pav. Atskirų pacientų palyginimas 4NQO veiktose ir neveiktose ląstelių kultūrose

SCM kiekio skirtumai buvo statistiškai įvertinti, naudojant porinį *t*-testą ir neparametrinį Wilcoxon testą. Pirminė duomenų analizė parodė nuokrypius nuo normaliojo pasiskirstymo ($P= 0.0227$, Shapiro-Wilk testas), todėl papildomai buvo naudotas neparametrinis Wilcoxon testas. Abu testai parodė statistiškai patikimus skirtumus tarp SCM kiekio nepaveiktuose ir *in vitro* paveiktuose 4NQO limfocituose ($P<0,0001$).

Indukuotų SCM kiekio (SCM kiekis 4NQO paveiktuose limfocituose minus SCM kiekis nepaveiktuose limfocituose) skirstinys buvo asimetriškas, kas rodo, kad pacientų jautrumo 4NQO skirtumai nėra atsitiktiniai (atsitiktinių svyravimų atveju turėtume normalųjį skirstinį). Tolimesniems tyrimams (genų raiškos tyrimams) reikėtų dviejų kontrastinguojančių grupių: su žemu indukuotų SCM kiekiu ir su aukštu. 3.3. pav. Skirstinyje tai atitiktų pirmą (kur SCM kiekis $<3,5$) ir ketvirtą (kur SCM kiekis $>6,2$) kvartilį. Atrenkami žemo indukuotų SCM kiekio grupė ($n=8$) ir aukšto indukuotų SCM kiekio grupė ($n=9$)



3.3 pav. Indukuotų SCM kiekio skirstinys

Ryšiams tarp 4NQO paveiktų/nepaveiktų ląstelių bei pacientų demografinių bei klinikinių rodiklių apžvelgti, toliau buvo atlikta išsami statistinė duomenų analizė.

Pirmiausia buvo patikrinta, ar yra kokių nors statistiškai patikimų ryšių tarp SCM kiekio (nepaveiktuose 4NQO kultūrose) ir demografinių pacientų rodiklių (amžiaus, lyties, KMI ir rūkymo).

$$\text{Model: } \text{SCE} = 8.1407 + 0.01 \cdot \text{AMZIUS} + 0.2565 \cdot \text{Lytis} - 0.0106 \cdot \text{KMI} + 0.2924 \cdot \text{RUKYMAS}$$

Predictor	Coefficient	Estimate	Standard Error	t-statistic	p-value
Constant	β_0	8.1407	1.9418	4.1923	0.0002
AMZIUS	β_1	0.01	0.0206	0.4867	0.6299
Lytis	β_2	0.2565	0.7104	0.3611	0.7205
KMI	β_3	-0.0106	0.0534	-0.1981	0.8442
RUKYMAS	β_4	0.2924	0.4625	0.6323	0.5318

3.4 pav. SCM kiekio priklausomybės nuo demografinių ir klinikinių rodiklių analizės, panaudojant dauginės regresijos modelį rezultatai. Skaičiavimai atlikti Stats.Blue programa, lentelės viršuje pateikiamas regresijos modelis. Amžius yra tolydus kintamasis, išreikštas metais; lytis – diskretus kintamasis, kur 1 – vyras, 2 – moteris; KMI (kūno masės indeksas) – tolydus kintamasis, išreikštas kg/m^2 ; rūkymas – diskretus kintamasis, kur 1 – niekada nerūkę asmenys, 2 – anksčiau rūkę asmenys, 3 – dabar rūkantys asmenys.

Analizė atlikta, naudojant dauginės regresijos modelį (žr. lygtį viršuje), tačiau visi regresijos koeficientai buvo nepatikimi.

Analogiška analizė buvo atlikta ir su klinikiniais rodikliais, taip pat jokių statistiškai patikimų sąsajų nenustatyta (duomenys neparodyti). Vienas iš galimų paaiškinimų to, kad pirminė analizė neparodė jokių sąsajų – tai tiriamųjų imties ypatybės. Pirma, imtis buvo pakankamai maža (36 pacientai). Antra, kadangi tai yra tik pirminis tyrimo etapas, tai imtis taip pat ir nesubalansuota, t.y., įvairiose kategorijose yra nevienodas pacientų skaičius (pvz., beveik visi nerūkantys pacientai buvo moteriškos lyties, o beveik visi rūkantys – vyriškos lyties). Todėl sekančiame etape patys kintamieji kiek pertvarkyti (pvz., kintamasis AMZIUS buvo pertvarkytas tokiu būdu, kad susidarytų trys amžiaus grupės: 40 m. amžiaus ir jaunesni, 41-60 m. amžiaus ir vyresni, nei 60 m. amžiaus), o dalis pirmame etape buvusių nereikšmingų kintamųjų toliau nebuvo analizuoti.

