

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
ĀRSTNIECĪBAS PROGRAMMA
MEDICĪNISKĀS BIOĶĪMIJAS KATEDRA

LIELA MĒROGA DNS FRAGMENTU SADALE CILVĒKA LIMFOCĪTOS

DIPLOMDARBS

Darba autors:

Rūta Plaude

Studenta apl.nr. rp11097

Darba vadītājs:

Dr.med. Evita Rostoka

Rīga, 2017

SATURS

KOPSAVILKUMS	4
SUMMARY	6
APZĪMĒJUMU SARAKSTS	7
IEVADS	8
1. LITERATŪRAS APSKATS	10
1.1 DNS bojājumu mehānismi	10
1.1.1 Eksogēnu procesu ietekme uz DNS molekulu	10
1.1.2 Endogēnu procesu ietekme uz DNS molekulu	11
1.2 DNS bojājumu veidi	13
1.3 DNS bojājumu sekas	17
1.4 DNS bojājums, uztura paradumi, fiziska slodze un smēķēšana	18
1.5 DNS bojājums un autoimūnas slimības	20
1.5.1 1.tipa cukura diabēts	21
1.5.1.1 Seruma glikozes līmenis	22
1.5.1.2 AGEs veidošanās	22
2. MATERIĀLI UN METODES	24
2.1 Pētījuma klīniskās daļas norise	24
2.2 Liela mēroga DNS fragmentu sadale limfocītos	25
2.2.1 Zemas kušanas temperatūras gela pagatavošana (1,5%)	25
2.2.2 Limfocītu izdalīšana	25
2.2.3 Limfocītu paraugu pagatavošana PFGE (tapas)	25
2.2.4 PFGE gela pagatavošana	26
2.2.5 Tapas ievietošana agarozes gelā	27
2.2.6 Rotafora palaišana	27
2.2.7 Gela krāsošana un analizēšana	27
2.2.8 S. cerevisiae hromosomu marķiera izveidošana	27
2.2.9 Vielas un aparatūra	28

2.3	Datu statistiskā apstrāde.....	28
3.	REZULTĀTI	31
3.1	DNS dubultspirāles pārrāvumi	31
3.2	Normālsadalījums.....	33
3.3	DNS pārrāvumu saistība ar rādītājiem CD grupā.....	36
3.3.1	Saistība ar demogrāfiskajiem rādītājiem.....	36
3.3.2	Saistība ar smēķēšanu	39
3.3.3	Saistība ar alkohola lietošanu.....	39
3.3.4	Saistība ar ikdienas uztura paradumiem	40
3.3.5	Saistība ar kafijas lietošanu	41
3.3.6	Saistība ar fizisko aktivitāti	42
3.3.7	Saistība ar cukura diabēta komplikācijām	43
3.4	Rādītāju salīdzinājums pa grupām	44
4.	DISKUSIJA	45
4.1	Saistība ar dzimumu, vecumu un ķermeņa masu	45
4.2	Saistība ar kaitīgiem paradumiem.....	47
4.3	Saistība ar uztura paradumiem un fizisko aktivitāti	47
4.4	Saistība ar autoimūnu slimību.....	48
	SECINĀJUMI.....	50
	PATEICĪBAS.....	51
	IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	52
	PIELIKUMI.....	57

KOPSAVILKUMS

Ievads. DNS divpavedienu pārrāvumi ir viens DNS molekulas smagākajiem bojājumu veidiem, jo tiek pārrauta pilnība DNS ķēde un tās atjaunošana bieži notiek kļūdaini, kas ilgstošā laika periodā, uzkrājoties DNS reparācijas kļūdām, var izraisīt mutācijas, citostatiskus un citotoksiskus procesus, kas rezultējas patoloģijas attīstībā.

DNS integritāti ietekmē ne tikai eksogēni un endogēni patoloģiski faktori, bet arī šķietami ikdienišķas lietas kā sports, diēta, emocionālais stāvoklis. Šiem faktoriem kombinējoties, kā arī tiem pievienojoties patoloģiskam fonam, var izveidoties individuāli apstākļi slimību un to komplikāciju attīstībai.

1TCD ir autoimūna slimība, kurai ir raksturīga pastiprināta brīvo radikāļu veidošanās, kā rezultātā tiek izsaukti arī DNS strukturālie bojājumi, kas var vieni paši vai kopā ar oksidatīvo stresu būt par iemesliem mutācijām un šūnu bojāejai. Ir pieejami pētījumi, kur parādīta saistība starp DNS bojājumiem 1TCD patoģenēzē un slimības komplikācijām. Parasti šiem pētījumiem izmanto metodes, kuras identificē mazus DNS fragmentus, pētījumu par liela mēroga DNS fragmentiem ir ļoti maz.

Pētījuma mērķis. Noteikt DNS divpavedienu pārrāvumu saistību ar diētas un dzīvesveida paradumiem kā arī ar autoimūnās slimības – 1. tipa cukurā diabētu un tās komplikācijām.

Materiāli un metodes. Darbā tika iesaistīti 47 dalībnieki, no kuriem 40 bija 1TCD pacienti, bet pārējie piederēja pie kontroles grupas- bez glikozes tolerances traucējumiem. Visiem paraugiem tika izdalīti limfocīti un veikta pulsējošā lauka gēla elektroforēze(PFGE). DĀMF tikai noteikti analizējot PFGE gēlus ar ImageJ programmu, veidojot densitogrammas. Statistikā analīze tikai veikta ar SPSS programmu 23.0.

Rezultāti. Analizējot iespējamo saistību DNS pārrāvumiem un alkohola lietošanu 1TCD pacientu paraugos, tika atrasta statistiski ticama atšķirība starp pacientu iedalījumu pēc alkohola lietošanas faktora un DNS pārrāvumu esamības, tā ir uz robežas jeb $P_{\chi} = 0,056$ un konkrētā atšķirība ir ar stipru saistību ($V=0,37$), kas parāda, ka ļoti bieža alkohola lietošana izraisa DĀMF izveidošanos. Tāpat arī konstatēta saistība vidējo vecumu($P_{\chi} =4,81 \times 10^{-2}$).

Saistība ar dzimumu ir uz robežas ($P_{\chi} = 0,057$), tomēr DMĀF frakcija detektēta divas reizes vairāk vīriešiem ($n=6$), nekā sievietēm ($n=3$).

Secinājumi. Analizējot DNS divpavedienu pārrāvumu līmeņa saistību ITCD pacientu un kontroles grupās ar dažādiem to ietekmējošiem faktoriem tikai noskaidrots, ka DĀMF tiek konstatēta biežāk ITCD pacientiem, indivīdiem, kas lieto alkoholu bieži un vīriešu dzimuma pārstāvjiem

SUMMARY

Objectives. DNA double-strand breaks are among the most serious types of DNA damage and their signaling and repair is critical for all cells and organisms. The accumulation of errors in DNA repair can cause mutations, cytostatic and cytotoxic processes that result in the development of pathology. DNA integrity is affected not only by exogenous and endogenous pathological factors, but also the physical activity, diet and emotional state. A combination of these factors, as well the pathological background, may develop in disease and complications. 1TDM is an autoimmune disease characterized by increased oxidative stress and free radical production, resulting in DNA damage. Such damage has been suggested to contribute to the pathogenesis of 1TDM and complications. There are studies which show the relationship between DNA damage, 1TDM pathogenesis and complications. Typically, these studies used methods to identify small DNA fragments, a study of large-scale DNA fragments are very little. Our goal was to determine the DNA double-strand breaks and it's relationship to diet, lifestyle habits, autoimmune disease and its complications.

Materials and methods. In this study, we used PFGE to determine DNA large-scale fragments(double-strand breaks) in freshly isolated peripheral blood lymphocytes from 47 subjects(40 subjects with 1TDM and 7 subjects without impaired glucose tolerance). DNA large-scale fragments were analyzed with ImageJ program. For statistical data SPSS 23.0.

Results. Analyzing the potential liabilities of DNA breaks and the use of alcohol 1TDM patient samples were found statistically significant difference between the alcohol consumption and DNA double strand breaks($P\chi = 0.056$, $V=0.37$),which shows that the frequent use of alcohol may cause DNA double strand breaks. Also, the average age in the group with DNA breaks($P\chi = 4.81 \times 10^{-2}$). Relationship to gender is on the border ($P\chi = 0.057$).