Atlikus analizę su modifikuotais (grupuotais) kintamaisiais, pažingsninės dauginės regresijos metodu atrinktas optimalus modelis, rodantis neindukuotą SCM kiekio priklausomybę nuo demografinių ir klinikinių pacientų rodiklių (3.5 pav.).

Model: $SCE = 7.8597 - 2.0374 \cdot \text{DIAGNOZE} + 2.2107 \cdot \text{AMZIUS} + 0.1221 \cdot \text{TRUKME} - 0.0716 \cdot \text{AMZIUS} * \text{TRUKME}$

Predictor	Coefficient	Estimate	Standard Error	t-statistic	p-value
Constant	β_0	7.8597	1.2532	6.2717	0
DIAGNOZE	β_1	-2.0374	0.7067	-2.8831	0.007
AMZIUS	β_2	2.2107	0.7994	2.7653	0.0094
TRUKME	β_3	0.1221	0.083	1.471	0.1511
AMZIUS * TRUKME	$\beta_{2,3}$	-0.0716	0.041	-1.7485	0.09

3.5 pav. SCM kiekio priklausomybės nuo demografinių ir klinikinių rodiklių analizės, panaudojant dauginės regresijos modelį rezultatai. Skaičiavimai atlikti Stats.Blue programa, lentelės viršuje pateikiamas regresijos modelis. Diagnozė yra diskretusis kintamasis, kur 1 – I-ojo tipo diabetu sergantys pacientai, 2 – II-ojo tipo diabetu sergantys pacientai; amžius yra tolydus kintamasis, išreikštas metais; trukmė – tolydusis kintamasis, todantis laiką metais, praėjusį nuo diagnozės nustatymo iki citogenetinio tyrimo.

Šie rezultatai rodo, kad mažesnis SCM kiekis būdingas pacientams, sergantiems II-ojo tipo diabetu (neigiamas regresijos koeficientas -2.88, P=0.007), o didesni SCM kiekiai yra būdingi vyresniojo amžiaus pacientams (teigiamas regresijos koeficientas 2.77, P=0.0094). Taip pat matyti tendencija, kad didesnis SCM kiekis galėtų būti siejamas su ligos trukme, tačiau šis ryšys yra statistiškai nepatikimas (P=0.1511). Visas modelis paaiškina apie 25 proc. SCM kiekio variacijos tarp donorų ($r^2=0.2497$, P=0.05).

Išanalizavus 4NQO indukuotų SCM kiekio (SCM kiekio 4NQO paveiktose ir nepaveiktose limfocitų kultūrose skirtumas) priklausomybę nuo demografinių ir klinikinių pacientų rodiklių, gautas toks optimalus modelis (3.6 pav.).

Model: $SCE_IND = 3.2912 + 1.7233 \cdot \text{DIAGNOZE} - 2.0078 \cdot \text{STATINAI}$

Predictor	Coefficient	Estimate	Standard Error	t-statistic	p-value
Constant	β_0	3.2912	1.139	2.8897	0.0068
DIAGNOZE	β_1	1.7233	0.715	2.4102	0.0217
STATINAI	β_2	-2.0078	0.7183	-2.7951	0.0086

3.6 pav. SCM kiekio priklausomybės nuo demografinių ir klinikinių rodiklių analizės, panaudojant dauginės regresijos modelį rezultatai. Skaičiavimai atlikti Stats.Blue programa, lentelės viršuje pateikiamas regresijos modelis. Diagnozė yra diskretusis kintamasis, kur 1 – I-ojo tipo diabetu sergantys pacientai, 2 – II-ojo tipo diabetu sergantys pacientai; statinai yra diskretusis kintamasis, kur 1 – statinus vartojantys diabetu sergantys pacientai, 0 – statinų nevartojantys diabetu sergantys pacientai.