Conclusions. Analyzing the DNA double-stranded break level in 1TCD patient and control group peripheral blood lymphocytes, double strand breaks are detected more often in 1TCD patients, individuals who consume alcohol frequently and male sex.

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

1TCD – pirmā tipa cukura diabēts

8-OHdG - 8-hidroksil-2-dezoksiguanozīns

AGE – dziļās glikēšanas gala produkti (angļu val. *Advanced glycation end product*)

CI – kondifendences intervāls

DĀMF – DNS ātrāk migrējošie fragmenti

dH₂O – destilēts ūdens

DN – diabētiskā nefropātija

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

EDTA - etilēndiamīntetraetiķskābe

H₂O - ūdens

ĶMI – ķermeņa masas indekss

LMA – zemas kušanas agaroze (angļu val. *low melting agarose*)

MS - multiplā skleroze

PFGE – pulsējošā lauka elektroforēze(angļu val. *pulsed field gel electrophoresis*)

PS- parkinsona slimība

ROS – skābekļa brīvie radikāļi (angļu val. *reactive oxygen species*)

SD- standartnovirze

IEVADS

DNS divpavedienu pārrāvumi ir viens DNS molekulas smagākajiem bojājumu veidiem, jo tiek pārrauta pilnība DNS ķēde un tās atjaunošana bieži notiek kļūdaini, kas ilgstošā laika periodā, uzkrājoties DNS reparācijas kļūdām, var izraisīt mutācijas, citostatiskus un citotoksiskus procesus, kas rezultējas patoloģijas attīstībā.

DNS integritāti ietekmē ne tikai eksogēni un endogēni patoloģiski faktori, bet arī šķietami ikdienišķas lietas kā sports, diēta, emocionālais stāvoklis. Šiem faktoriem kombinējoties, kā arī tiem pievienojoties patoloģiskam fonam, var izveidoties individuāli apstākļi slimību un to komplikāciju attīstībai.

1TCD ir autoimūna slimība, kurai ir raksturīga pastiprināta brīvo radikāļu veidošanās, kā rezultātā tiek izsaukti arī DNS strukturālie bojājumi, kas var vieni paši vai kopā ar oksidatīvo stresu būt par iemesliem mutācijām un šūnu bojāejai. Ir pieejami pētījumi, kuros parādīta saistība starp DNS bojājumiem 1TCD patoģenēzi un slimības komplikācijām.

Apzinoties šo dažādo faktoru ietekmi uz organismu un tos veiksmīgi koriģējot, iespējams, mēs varētu samazināt DNS bojājumu intensitāti un tālāku bojājumu attīstību, kas, savukārt, pēc tam var novest pie malignitātes attīstības vai šūnu bojāejas.

Pulsējošā lauka elektroforēze ir metode, adaptēta 1983.gadā, kas ļauj fracionēt neskartas un ļoti lielas DNS molekulas – līdz pat miljoniem bāžu pāru izmērā (Schwartz et al., 1983), salīdzinājumā ar konvenciālo elektroforēzes metodi.

Hipotēze: DNS divpavediena pārrāvumus izraisa ne tikai patoloģiski procesi cilvēka organismā, bet arī dzīvesveida un diētas paradumi.

Darba mērķis: Noteikt DNS divpavediena pārrāvumu saistību ar diētas un dzīvesveida paradumiem kā arī ar autoimūnās slimības – 1. tipa cukurā diabētu un tās komplikācijām.

Darba uzdevumi:

1. Noteikt DNS divpavediena pārrāvumus cilvēka limfocītos kontroles un 1. tipa cukura diabēta pacientu grupās ar pulsējošā lauka elektroforēzes metodi
2. Detektēt DĀMF frakciju cilvēku limfocītu DNS PFGE gelā ar *ImageJ* programmu.
3. Noteikt DĀMF frakcijas saistību ar dzīvesveida: smēķēšanas, fiziskās aktivitātes; diētas paradumiem: alkohola, kafijas, zivju, dārzeņu, konditorijas izstrādājumu patēriņa; kā arī noteikt DĀMF saistību ar dzimumu, vecumu, ĶMI.
4. Noteikt DĀMF frakcijas saistību ar ITCD, tās komplikācijām: retinopātiju nefropātiju, polineuropātiju.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1 DNS bojājumu mehānismi

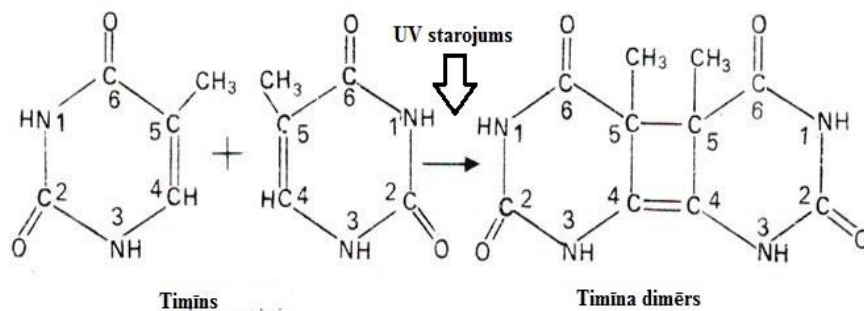
Cilvēka DNS kalpo kā ģenētiskās informācijas glabātuve katrai dzīvai šūnai, tieši tādēļ tās integritāte un stabilitāte ir nozīmīga veselīgai dzīvotspējai. DNS nav inerta, katru mirkli tā tiek pakļauta endogēniem un eksogēniem procesiem, kas veido dažādas DNS strukturālas pārmaiņas un bojājumus. Savukārt, ja radušās izmaiņas un bojājumi netiek salaboti, tas paaugstina risku uz tālāku mutāciju rašanos un slimības attīstību.

DNS integritāti un stabilitāti var ietekmēt gan fizikāli, gan ķīmiski. Bojājumi var veidoties, mutagēnam iedarbojoties gan tieši uz DNS molekulu, gan netieši. Tāpat arī bojājumu variācijas var pārklāties un kombinēties, iedarbojoties gan vides faktoriem, gan endogēnu procesu rezultātā.

1.1.1 Eksogēnu procesu ietekme uz DNS molekulu

DNS molekulas bojājums var veidoties fizikālu faktoru ietekmē, tādu kā augsta temperatūra, ultravioletais starojums (saule, solārijs) un jonizējošais starojums (rentgens), ķīmiskas vielas un medikamenti.

Ultravioletais starojums. Ultravioletā starojuma rezultātā var veidoties kovalentas starpķēžu saites DNS molekulā, veidojas timīna dimerizācija (skatīt 1.attēlu). Šo procesu rezultātā DNS dubultspirāle deformējas un var rezultēties replikācijas un transkripcijas procesu traucējumos (Shao Jun, 2010).



1.attēls. Timīna dimerizācija ultravioletā starojuma ietekmē. (Adaptēts no Kendrick et al., 2014)

Jonizējošais starojums. Jonizējošais starojums (piemēram, rentgens) ierosina bojājuma veidošanos netiešā ceļā, ģenerējot brīvos radikāļus (skatīt tālāk), un DNS molekulā veidojot dažādu veidu bojājumus, ietverot arī vienpavediena un/vai divpavediena pārrāvumus (Miyakoshi et al., 2000).

Ķīmiskas vielas un toksīni. Ķīmiskas vielu ietekme uz DNS molekulu saistāma gan ar dabīgu vielu iedarbību uz organismu, gan cilvēka radītu genotoksisku ķīmisku vielu esamību apkārtējā vidē vai diētā (Franco et al., 2008). Ieelpotais skābeklis var veidot hidrogēna peroksīdu un veidot brīvo radikāļu rašanos. Industriālas ķīmikālijas, tādas kā vinila hlorīds, hidrogēna peroksīds, vai vides ķīmikālijas, tādas kā policikliskie ogleņūdeņraži atrodami dūmos, darvā, sodrējos, saistāmi ar DNS adduktradikāļu veidošanos (Cadet et al., 2006).