Modelis rodo, kad didesnius SCM kiekius 4NQO indukavo II-ojo tipo diabetu sergančių pacientų limfocituose ($P=0.0217$), o statinų vartojimas mažino indukuotų SCM kieki (P=0.0086). Modelis paaiškina 26 proc. indukuotų SCM kiekio variacijos tarp individų ($r^2=0.26$, $P=0.0069$). Indukuotų SCM kiekis nuo kitų kintamųjų nepriklausė, tai gali būti dėl to, kad grupės buvo pakankamai homogeniškos, pvz., beveik visiems pacientams pasireiškė vienokios ar kitokios diabeto komplikacijos. Tolimesniuose tyrimuose reikėtų įvairesnės pacientų grupės ir būtinai – kontrolinių, diabetu nesergančių asmenų grupės.

Panaši analizė atlikta ir (3.7 pav.). Kultūrose, nepaveiktose 4NQO, RI reikšmių variacija priklausė nuo diagnozės (II-ojo tipo diabetu sergančių pacientų ląstelės dalinosi kiek lėčiau) ir amžiaus (vyresniojo amžiaus pacientų ląstelės dalinosi lėčiau):

$$\text{Model: } RI = 2.9685 - 0.2307 \cdot \text{DGN} - 0.2138 \cdot \text{AMZ_GR} + 0.1353 \cdot \text{STATINAI}$$

Predictor	Coefficient	Estimate	Standard Error	t-statistic	p-value
Constant	β_0	2.9685	0.1945	15.2604	0
DGN	β_1	-0.2307	0.1534	-1.5037	0.1428
AMZ_GR	β_2	-0.2138	0.1053	-2.0309	0.0509
STATINAI	β_3	0.1353	0.1164	1.1627	0.2538

3.7 pav. SCM kiekio priklausomybės nuo demografinių ir klinikinių rodiklių analizės, panaudojant dauginės regresijos modelį rezultatai. Skaičiavimai atlikti Stats.Blue programa, lentelės viršuje pateikiamas regresijos modelis. Diagnozė yra diskretusis kintamasis, kur 1 – I-ojo tipo diabetu sergantys pacientai, 2 – II-ojo tipo diabetu sergantys pacientai; amžius yra tolydus kintamasis, išreikštas metais; statinai yra diskretusis kintamasis, kur 1 – statinus vartojantys diabetu sergantys pacientai, 0 – statinų nevartojantys diabetu sergantys pacientai.

Ar 4NQO keičia RI reikšmes po poveikio 4NQO buvo patikrinta, naudojant porinį t-testą. Statistiškai patikimų skirtumų neaptikta ($P=0.2412$). Dėl šios priežasties 4NQO indukuotų RI pokyčių analizė nedaryta.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Moksliniais eksperimentais yra įrodyta, kad oksidacinis stresas atlieka svarbų vaidmenį diabeto vystymosi metu, sąlygojantis insulino veikimo sutrikimų, širdies, kepenų, inkstų, akių ir kitų su diabetu susijusių komplikacijų atsiradimo padidėjimą (Blasiak et al., 2004).

Šiame darbe buvo tiriamas 4NQO genotoksiškumas diabetu sergančiuose pacientuose, atskirai nagrinėjant demografinių bei klinikinių rodiklių įtaką SCM rezultatams. Panašūs tyrimai buvo atlikti ir kitų autorių. Pavyzdžiui, Binici et al. (2013) tyrė kontrolinius ir diabetu sergančių pacientų mėginius SCM metodu. Buvo pasirinkta 80 tiriamųjų grupė, 50 iš jų – II-o tipo diabetu sergantys. Visa tiriamųjų grupė sudarė vien tik nerūkančiųjų grupę. Pacientų amžiaus grupė - 58.12 ± 13.39 m.; 32-83. Palyginus rezultatus (Binici et al. - 7.11 ± 1.14 ; $P < 0.001$) mūsų darytame tyrime SCM dažnis neveiktose 4NQO limfocitų kultūrose buvo šiek tiek aukštesnis - $8,92 \pm 0,25$, tačiau remiantis mūsų gautais duomenimis SCM kiekis būdingas pacientams, sergantiems II-ojo tipo diabetu, yra mažesnis už pacientų, sergančių I-ojo tipo diabetu, todėl tai galėtų paaiškinti rezultatų skirtumus. Amžiaus grupė buvo panaši į mūsų ($56 \pm 15,72$ m.; 21-81), todėl tai įtakos turėti neturėtų. Tiksliai atsakyti ar kiti faktoriai, kaip pavyzdžiui rūkymas, galėjo turėti įtakos tokiems rezultatams pasakyti negalime dėl per mažos tiriamųjų apimties (rezultatai statistiškai nereikšmingi).