Medikamenti. Runājot par medikamentiem, šeit ir divējāda ietekme, jo, lai arī tas ierosina genomisku nestabilitāti un DNS bojājumu, tomēr mēs iegūstam arī pozitīvu efektu, piemēram, cīņā ar vēzi. Ķīmijterapijas vielas, tādas kā cisplatīns vai karboplatīns, alkilē DNS bāzes, in vivo primāri veidojot iekšsaišu ķēdes, kā rezultātā aktivējas dažādi signāļceļi vēža šūnu iznīcināšanai (Siddik, 2003). Topoizomerāzes inhibitori ietekmē DNS replikācijas un transkripcijas procesus, etopozīdi novērš šūnās DNS replikācijas procesu pabeigšanu (Montecucco, Biamonti, 2007). Taksāni, savukārt, novērš dalīšanās procesu anafāzes laikā (Zgang et al., 1999), savukārt, bleomicīns ierosina komplekso bojājumu veidošanos DNS molekulā (Regulus et al., 2007). Antraciklīni augstās koncentrācijās, piemēram, doksorubicīns inhibē topoizomerāzes II saistīšanos ar DNS, bet zemās koncentrācijās darbojas līdzīgi etopozīdiem (Pommier et al., 2010).

1.1.2 Endogēnu procesu ietekme uz DNS molekulu

DNS bojājums var rezultēties arī no endogēniem metaboliskiem un bioķīmiskiem procesiem. Ne visi no šiem procesiem ir labi saprasti un izpētīti (Rinde De Bont et al., 2004). Bojājumi var tikt ierosināti, gan vielai tieši iedarbojoties uz DNS molekulu, gan netieši. Šajā sadaļā apskatīšu galvenos bioķīmiskos procesus, kas iesaistīti DNS molekulas bojājumu veidošanā (Robbins et al., 2010).

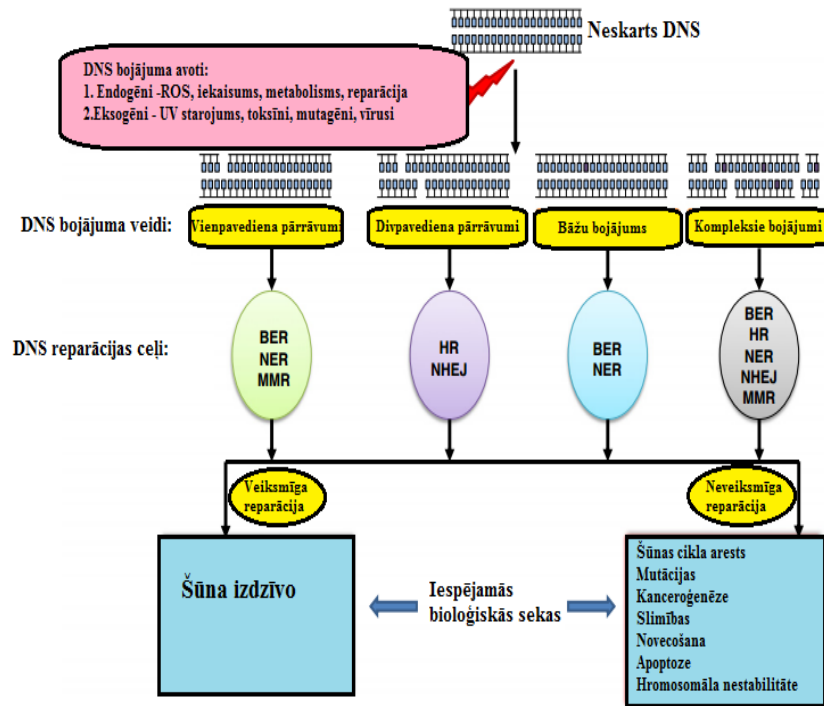
Oksidatīvais stress. Kā viens no galvenajiem mehānismiem tiek uzskatīts oksidatīvais stress, kura rezultātā veidojas ROS (*reactive oxygen species*). Galvenie iemesli, kas veicina oksidatīvā stresa attīstību, ir šūnas respiratorais cikls, fagocitoze, nekrotisks šūnu bojājums, hroniskas virālas infekcijas, kā arī iekaisums. Brīvie radikāļi ir vielas, kam ārējā orbītā ir

nesapārots elektrons, un enerģija, ko satur šī nestabilā konfigurācija, tiek atbrīvota caur reakcijām ar dažādām blakus esošām molekulām, kas bieži vien ir šūnu membrānu vai kodolu komponentes (proteīni, lipīdi, oglehidrāti, nukleīnskābes). Normā brīvie radikāļi veidojas mitohondriju elpošanas un enerģijas ražošanas ciklā, bet pēc tam tie tiek degradēti un eliminēti ar organisma aizsargreakcijām. Kad balanss starp šiem procesiem tiek izjaukts un brīvie radikāļi uzkrājas pārlietu lielā daudzumā, veidojas iepriekš minētais stāvoklis, ko sauc par oksidatīvo stresu (Robbins et al., 2010).

Brīvie radikāļi var veidoties arī citu procesu rezultātā. Piemēram, jonizējošā starojuma rezultātā, ūdens molekula var hidrolizēties, veidojot hidroksilradikāli ($\cdot\text{OH}$) un ūdeņradi ($\text{H}\cdot$). Lielu daudzumu ROS tiek producēti aktivētos leukocītos iekaisuma procesa laikā – superoksīda radikālis (O_2^-), kā arī metāla jonu pārejas reakcijās. Enzimātisku reakciju laikā, kas veidojas ar ārēji uzņemtām ķīmiskām vielām vai medikamentiem arī var veidoties brīvie radikāļi, kas nav ROS, taču ir ar tādu pašu efektu. Tāpat arī svarīgs ķīmiskais mediators slāpekļa oksīds (NO), kuru izdala endoteliālās šūnas, makrofāgi, neironi un citas šūnas, var konvertēties reaktīvā peroksinitrīta anjonā (ONOO^-), kā arī NO_2 un NO_3^- (Szabo et al., 2007).

Kļūdaina DNS replikācija. Organisma šūnas tiek pakļautas arī kļūdainai DNS replikācijai, kas var kalpot par iemeslu DNS mutācijām. Zīdītāju DNS polimerāzēm vērojama dažāda bojājumu intensitāte. Piemēram, polimerāzēm, kas iesaistītas replikācijas procesā, vērojama bojājumu intensitāte $1/10^6$ bāžu pāros, bet polimerāzei, kas iesaistīta reparācijas procesā bojājumu intensitāte vērojama $1/5000$ bāžu pāros (Syv oja et al., 1990). Pētījumos, kuros izmantotas mutētās DNS polimerāzes (kas uzrāda augstu bojājumu intensitāti), vērojami biežāki malignitātes gadījumi gan in vivo, gan in vitro modeļos. Vērojot polimerāžu mainību dažādos stresa apstākļos arī tiek uzrādīta alternatīvu polimerāžu veidošanās, ar augstāku bojājumu intensitāti, padarot šūnu jutīgāku pret mutācijām (Friedberg, Gerlach, 1999). Skrīnējot audzēju paraugus, arī tiek novērota palielināta DNS polimerāžu ar augstāku bojājumu intensitāti, ekspresija (da Costa et al., 1995).

Replikācijas dakšas apstādinašana. Replikācijas dakšas procesi var tikt ietekmēti, veidojoties DNS-proteīnu kompleksiem, transkripcijas „burbuļi”, ar sekojošu nukleotīdu zudumu (Azvolinsky et al., 2009).



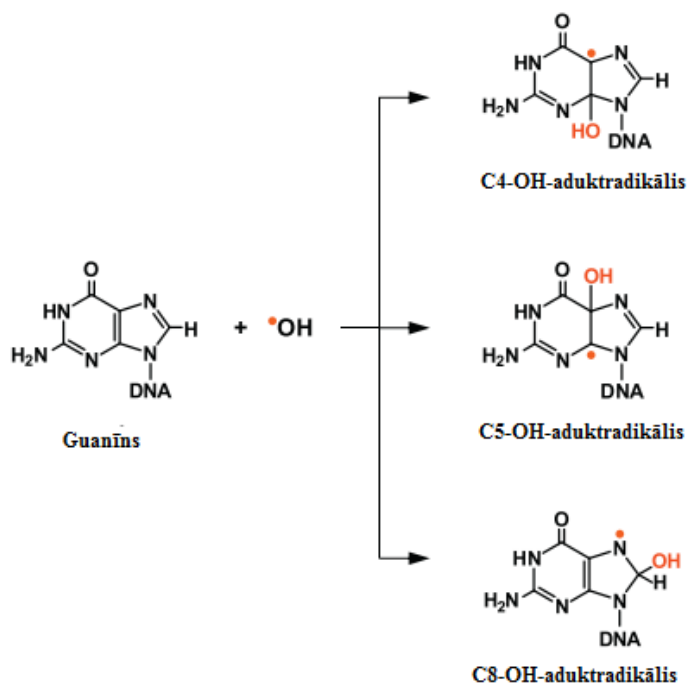
2.attēls. Kopsavilkums dažādiem DNS bojājumu veidiem, reparācijas mehānismiem un iespējamām bioloģiskām sekām. BER-bāzu eksēcizijas reparācija; NER-nukleotīdu eksēcizijas reparācija; MMR-mismatch reparācija; HR-homologa rekombinācija; NHEJ-nehomologa gala piesaiste. (Adaptēts no Aziz et al., 2012)

1.2 DNS bojājumu veidi

Katrs aerobs organisms nepārtraukti tiek pakļauts normāla metabolisma procesiem, kuru rezultātā veidojas ROS. Eksogēnu vai endogēnu procesu rezultātā izveidojušies ROS var veicināt DNS bojājumu rašanos situācijās, kad tiek izjaukts līdzsvars starp ROS veidošanās intensitāti, antioksidantu darbību un DNS reparācijas spējām. Pārlietu liela ROS uzkrāšanās un DNS bojājumu intensitāte ietekmē šūnu funkciju un struktūru, kā rezultātā novērojamas būtiskas bioloģiskas sekas, kas tiks apskatītas tālāk. Kā galvenie oksidatīvā stresa radītie DNS bojājumu mehānismi tiek minēti purīnu un pirimidīnu bojājumi, cukura molekulas bojājumi, tandēmbojājumi, kompleksie bojājumi un DNS bāzu un proteīnu reakcijas (Evans et al., 2004; Dizdaroglu, 2012).

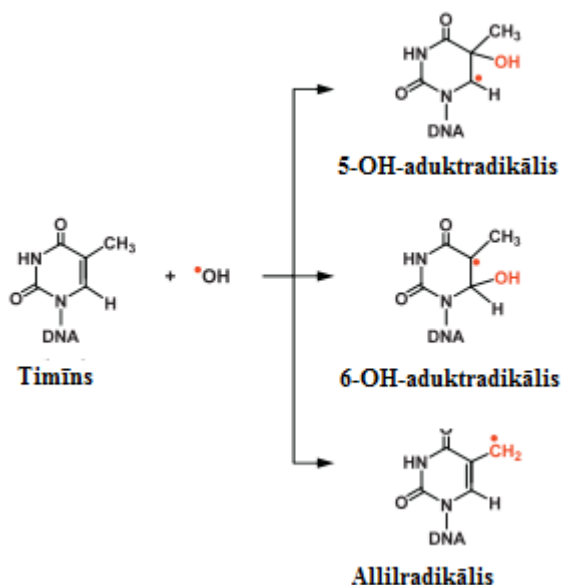
DNS purīnu bojājums. Purīnu bojājums raksturojas ar aduktradikāļu veidošanos. $\cdot\text{OH}$ iedarbojoties uz guanīnu, veido C4-OH-, C5-OH- un C8-OH- aduktradikāļi, bet reaģējot ar guanīnu, veidojas C4-OH- un C8-OH- aduktradikāļi (skat.3.attēlu). Tālāk šie radikāļi var tikt

reducēti, oksidēti vai gan reducēti, gan oksidēti. Šo procesu rezultāti veidojas dažādi produkti, piemēram, oksidējoties C8-OH- aduktradikāļiem veidojas attiecīgi 8-hidroksiadenīns(8-OH-Ade) un 8-hidroksiguanīns(8-OH-Gua), savukārt, atveroties imidazola gredzenam un tālākas redukcijas rezultātā veidojas 4,6-diamino-5-formamidopirimidīns (FapyAde) un 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidīns (FapyGua) (Evans et al., 2004; Dizdaroglu, 2012).



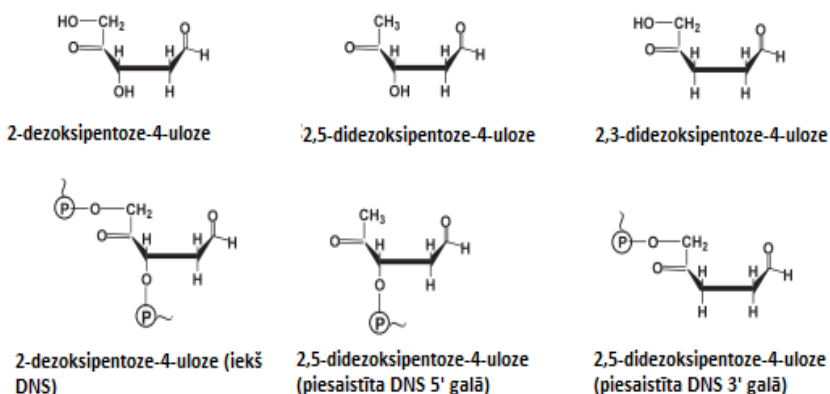
3.attēls. Hidroksilradikāļa reakcija ar guanīnu un tās produkti (adaptēts Dizdaroglu, 2012).

DNS pirimidīnu bojājums. Pirimidīnu bojājums raksturojas ar hidroksilradikāļa pievienošanos citozīna un timīna C5-C6 dubultsaitēm, veidojot C5-OH- un C6-OH aduktradikāļi. Iespējama arī H[•] radikāļa atšķiršana no timīna metilgrupas, veidojot allilradikāļi (skat.4.attēlu). Oksidējoties C5-OH- vai C6-OH- tālāk veidojas timīna glikols (Thu gly) vai citozīna glikols (Cyt gly), savukārt, oksidējoties timīna alliradikālim attiecīgi 5-hidroksimetiluracils un 5-formiluracils (Evans et al., 2004; Dizdaroglu, 2012).



4.attēls. Hidroksilradikāļa reakcija ar timīnu un tās produkti. (adaptēts Dizdaroglu, 2012).

DNS cukura molekulas bojājums. DNS cukura molekulā hidroksilradikālis var atšķirt H no jebkuras no pieciem C atomiem, kā rezultātā var veidoties dažādi galaprodukti. Piemēram, cukura atlikums var tikt atbrīvots no DNS molekulas, tas var palikt DNS molekulā, kā arī veidot DNS molekulas pārrāvuma galu (skat.5.attēlu).



5.attēls. Biežāko cukura molekulas bojājuma struktūras (adaptēts Dizdaroglu, 2012).