Taip pat buvo pastebėta, kad didesni SCM kiekiai yra būdingi vyresnio amžiaus pacientams. Tai patvirtina anksčiau daryti SCM tyrimai. Pavyzdžiui, Sheth et al. (2006) atliktame SCM tyrime su kontrolinėmis ir II-o tipo diabetu sergančiųjų grupėmis, buvo pastebėtas ryšys tarp SCM kiekio ir amžiaus (40 m. $< 7.44 \pm 0.51$; 40-49 m. 7.64 ± 0.67 ; 50-59 m. 7.75 ± 0.64 ; ≥ 60 8.19 ± 0.57).

Kultūrose, nepaveiktose 4NQO, IR reikšmių variacija priklausė nuo diagnozės (II-ojo tipo diabetu sergančių pacientų ląstelės dalinosi kiek lėčiau) ir amžiaus (vyresniojo amžiaus pacientų ląstelės dalinosi lėčiau).

4-nitrochinolino 1-oksidas pasižymėjo genotoksinėmis savybėmis tiriant jo poveikį SCM metodu. Mūsų tyrime buvo pastebėta, kad didesnius SCM kiekius 4NQO indukavo II-ojo tipo diabetu sergančių pacientų limfocituose. 4NQO veiktose ląstelių kultūrose SCM dažnio vidurkis siekė $13,95 \pm 0,40$, o statinų (atorvastatinas, rosuvastatinas) vartojimas mažino indukuotų SCM kiekį ($P=0.0086$). Literatūros šaltinių apie SCM pokyčius statiniais veikiančius diabeto pacientus nebuvo rasta, tačiau Hosseinimehr et al. (2015) parodė statinų

poveikį DNR pažaidoms diabetu sergančiuose pacientuose CBMN metodu. Žmogaus periferinio kraujo limfocituose, veiktuose jonizuojančia spinduliuote, atorvastatino poveikis sumažino MB dažnį, palyginus su kontrolinėmis grupėmis neveiktomis atorvastatinu.

Yra žinoma, kad SCM gali sukelti laisvieji hidroksilo radikalai (OH^\cdot). OH^\cdot radikalai – viena pavojingiausių reaktyviųjų deguonies formų (Mildažienė et al., 2004). Kadangi yra mokslškai patvirtintų duomenų, kad 4NQO ląsteles pažeidžia indukuodamos ROS gamybą, galima būtų spręsti, kad SCM dažnio padidėjimą lėmė laisvieji radikalai.

IŠVADOS

1. Pažingsninės dauginės regresijos metodu apskaičiuota neindukuotų SCM kiekio priklausomybė nuo demografinių ir klinikinių pacientų rodiklių parodė, kad mažesnis SCM kiekis yra būdingas pacientams, sergantiems II-ojo tipo diabetu (neigiamas regresijos koeficientas -2.88 , $P=0.007$), o didesni SCM kiekiai yra būdingi vyresniojo amžiaus pacientams (teigiamas regresijos koeficientas 2.77 , $P=0.0094$). SCM kiekio ir ligos trukmės ryšio nebuvo pastebėta.
2. 4NQO paveiktų tirtų pacientų limfocitų *in vitro* SCM kiekis buvo padidėjęs. Stebima SCM kiekio priklausomybė nuo demografinių ir klinikinių pacientų rodiklių parodė didesnę indukuotų SCM kiekį II-ojo tipo diabetu sergančių pacientų limfocituose ($P=0.0217$), o statinų vartojimas mažesnę indukuotų SCM kiekį ($P=0.0086$).
3. Stebima replikacinio indekso (RI) priklausomybė nuo diabeto tipo. Kultūrose, nepaveiktose 4NQO, RI reikšmių variacija priklausė nuo diagnozės (II-ojo tipo diabetu sergančių pacientų ląstelės dalinosi lėčiau) ir amžiaus (vyresniojo amžiaus pacientų ląstelės dalinosi lėčiau).
4. 4NQO neturėjo įtakos replikaciniam indeksui. Statistiškai patikimų skirtumų neaptikta ($P=0.2412$).
5. Tolimesniems tyrimams (su reparacija susijusių genų raiškos) siūloma atrinkti 8 pacientų su žemu indukuotų SCM kiekiu ($<3,5$) ir 9 pacientų su aukštu indukuotų SCM kiekiu ($>6,2$).