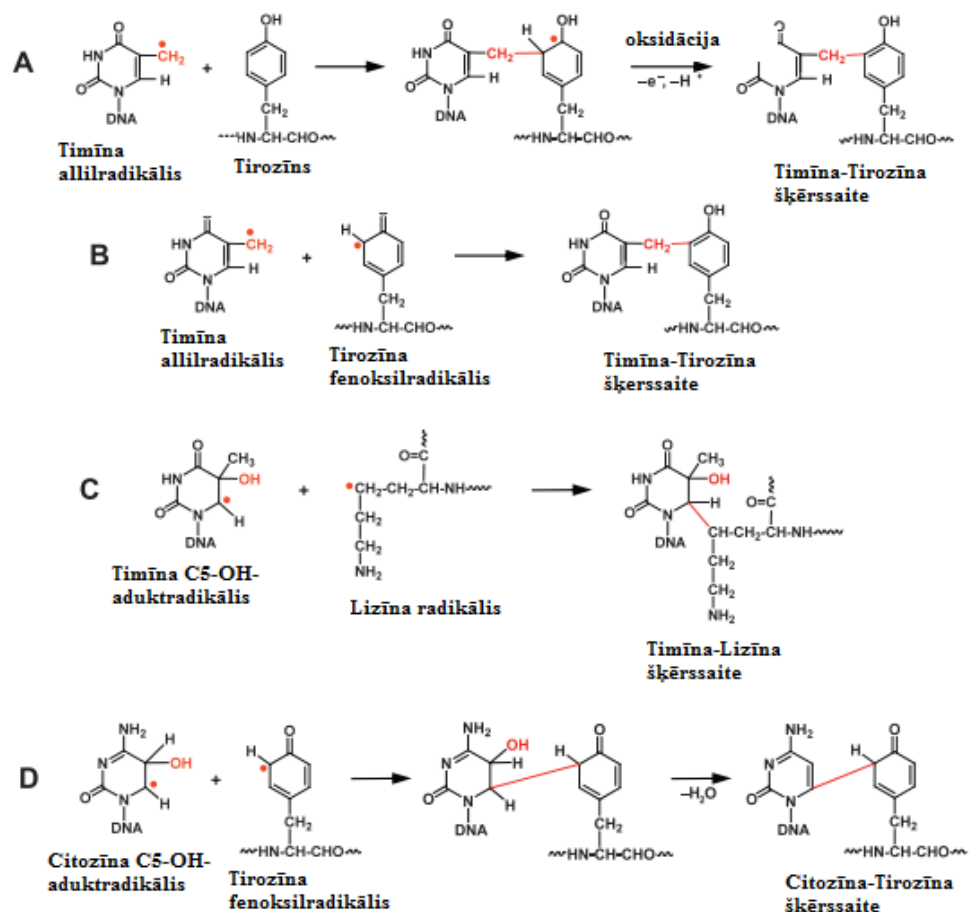
DNS tandēmbojājumi. DNS tandēmbojājumi sastāv no divām bojātām bāzēm, kas var atrasties vai nu vienā spirāles ķēdē blakus, atrasties vienā spirālē un veidot iekšķēdes saites, kā arī atrasties pretējās spirāles ķēdēs un veidot starpķēžu saites. Tandēmbojājumi, kas sastāv no 8-OH-Gua un formamido atlikuma konstatēti Gua-Thy vai Gua-Cyt didezoksinukleotīdos,

sekojoši pēc tam DNS. Iekšķēžu saišu veidošanās novērota starp Gua-Thy, Gua-Cyt un Ade-Thy, savukārt, starpķēžu saites novērotas starp Thy-Ade (Evans et al., 2004; Dizdaroglu, 2012).

DNS kompleksie bojājumi. Kompleksie DNS bojājumi raksturojas ar multiplām lokālām bojājuma vietām. Bojājuma vietas var atrasties kā tandēmbojājums vienā spirāles ķēdē, kā arī divas un vairāk bojājuma vietas pretējās spirāles ķēdēs. Tiek uzskatīts, ka jonizējošais starojums ir gandrīz ekskluzīvs šī bojājuma veida iemesls (Sutherland et al., 2003), taču tiek ziņots arī par bleomicīna šādu efektu (Regulus et al., 2007).

Šiem bojājumiem ir liela dažādība un to ietekme uz šūnu funkciju atkarīga no bojājuma veida, attāluma starp bojājumiem, DNS pārrāvumiem, DNS reparācijas spējām. Daudzi no šiem bojājumiem ir rezistenti pret DNS reparācijas mehānismiem un pastāv šūnās ilgāku laiku, palielinot iespēju veidoties DNS divpavedienu pārrāvumiem, kas savukārt parasti izraisa bioloģiskas sekas – punktveida mutācijas un letalitāti (Evans et al., 2004; Dizdaroglu, 2012).

DNS bāžu un proteīnu reakcijas. Veidojas hidroksilradikālim reaģējot ar DNS bāzēm un proteīniem. Identificētās reakcijas ietver Thy-Tyr šķērssaišu veidošanos *in vivo* un *in vitro*, kovalentas saites veidošanos starp timīna allilradikāli un tirozīna gredzena C3 atomu. Tāpat arī konstatētas Thy-Lys, Cyt-Tyr šķērssaišu veidošanos *in vitro* (skat.6.attēlu) (Evans et al., 2004; Dizdaroglu, 2012).



6.attēls. DNS bāžu un proteīnu reakcijas. (adaptēts Dizdaroglu, 2012).

1.3 DNS bojājumu sekas

Genoma stabilitāte ir neatņemama sastāvdaļa normālai šūnas fizioloģijai. Tomēr DNS molekula un tās sastāvdaļas ir jutīgas un mainīgas dažādu faktoru ietekmē. Iepriekš apskatītie procesi saistāmi ar DNS bojājuma veidošanos – DNS hidrolīze, deaminācija, metabolie produkti un vides faktori u.c. Kopumā šūnas genomā veidojas izmaiņas, kas var ietekmēt tālāku transkripcijas procesu, ietekmēt šūnas funkciju un signālprocesus. Šādi DNS bojājumi, ja netiek salaboti, ir saistāmi ar mutagenitāti un malignitātes attīstību. Līdz šūna zaudē savas spējas efektīvi novērst bojājumus, iespējami vairāki tālāki procesi.

Pirmā iespējamā atbildes reakcija uz neatgriezenisku bojājumu ir šūnas novecošana, tā kļūst neaktīva, tajā nenotiek mitozes un tālāka attīstība (Robbins et al., 2010).

Otrā atbildes reakcija ir šūnas apoptoze. DNS bojājumu nav iespējams salabot un šūnā tiek ierosināti apoptozes mehānismi. Šajā situācijā, iespējams, šūnas bojāeja ir labāka alternatīva, nekā risks uz bojātā DNS mutāciju attīstību malignā procesā. DNS tiek sadalīts lielos 50-300 kilobāžu fragmentos, pēc tam endonukleāzes iedarbībā tiek sadalīts 180-200 bāžu pāru fragmentos (Robbins et al., 2010).

Trešā un bīstamākā atbildes reakcija ir malignitāte. Šūna kļūst maligna, iegūst nekontrolējamu spēju proliferēties un attīstīties sev nepieciešamā veidā (Robbins et al., 2010).

Aptuveni jau gadsimtu atpakaļ Boveri proponēja hipotēzi, ka vēzis ir problēma, kas saistāma ar šūnu proliferāciju, kas izriet no hromosomālām izmaiņām un/vai mutācijām (Soto AM et al., 2014). Tehnoloģijām un iespējām attīstoties, tika demonstrēts liels daudzums hromosomu patoloģiju un DNS mutāciju dažādu malignitāšu gadījumā. Šis noved pie somatiskās mutācijas teorijas, kas skaidro, ka somatisko mutāciju uzkrāšanās var būt ierosinātājs malignitātes attīstībai un progresijai. DNS mutācija ir galvenais molekulārais notikums, kas ierosina mikro-bojājumu veidošanos DNS molekulā. Klīniski malignitāte atrodama stadijā, kad izveidojies jau makro-bojājums un kariotipiskas pārmaiņas (Shao Chin et al., 2015).

1.4 DNS bojājums, uztura paradumi, fiziska slodze un smēķēšana

DNS molekula katru dienu tiek pakļauta neskaitāmām pārmaiņām un bojājumiem, kurus indivīds nespēj ietekmēt ikdienas dzīves norisē, taču ir arī koriģējami faktori, tādi kā uzturs, fiziskā aktivitāte, kaitīgie paradumi. Zinot šo procesu ietekmi uz organismu un tos veiksmīgi koriģējot, iespējams, mēs varētu samazināt DNS bojājumu intensitāti un tālāku bojājumu attīstību, kas, savukārt, pēc tam var novest pie malignitātes attīstības vai šūnu bojāejas. Tālāk apskatīšu galvenos pētījumos minētos faktorus, kuriem rasta saistība ar DNS bojājumu intensitātes palielināšanos vai samazināšanos.

Uzturs. Mūsu ikdienas uzturam ir zināma ļoti liela ietekme uz mūsu organisma funkcijām. Kā viena no vielu grupām, kam zināma kancerogēna ietekme, ir policikliskie aromātiskie oglekļa savienojumi, ar ko saskaramies ne tikai apkārtējā gaisā un smēķējot, bet arī lietojot grilētu un kūpinātu pārtiku (Gammon et al., 2002).