SANTRAUKA

Iveta Aželytė

Seserinių chromatidžių mainų analizė I-o ir II-o tipo diabetu sergančių pacientų limfocituose

Cukriniu diabetu visame pasaulyje serga daugiau nei 425 milijonai. Padidėjusi gliukozės koncentracija kraujyje (hiperglikemija) yra ryškiausias ligos požymis (DeFronzo et al., 2015). Dėl blogos glikemijos kontrolės pacientams, sergantiems diabetu, yra padidėjusi rizika atsirasti įvairioms mikro ir makrovaskulinėmis diabeto komplikacijoms, tokioms kaip retinopatija, neuropatija, nefropatija ir kt. (Lima et al., 2019). Su diabetu ir jo komplikacijomis susijusių DNR pažaidų metodų yra keletas. Vienas jų – seserinių chromatidžių mainų (SCM) metodas. SCM kiekis padidėja, kai ląstelės yra veikiamos įvairių genotoksinių kancerogenų (Salimi et al., 2016). Šiame darbe buvo naudojamas 4-nitrochinolino 1-oksidas (4NQO) – stipri kancerogeninė medžiaga, kuri indukuoja oksidacines DNR pažaidas (Ikenaga et al., 1975).

Statistinė duomenų analizė parodė neindukuotų SCM kiekio priklausomybę nuo demografinių ir klinikinių pacientų rodiklių. Pastebėta, kad mažesnis SCM kiekis būdingas pacientams, sergantiems II-ojo tipo diabetu, o didesni SCM kiekiai yra būdingi vyresniojo amžiaus pacientams. Tiriant 4NQO genotoksiškumą, SCM kiekio priklausomybė nuo demografinių ir klinikinių pacientų rodiklių parodė didesnę indukuotų SCM kiekį II-ojo tipo diabetu sergančių pacientų limfocituose. Kultūrose, nepaveiktose 4NQO, RI reikšmių variacija taip pat priklausė nuo diagnozės (II-ojo tipo diabetu sergančių pacientų ląstelės dalinosi lėčiau) ir amžiaus (vyresniojo amžiaus pacientų ląstelės dalinosi lėčiau).

SUMMARY

Iveta Aželytė

Analysis of Sister Chromatid Exchanges in Lymphocytes of Patients with Type I and Type II Diabetes

More than 425 million people worldwide suffer from diabetes. Elevated blood glucose (hyperglycemia) is the most prominent symptom of the disease (DeFronzo et al., 2015). Poor glycemic control in diabetic patients increases the risk of various micro- and macrovascular complications of diabetes, such as retinopathy, neuropathy, nephropathy (Lima et al., 2019). There are several methods used to evaluate DNA damage associated with diabetes and its complications. One of them is the sister chromatid exchange (SCE) assay. SCE frequency increases when cells are exposed to various genotoxic carcinogens (Salimi et al., 2016). 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO), a potent carcinogen that induces oxidative DNA damage, was used in this work (Ikenaga et al., 1975).

Statistical analysis showed a dependence of the amount of uninduced SCE on demographic and clinical patient parameters. It has been observed that lower SCE levels are common in patients with type II diabetes and higher SCE levels are common in elderly patients. In a 4NQO genotoxicity study, the dependence of SCE levels on demographic and clinical patient parameters showed higher levels of induced SCE in lymphocytes from patients with type II diabetes. In cultures not affected by 4NQO, variation in RI values showed dependence on diagnosis (cells in patients with type 2 diabetes divided more slowly) and age (cells in older patients divided more slowly).