Shaughnessy ar kolēģiem savā pētījumā demonstrē, ka diētas faktoram ir nozīme un ar to iespējams samazināt DNS bojājumu intensitāti, kas asociēta ar kancerogēnēzi. Brīvprātīgie tika sadalīti divās grupās. Pirmajai grupai četru nedēļu garumā tika uzturā dota termiski

apstrādāta gaļa, divas nedēļas tā tika apstrādāta 100 grādu temperatūrā, otras divas nedēļas daļai 250 grādu temperatūrā. Otrai grupai tika dota tikai 250 grādu temperatūrā apstrādāta gaļa vai arī kombinācijā ar mutagēnu inhibitoriem – zaļie dārzeņi, jogurts un hlorofilīna tabletes. Rezultātā, analizējot perifēro asiņu limfocītu DNS bojājumu daudzumu, tika konstatēts, ka uzturā lietojot augstā temperatūrā gatavotu gaļu mutagenitāte pieaug, bet uzturā lietojot mutagēnos inhibitorus DNS bojājumu daudzums samazinās aptuveni divas reizes (Shaughnessy et al., 2011).

Tāpat arī zināma ir pozitīva uztura ietekme uz cilvēka organismu, piemēram, olīveļļas, augļu un dārzeņu lietošana uzturā, kombinācijā ar mazāku daudzumu dzīvnieku tauku saturošu pārtiku, asociēta ar zemāku malignitātes attīstību plaušās, kuņģī, aizdegunē, aknās, resnajā zarnā, urīnpūslī un prostatā (Potter et al., 1999; Miller et al., 1994).

Salīdzinot atšķirības starp veģetāriešiem un cilvēkiem, kas uzturā lieto gaļu, atrastas sakarības, ka veģetāriešu uzturs var samazināt genoma nestabilitāti veseliem cilvēkiem, pierādot to ar mikrokodoliņu veidošanās intensitāti perifēros retikulocītos, kas norāda uz bojājuma esamību, kā arī mērot hemoglobīna adduktradikāļu koncentrāciju perifēros eritrocītos, kas ir genotoksiski metabolīti (Kotova et al., 2014).

Kafija. Kofeīns ir daudzu ikdienā plaši lietotu produktu sastāvdaļa, tādu kā kafija, tēja, limonādes un šokolāde (MacKenzie et al., 2007). Kafija ir biežāk lietotais kofeīna avots. Tā primāra darbība ir saistāma ar adenozīna receptoru bloķēšanu, kas sekundāri ietekmē tādu neurotransmiteru grupas, kā glutamātu, acetilholīnu un dopamīnu (Sichart et al., 2007). Augstās koncentrācijas tas var inhibēt fosfodiesterāzes darbību, mobilizēt intracelulāru kalciju un prezentē arī antioksidanta aktivitāti (Lee, 2000). Noschang ar kolēģiem savā pētījumā pētīja stresa un kofeīna iedarbību uz žurkām, analizēja DNS pārrāvumus vienas šūnas elektroforēzē un mērot kortikosteroņa līmeni. Tika konstatēts, ka kombinējot kofeīna uzņemšanu un stresa apstākļus, DNS pārrāvumu daudzums nav augstāks nekā sagaidāmais no šo faktoru atsevišķas ietekmes, kā rezultātā varam domāt par kofeīna kavējošo lomu stresa atbildē.

Alkohols. Alkohola lietošana uzturā jau sen zināma ar savu destruktīvo darbību. Uzņemot alkoholu organismā, alkohola dehidrogenāze to metabolizē acetaldehīdā, kas ir augsti toksiska viela un zināma ar tās karcinogēno ietekmi. Tālāk acetaldehīds tiek metabolizēts acetātā un, vēl pēc tam ūdenī un oglekļa dioksīdā vieglākai eliminācijai no organisma. Pētījumu rezultāti rāda, ka acetaldehīds izraisa gan DNS vienpavediena pārrāvumus, gan šķērsaišu veidošanos u.c. bojājumus (Xi ZG et al., 2004).

Ir veikti dažādi pētījumi, kas skatījuši alkohola un mikrokodoliņu veidošanās daudzumu, kas norāda uz DNS bojājumu risku. Ir rasta saistība starp alkohola lietošanas daudzumu un biežumu un mikrokodoliņu veidošanos. Meffe ar kolēģiem savā pētījumā izvirza hipotēzi, ka sarkanvīna ne-alkohola frakcija aizsargā genomu no oksidatīvā stresa radītiem bojājumiem. Rezultāti pierādīja, ka de-alkoholizēta sarkanvīna lietošana samazināja gamma starojuma radītu mikrokodoliņu veidošanos perifēros limfocītos, turpretim alkohola lietošana tendēta palielināt starojuma radītu mikrokodoliņu veidošanos (Maffei et al., 2002).

Smēķēšana. Smēķēšana ir viens no galvenajiem kaitīgo paradumu iemesliem DNS bojājuma etioloģijā. Smēķēšanas rezultātā veidojas dažādi DNS bojājumu veidi, taču kā galvenais ir DNS dubultspirāles pārrāvumi. Šie bojājumi, ja reparācijas mehānismi nespēj tos novērst, šūnai var būt letāli, novest pie apoptozes, šūnas novecošanas, iekaisuma reakcijām un onkoģenēzes procesiem (Kazutetsu et al., 2012).

Fiziskā aktivitāte. Mūsdienās aizvien aktuālāka paliek ikdienas fiziskā slodze, sporta zāles pieplūst ar cilvēkiem un visā Pasaulē ir stipri pieaugusi interese maratonu skriešanā. Fiziskā slodze tiek uzskatīta par pozitīvu faktoru organisma funkcijas uzlabošanā un fiziskā spēka attīstībā. Taču ir zināms, ka augstas intensitātes fiziska slodze un muskuļu audu izsīkums saistāms ar DNS bojājumu un oksidatīvo stresu, kamēr zemas un vidējas intensitātes fiziska slodze neizraisa DNS bojājumu un ir ar pozitīvu efektu uz cilvēka ķermeni. Jae Hoon Ryu ar kolēģiem veicis pētījumu, vērtējot maratonu distanču ietekmi un muskuļšūnām un DNS bojājumu limfocītos. Konstatēts, ka pieaugot distancei un pieaugot slodzei, pieaug arī limfocītu DNS bojājums, taču tas uzskatāms par reversiblu, jo pēc trīs dienu miera apstākļiem detektējamā DNS bojājumu intensitāte krītas (Jae Hoon Ryu et al., 2016). Tāpat arī neskaitāmi citi autori (Davison et al., 2005; Tanimura et al., 2008; Wagner et al., 2010; Gray et al., 2014) savos darbos pierāda augstas intensitātes slodzes un DNS pārrāvumu saistību.

1.5 DNS bojājums un autoimūnas slimības

Ir zināms, ka autoimūnu slimību gadījumā DNS bojājumu līmenis ir augstāks, to iespējams skaidrot ar paaugstinātu ROS veidošanos iekaisuma rezultātā, kā arī nepietiekamu organisma spēju šos bojājumus novērst (Bashir et al., 1993). Hronisks iekaisums ar līdžās pastāvošo oksidatīvo stresu, tiek uzskatīta kā daļa no patoģenētiskā mehānisma tādu slimību gadījumā, kā reimatoīds artrīts, sistēmas sarkanā vilkēde, rezultējoties ar radikāļu veidošanos

un ne tikai saistaudu bojājumu, bet arī šūnu biomolekulu modifikāciju. Kamēr dabīgās biomolekulas, piemēram, DNS, pati par sevi nav imunogēna, tomēr tās bojājums, caur brīvo radikāļu mehānismu, var ierosināt dažādu antigēnu veidošanos, kas turpmāk tiek eksponēti imūnai sistēmai, ierosinot krustenisku imūnās sistēmas atbildi un autoimūnu atbildi (Cook et al., 1997).

Ir vairāki pētījumi, kas uzrāda paaugstinātu DNS bojājuma marķieru koncentrāciju dažādu slimību gadījumos. Piemēram, multiplās sklerozes gadījumā paaugstināts 8-OH-dG līmenis smadzeņu patoloģijas skartajos audos (Vladimirova et al., 1998), Parkinsona slimības gadījumā substantia nigra paraugos arī uzrādās paaugstināts 8-OH-dG līmenis, salīdzinājumā ar kontroli (Alarm et al., 1997)). Līdzīgi pētījumi veikti arī reimatoīdā artrīta un sistēmas sarkanās vilkēdes gadījumā (Cooke et al., 1997)). Turpmāk nedaudz sīkāk par 1TCD.

1.5.1 1.tipa cukura diabēts

Ir zināms, ka autoimūnu slimību gadījumā DNS bojājumu līmenis ir augstāks, to iespējams skaidrot ar paaugstinātu ROS veidošanos iekaisuma rezultātā, kā arī nepietiekamu organisma spēju šos bojājumus novērst (Bashir et al., 1993).

1TCD attīstās, kā rezultāts orgānspecifiskai imūnai insulīnproducējošo beta šūnu destrukcijai aizkuņģa dziedzera Langerhansa saliņās. Līdz ar šo šūnu bojāeju un glikozes līmeņa asinīs kontroli iespējama arī akūtu stāvokļu (ketoacidoze, hipoglikēmija), kā arī sekundāru komplikāciju attīstība (diabētiska retinopātija, diabētiska neiropātija, diabētiska nefropātija) (Maahs et al., 2006).

Slimība un tās komplikācijas attīstās arī par spīti korektai glikēmijas kontrolei un insulīna terapijai (Steffes et al., 2003).

1TCD gadījumā bioķīmiskos procesos lielu lomu ietver ne tikai oksidatīvā stresa radītie bojājumi, bet arī specifiski procesi, kas raksturīgi cukura diabēta gadījumā. Tie ietver seruma glikozes līmenis un galaprodukti, kas veidojas neenzimātisku reakciju rezultātā.

1.5.1.1 Seruma glikozes līmenis

Oksidatīvais stress 1.tipa cukura diabēta gadījumā saistāms ar metabolām pārmaiņām. Jau 80.gados Lorenzi ar kolēģiem apraksta, ka augsts seruma glikozes līmenis(30 mmol/L) var izraisīt DNS pārrāvumus cilvēka endoteliālajās šūnās, ko vēlāk Yang ar kolēģiem apstiprināja, izmantojot peles un cilvēka nieru šūnas kā eksperimentālu modeli. Tāpat arī ar augstu glikozes līmeni ir saistāma bāžu oksidācija, t.i. 8-hidroksil-2-dezoksiguanozīna(8-OHdG) veidošanās endoteliālajās un tubulārajās šūnās. Pētījumi pierāda, ka DNS pārrāvumu intensitāte, kā arī paaugstināta seruma un urīna 8OHdG koncentrācija korelē ar vāju glikēmijas kontroli cukura diabēta pacientiem (Tatsch et al., 2012; Sliwinska et al., 2008).

1.5.1.2 AGEs veidošanās

Vēl viena vērā ņemama metabolā pārmaiņa ir AGEs (*advanced glycation endproducts*) veidošanās. Šie gala produkti veidojas neenzimātisku reakciju rezultātā, kas norit starp cukuriem un proteīnu brīvajām amino grupām. Lai pārlicinātos par šo gala produktu genotoksisko efektu, tika izmantotas rukšu nieru šūnas, kā eksperimentālais modelis un pierādīts, ka AGEs var ierosināt DNS pārrāvumus (Stopper et al., 2003), vēlāk to apstiprinot arī cilvēku aknu un resnās zarnas šūnu modeļos (Schupp et al.,2005). Turklāt, AGEs ne tikai var ierosināt DNS pārrāvumus, bet arī ierosina DNS bāžu oksidāciju, kā rezultātā pastiprināti veidojas 8OHdG (Pazdro et al., 2012).

Paaugstināta brīvo taukskābju koncentrācija, visbiežāk palmitīnskābe, arī ir viens no pierādītiem faktoriem, kas cukura diabēta gadījumā izraisa DNS pārrāvumus un apoptozi insulīnsekretējošās šūnās un cilvēka fibroblastos (Beeharry et al., 2003).

Hiperinsulinēmija kā DNS pārrāvumu izraisošs faktors vēl tiek pētīts, taču ir zināms, ka tas ierosina DNS bāžu oksidāciju un veicinot ROS veidošanos (Othman et al., 2013). Turklāt diabēta gadījumā ir samazināta anti-oksidatīvā spēja, samazināta glutaciona sintēze, kas var pastiprināt oksidatīvo bojājumu (Seghrouchni I et al., 2002).

1.tabula Cukura diabēta patofizioloģisko faktoru saistība ar DNS bojājuma efektu

DNS bojājuma efekts	Hiperinsulinēmija	Hiperglikēmija	AGEs	Brīvās tauksskābes
DNS pārrāvumi	Nav zināms	Jā	Jā	Jā
Bāžu oksidācija	Jā	Jā	Jā	Jā

AGEs – advanced glycation endproducts. *Adaptēts no Shao Chin Lee et al., 2015*

2. MATERIĀLI UN METODES

Tika veikts pētījums, kurā tika detektēti cilvēka limfocītu DNS dubultpārrāvumi, izmantojot elektroforēzi pulsējošā laukā, un noteikta to korelācija ar antropometriskiem datiem, fizisku slodzi, diētas paradumiem, autoimūnu saslimšanu un tās komplikācijām.

Pētījums tika realizēts PSKUS Internās medicīnas klīnikas projekta „LatDiane: Latvijas diabētiskās nefropātijas pētījums” ietvaros. Pētījums veikts saskaņā ar Helsinku deklarāciju, un tā atbilstību bioētikas normām apstiprināja Centrālā medicīnas ētikas komiteja (10.07.2013.atzinums Nr.01-29.1/3). Visi pētījuma dalībnieki parakstīja informētās piekrišanas veidlapu. Pētījums tika uzsākts 2013.gadā un tas tiek turpināts.

2.1 Pētījuma klīniskās daļas norise

Pētījumā kopumā tika iekļauti 47 pacienti, no kuriem 40 pacienti bija ar diagnozi 1TCD un 7 pacienti kontroles grupā. Pētījumā tika aicināti piedalīties pacienti, kas jau iesaistīti šajā pētījumā kopš 2013.gada un nelielu daļu sastāda pacienti, kas iestājušies 2016. Un 2017. gados VSIA „Paula Stradiņa Klīniskās Universitātes slimnīcas” Endokrinoloģijas nodaļā vai Endokrinoloģijas nodaļas dienas stacionārā (Pilsonu iela 13, Rīga, Latvija). Pacienti tika iesaistīti pētījumā, pacientiem zvanot un, izskaidrojot pētījumā būtību.

Personas datu aizsardzība nodrošināta atbilstoši Latvijas Republikas normatīvajiem aktiem, kā arī pētījuma realizācijai tika saņemts Centrālās medicīnas ētikas komitejas atzinums Nr.01-29.1/3(10.07.2013). Pirms iekļaušanas pētījumā dalībniekiem paskaidrota pētījuma būtība, dalībnieka tiesības un parakstīta pacienta piekrišanas veidlapa. Katram pacientam piešķirts personas identifikācijas kods.

Pētījumā izmantotie klīniskie dati iegūti no projekta „LatDiane: Latvijas diabētiskās nefropātijas pētījums” anketām un medicīniskās dokumentācijas. Dati ietver informāciju par dzimumu, vecumu, antropometriskiem rādītājiem, slimību anamnēzi, kaitīgajiem ieradumiem, fizisko slodzi un ikdienas uztura paradumiem.

2.2 Liela mēroga DNS fragmentu sadale limfocītos

Pētāmie perifēro venozo asiņu paraugi tika iegūti VSIA „Paula Stradiņa Klīniskās Universitātes slimnīcas” Endokrinoloģijas nodaļas procedūru kabinetā, ko veica sertificēta medicīnas māsa. No PSKUS paraugi pārvadāmā konteinerā divu stundu laikā tika nogādāti Latvijas Universitātes Dabaszinātņu akadēmiskā Centra Medicīnas Fakultātes Medicīnas bioķīmijas laboratorijā, kur notika to tālāka apstrāde.