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Ayepola, O.R., Brooks, N.L., Oguntibeju, O.O. 2014. Oxidative Stress and Diabetic Complications: The Role of Antioxidant Vitamins and Flavonoids.
2. Arima, Y., Nishigori, C., Takeuchi, T., Oka, S., Morimoto, K., Utani, A., & Miyachi, Y. (2006). 4-Nitroquinoline 1-oxide forms 8-hydroxydeoxyguanosine in human fibroblasts through reactive oxygen species. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 91 2, 382-92.
3. Asmat, U., Abad, K.R., & Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal : SPJ*, 24, 547 - 553.
4. Binici D. N., Karaman A., Coşkun M., Oğlu A. U., Uçar F. Genomic damage in patients with type-2 diabetes mellitus. *Genetic Counseling*. 2013;24(2):149–156.
5. Błasiak, J., Arabski, M., Krupa, R., Woźniak, K.M., Zadrozny, M., Kasznicki, J., Żurawska, M., & Drzewoski, J. (2004). DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutation research*, 554 1-2, 297-304.
6. Buraczynska M, Wacinski P, Stec A, Kuczmaszewska A. Calpain-10 gene polymorphisms in type 2 diabetes and its micro and macrovascular complications. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2013;27:54-58.
7. Ceriello, A., 2006. Oxidative stress and diabetes-associated complications. *Endocr. Pract.* 12 (1), 60–62.
8. Cho, K.-H., Wolkenhauer, O., 2003. Analysis and modelling of signal transduction pathways in systems biology. *Biochem. Soc. Trans.* 31 (6), 1503–1509.
9. Connolly NMC, Theurey P, Adam-Vizi V, Bazan NG, Bernardi P, Bolaños JP, et al. Guidelines on experimental methods to assess mitochondrial dysfunction in cellular models of neurodegenerative diseases. *Cell Death and Differentiation*. 2017;25(3):542-572.
10. Conrad, S., Künzel, J., & Löbrich, M. (2011). Sister chromatid exchanges occur in G2-irradiated cells. *Cell Cycle*, 10, 222 - 228.
11. Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17 10, 1195-214.
12. Darroudi, F., & Natarajan, A.T. (1983). Cytogenetic analysis of human peripheral blood lymphocytes (in vitro) treated with resorcinol. *Mutation research*, 124 2, 179-89.
13. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews. Disease Primers*. 2015;1:15019.
14. Dizdaroglu, M., Olinski, R., Doroshow, J. H., and Akman, S. A. (1993). Modification of DNA bases in chromatin of intact target human cells by activated human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Res.* 53, 1269–1272.
15. Durruty P, García de los Ríos M. Glucotoxicity and lipotoxicity: Factors in the pathogenesis and evolution of type 2 diabetes. *Revista Médica de Chile*. 2001;129:671-679.
16. Durruty P, Pérez-Bravo F. Patogénesis de la diabetes mellitus. In: García de los Ríos M, Durruty P, editors. *Diabetes Mellitus*. 3era ed. Santiago, Chile: Editorial Mediterráneo Ltda; 2014. pp. 25-39.
17. E. C. Gomes, A. N. Silva, and M. R. de Oliveira, “Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2012, Article ID 756132, 12 pages, 2012.

18. Eckel R, Kahn S, Ferranini E. Obesity and type 2 diabetes: What can be unified and what needs to be individualized? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011;96:1654-1663.
19. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*. 2002;23(5):599-622.
20. Fang, Yun-Zhong, Yang, Sheng, Wu, Guoyao, 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872–879.
21. Ferranini E, Gastaldelli A, Iozzo P. Pathophysiology of prediabetes. *The Medical Clinics of North America*. 2011;95:327-339.
22. Ghemrawi R, Battaglia-Hsu SF, Arnold C. Endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. *Cell*. 2018;7:1-35.
23. Haigis MC, Yankner BA. The aging stress response. *Molecular Cell*. 2010;40(2):333-344.
24. Halliwell, B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721–724.
25. Higienos institutas. Pasaulinė sveikatos diena – suvaldyk diabetą! Visuomenės sveikatos netolygumai. 2016; 1(14).
26. Hipp MS, Park S-H, Hartl FU. Proteostasis impairment in protein-misfolding and aggregation diseases. *Trends in Cell Biology*. 2014;24(9):506-514.
27. Hosseinimehr SJ, Izakmehr M, Ghasemi A. In vitro protective effect of atorvastatin against ionizing radiation induced genotoxicity in human lymphocytes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2015;61(1):68-71. Published 2015 Mar 28.
28. Ide, F., Oda, H., Nakatsuru, Y., Kusama, K., Sakashita, H., Tanaka, K., and Ishikawa, T. (2001). Xeroderma pigmentosum group A gene action as a protection factor against 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis. *Carcinogenesis* 22, 567–572.
29. Ikenaga M, Ichzkawa-Ryoand H, Kondo S. The Major Cause of Inactivation and Mutation by 4-Nitroquinoline I-Oxide in Escherichia coli: Excisable 4NQO-Purine Adducts. *Journal of Molecular Biology*. 1975; 92: 341–356. 10.1016/0022-2836(75)90233-8.
30. Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(8):2653-2658.
31. Jessica E.B.F. Lima, Danilo J. Xavier and Elza T. Sakamoto-Hojo (April 24th 2019). Oxidative Stress, DNA Damage and Repair Pathways in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus, *Type 2 Diabetes - From Pathophysiology to Modern Management*, Mira Siderova, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.85438.
32. Joshi, S., Liu, M., & Turner, N. (2015). Diabetes and Its Link with Cancer: Providing the Fuel and Spark to Launch an Aggressive Growth Regime. *BioMed Research International*, 2015.
33. Kasai, H., and Nishimura, S. (1991). Formation of 8-hydroxydeoxyguane in DNA by oxygen radicals and its biological significance. In *Oxidative Stress: Oxidant and Antioxidants* (H. Sies, Ed.), pp. 99–116. Academic Press, London.
34. Kauffman ME, Kauffman MK, Traore K, Zhu H, Trush MA, Jia Z. et al., MitoSOX-based flow cytometry for detecting mitochondrial ROS. *React Oxyg species (Apex, NC)*. 2016;2(5):361-370.
35. Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature*. 2010;467(7315):622-622.
36. Kimber CH, Doney AS, Pearson ER, McCarthy MI, Hattersley AT, Leese GP, et al. TCF7L2 in the Go-DARTS study: Evidence for a gene dose effect on both diabetes susceptibility and control of glucose levels. *Diabetologia*. 2007;50:1186-1191.

37. Koch, W. H., Henrikson, E. N., Kupchella, E., and Cebula, T. A. (1994). Salmonella typhimurium strain TA100 differentiates several classes of carcinogens and mutagens by base substitution specificity. *Carcinogenesis* 15, 79–88.
38. LaVoie E. J., Adams E. A., Shigematsu A., Hoffman D. On the metabolism of quinoline and isoquinoline: possible molecular basis for differences in biological activities. *Carcinogenesis*. 1983;4(9):1169–1173. doi: 10.1093/carcin/4.9.1169.
39. Lazutka, J.R., Lekevičius, R.K., Dedonytė, V., Maciulevičiute-Gervers, L., Mierauskienė, J., Rudaitiene, S., & Slapšytė, G. (1999). Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in Lithuanian populations: effects of occupational and environmental exposures. *Mutation research*, 445 2, 225-39.
40. Lee AT, Reis D, Eriksson UJ. Hyperglycemia-induced embryonic dysmorphogenesis correlates with genomic DNA mutation frequency in vitro and in vivo. *Diabetes* 1999;48:371-6.
41. Lee, S.C., & Chan, J.C. (2015). Evidence for DNA Damage as a Biological Link Between Diabetes and Cancer. *Chinese Medical Journal*, 128, 1543 - 1548.
42. Lipinski, B., 2001. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *J. Diabetes its Complications* 15 (4), 203–210.
43. M. Freitas, A. Gomes, G. Porto, and E. Fernandes, “Nickel induces oxidative burst, NF- κ B activation and interleukin-8 production in human neutrophils,” *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 15, no. 8, pp. 1275–1283, 2010.
44. Madabhushi R, Pan L, Tsai LH. DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron*. 2014;83(2):266-282.
45. Mancuso P. The role of adipokines in chronic inflammation. *ImmunoTargets and Therapy*. 2016;5:47-56.
46. Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B., 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17 (1), 24–38.
47. Mark Percival, 1996. Antioxidants, *Clinical Nutrition insights*. NUT031 1/96 Rev. 10/98.
48. Matsui, M., Nishigori, C., Toyokuni, S., Takada, J., Akaboshi, M., Ishikawa, M., Imamura, S., and Miyachi, Y. (1999). The role of oxidative DNA damage in human arsenic carcinogenesis: Detection of 8-hydroxy-2#-deoxyguanosine in arsenic-related Bowen’s disease. *J. Investig. Dermatol.* 113, 26–31.
49. McClintock B. The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. *Genetics* 1938; 23:315-76.
50. Meigs JB, Cupples LA, Wilson PW. Parental transmission of type 2 diabetes: The Framingham study. *Diabetes*. 2000;49:2201-2207.
51. Meigs JB, Cupples LA, Wilson PW. Parental transmission of type 2 diabetes: The Framingham study. *Diabetes*. 2000;49:2201-2207.
52. Mildažienė, V., Jarmalaitė, S., Daugelavičius, R. *Laštelės biologija*. Kaunas, (2004).
53. Mirmiran P, Esfandyari S, Moghadam SK, Bahadoran Z, Azizi F. Fatty acid quality and quantity of diet and risk of type 2 diabetes in adults: Tehran lipid and glucose study. *Journal of Diabetic Complications*. 2018;32:655-659.
54. Mohan, Harsh, 2002. *Textbook of Pathology*, fourth ed. Jaypee publishers.
55. Mujica V. Diabetes en el adulto mayor. In: García de los Ríos M, Durruty P, editors. *Diabetes Mellitus*. 3era ed. Santiago, Chile: Editorial Mediterráneo Ltda; 2014. pp. 314-325.
56. Nishigori, C., Hattori, Y., Arima, Y., and Miyachi, Y. (2003). Photoaging and oxidative stress. *Exp. Dermatol.* 12(Suppl. 2), 18–21.
57. Patricia, P.M., 2009. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 771–779.

58. Perry P, Wolff S. New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974; 251:156-8.
59. Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *IJBS* 4 (2), 89–96.
60. Pilar Durruty, María Sanzana and Lilian Sanhueza (February 1st 2019). Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus, Type 2 Diabetes - From Pathophysiology to Modern Management, Mira Siderova, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.83692.
61. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in β -cells: Type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*. 2003;52:581-587.
62. Salawu, A., Wright, K.B., Alkathiri, A., Wyld, L., Reed, M.W., & Sisley, K. (2018). Sister Chromatid Exchange and Genomic Instability in Soft Tissue Sarcomas: Potential Implications for Response to DNA-Damaging Treatments. *Sarcoma*, 2018.
63. Salimi, M., Broumand, B., & Mozdarani, H. (2016). Association of elevated frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of type 2 diabetes patients with nephropathy complications. *Mutagenesis*, 31 6, 627-633.
64. Sen, S. et al, 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 3 (1), 91–100.
65. Shah GN, Morofuji Y, Banks WA, Price TO. High glucose-induced mitochondrial respiration and reactive oxygen species in mouse cerebral pericytes is reversed by pharmacological inhibition of mitochondrial carbonic anhydrases: Implications for cerebral microvascular disease in diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013;440(2):354-358.
66. Sheth, F., Patel, P.B., Vaidya, A.D., Vaidya, R.A., & Sheth, J. (2006). Increased frequency of sister chromatid exchanges in patients with type II diabetes.
67. Sheth, J.J., Shah, U.J., Sheth, F., Shah, N., Vaidya, R.A., & Vaidya, A.D. (2011). Genoprotective Effect of Indian Gentian in Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM): Comet Assay, Sister Chromatid Exchange and Protein Oxidation Studies. *International Journal of Human Genetics*, 11, 83 - 88.
68. Stults, D.M., Killen, M.W., Marco-Casanova, P., & Pierce, A.J. (2020). The Sister Chromatid Exchange (SCE) Assay. *Methods in molecular biology*, 2102, 441-457.
69. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: Principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005;365:1333-1346.
70. Stumvoll M, Häring H, Fritsche A. For debate: Starling's curve of the pancreas overuse of a concept? *Hormone and Metabolic Research*. 2003;35:391-395.
71. Sunada S., Haskins J.S., Kato T.A. (2019) Sister Chromatid Exchange as a Genotoxic Stress Marker. In: Kato T., Wilson P. (eds) *Radiation Cytogenetics. Methods in Molecular Biology*, vol 1984. Humana, New York, NY.
72. Taylor JH, Woods PS, Hughes WL. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1957; 43:122-8.
73. Taylor R. Type 2 diabetes: Etiology and reversibility. *Diabetes Care*. 2013;36:1047-1055.
74. Taylor SI. Deconstructing type 2 diabetes. *Cell*. 1999;97(1):9-12.
75. Tiwari, B.K., Pandey, K.B., Abidi, A.B., & Rizvi, S.I. (2013). Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *Journal of Biomarkers*, 2013.
76. Wallace, J.I., 2004. Management of diabetes in elderly. *Clin. Diabetes* 17, 1.
77. Włodarczyk, M., & Nowicka, G. (2019). Obesity, DNA Damage, and Development of Obesity-Related Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20.

78. Xavier DJ, Takahashi P, Manoel-Caetano FS, Foss-Freitas MC, Foss MC, Donadi EA, et al. One-week intervention period led to improvements in glycemic control and reduction in DNA damage levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2014;105(3):356-363.
79. Zhang Y, Zhou J, Wang T, Cai L. High level glucose increases mutagenesis in human lymphoblastoid cells. *Int J Biol Sci* 2007;3:375-9.
80. Zong G, Lebwohl B, Hu F, Sampson L, Dougherty L, Willet WC, et al. Gluten intake and risk of type 2 diabetes in three large prospective cohort studies of US men and women. *Diabetologia*. 2018;61:2164-2173.