2.2.1 Zemas kušanas temperatūras gela pagatavošana (1,5%)

Pagatavo 1.5% svaigu zemas kušanas agarozes šķīdumu PBS sāļu šķīdumā. To nosver un karsē 50 ml koniskā kolbā mikroviļņu krāsnī, kamēr izkūst visas pulvera daļiņas un šķīdums kļūst caurspīdīgs. Pievieno dH₂O, lai kompensētu iztvaikoto H₂O. Liek 40-50°C ūdens vannā un turpina protokolu jeb, kamēr šķīdums vēl ir karsts, sapilda 1,5 ml mēģenēs pa 500 μl un uzglabā pie 4°C.

2.2.2 Limfocītu izdalīšana

Asinis tiek ņemtas kopā ar heparīnu. Soļi 2 un 3 tiek veikti krēslā, lai izvairītos no papildus DNS bojājumiem. Mēģenē ielej Histopaque – 1077, kam pievieno asinis (2:1), lai asinis nostātos virs Histopaque un nesamaisītos. Centrifugē 30 min pie 400 x g apgriezieniem 20°C. Pēc centrifugēšanas tiek paņemts un pārnestas limfocītu gredzens mēģenē ar ledusaukstu PBS (1:1 pret Histopaque-1077). Maisījums tiek centrifugēts 180 x g 15 min. Atmazgāts ar PBS tādā pašā tilpumā, centrifugēts 15 min 180 x g. Tiek noņemts un pievienots PBS, iegūstot vēlamu šūnu koncentrāciju (3×10^5 šūnas/paraugā).

2.2.3 Limfocītu paraugu pagatavošana PFGE (tapas)

Vienas tapas tilpums ir 200 μl (izmantojot ražotāja piegādātās formas). Šūnas tiek skaitītas, izmantojot Gorjajeva kameru, izmantojot gaismas mikroskopu. Vienā tapā jābūt aptuveni 3×10^5 šūnu. Jāizrēķina nepieciešamā šūnu koncentrācija un jāatšķaida šūnas. Sasilda un sašķidrina iepriekš pagatavoto zemas kušanas agarozes gelu. Sašķidrināto LMA ievieto sausā bloka termostatā pie ~42-50°C. Šeit ievieto arī tukšās 0,5-1,5 ml sterilas mēģenes, kurās

sekojoši iepilda 120µl siltu zemas kušanas agarozes gelu 1,5%. Vienam pacienta paraugam veido 2 tapas.

Pirms lietošanas veidni iemērc ūdenī, lai novērstu burbuļu veidošanos, tad nosusina malas un vienā malā pielīmē papīra līmlenti marķēšanai un veidnes apakšu nolīmē ar platu plastikāta līmlenti, lai agaroze no veidnes neiztecētu. Šūnu suspensija tiek turēta sausā bloka termostatā 37°C.

Mēģenēs ar LMA ienes 120µl siltas šūnu suspensijas, kopā 240µl. Uzmanīgi pipetē, cenšoties neradīt burbuļus un netraumēt šūnas. Nekavējoties tapu sagatavē ienes 200 µl šūnu/agarozes suspensiju.

Kad veidne ir uzpildīta, uz veidnes paraugus marķē ar marķieri un ievieto 4°C uz ~10-15 min sacietēšanai. Pa to laiku pievieno Proteīnāzi K nepieciešamā koncentrācijā (+ 70 µl proteīnāzes K, 1ml šķīduma uz vienu tapu iepriekš sagatavotajam proteīnāžu buferim). Polimerizējušos tapu izstumj no veidnes un uzreiz ievieto proteīnāžu buferī (NDSK) 15ml mēģenē. Inkubē 50°C 48h (hibridizācijas krāsns). Sekojoši nolej NDSK buferi, pievieno tapām 0,5 M EDTA (pH 9,0) un uzglabā 4°C. Uzglabājams līdz vienam gadam.

2.2.4 PFGE gela pagatavošana

Pagatavo 300 ml 0,9% agarozes gela 0.3x TBE buferī(0.5xTBE: 44mM Tris-borskābe; 1mM EDTA(pH 8.3)). Kad tiek iegūts caurspīdīgs šķīdums, vārglāzi novieto uz magnētiskā maisītāja un tajā ievieto magnētu, lai šķīdums tiktu vienmērīgi atdzesēts līdz ~50°C. Saskrūvē gela veidni, pārbauda vai virsma ir nolīdzsvarota.

Kad šķīdums sasniedz ~50°C temperatūru (vārglāze vēl ir karsta, bet to var jau noturēt rokās), šķidro gelu ielej iepriekš izveidotajā formā. Ievieto “ķemmīti”. Pārbauda vai gelā nav palikuši burbulīši, ja ir, tos ar sterilu pipetes uzgali pārvieto uz gela beigām, kā arī pārbauda, vai nav palikuši burbuļi veidnes cilindriskās atverēs, tos likvidē ar pipetes uzgali.

Atstāj sacietēt istabas temperatūrā.

Kad gels ir sacietējis, to ar skalpeli atdala no veidnes. Noskrūvē veidni.

2.2.5 Tapas ievietošana agarozes gelā

Tapu izņem no uzglabāšanas bufera (0.5M EDTA pH 9), novieto uz stikla virsmas un sadala divās daļās. Ar lāpstiņu to ievieto agarozes gelā “ķemmītes” izveidotajā bedrītē, piespiežot pie priekšējās sienīņas (vadoties no elektronu plūsmas virziena). Atlikušo vietu bedrītē aizpilda ar 1% agarozes šķīdumu. Sekojoši uz formas stūriem uzliek stūru izolatorus. Ievieto visu formu Rotafora kamerā, kas jau ir piepildīta ar elektroforēzes buferi.

2.2.6 Rotafora palaišana

Pirms uzsākt darbu ar PFGE, tiek ieslēgts termostats, kas ir nokalibrēts uz 9,3°C. Sagaida, kad šķīdums termostatā sasniedz 9,3°C, ieslēdz Rotafora PFGE bufera dzesēšanas pumpi, sagaida, kad temperatūra sasniedz nepieciešamo (13°C), ievieto nokomplektētos formu ar gelu elektroforēzes kamerā. Elektroforēzes gelam ir jāatrodas 5mm zem bufera līmeņa. Uzliek drošības vāku.

Nogaida ~20 min, līdz gels atdziest un, nospiežot “*Start electrophoresis*” palaiž izvēlēto programmu (20kb-2600kb /30h /13°C temperatūra).

2.2.7 Gela krāsošana un analizēšana

No Rotafora izņemto gelu krāso, ievietojot 200 ml TBE 0,3x buferī ar etīdija bromīdu 100 µl (0,5 µg/ml (500µg/ml stoka šķīdums)) 1h, sekojoši atkrāso dH₂O.

Vizualizē un fotografē transiluminātorā.

DNS pārrāvumus analizē, vadoties pēc *S. cerevisiae* hromosomu sadalījuma elektroforēzes gelā, DNS dubultpārrāvumus detektē ar *ImageJ* programmu (<https://imagej.nih.gov/ij/>), iegūtās gelu fotogrāfijas invertējot un veidojot densitogrammas ar *Plot Surface* funkciju.

2.2.8 *S. cerevisiae* hromosomu marķiera izveidošana

Rauga šūnas DNS marķiera izveidošanai laipni uzauzdzēja LU MBI pētnieks Dr. biol. Jānis Liepiņš. Darbā tika izmantots *Saccharomyces cerevisiae* celms CEN.PK113-7D

prototrofs. Tas tika audzēts sintētiskajā barotnē LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūta Raugu barošanās fizioloģijas grupā (Nijkamp et al., 2012).

Rauga šūnas tika centrifugētas 1000 g 15 min 4°C, augšanas barotne tika uzmanīgi nolieta. Rauga šūnas tika mazgātas divas reizes ar 0,05 M EDTA pH 7,5 (atkārtoti centrifugējot 1000g 15 min 4°C), turot paraugus uz ledus starp mazgāšanas reizēm. Šūnas tika saskaitītas, paturot prātā, ka tās tiks suspendētas 1:1 agarozes gelā. Tiek uzsildīts 1.2% zemas kušanas agarozes un iegūtā rauga šūnu kultūra ūdens vannā(42-50°C temperatūrā). Šūnu kultūru un agarozī jauc attiecībā 1:1, pievienojot 15.5mikroL Zimolāzes šķīduma uz ml iegūtās suspensijas. Iegūto suspensiju ievieto formās, izvairoties no gaisa burbuļu veidošanās, formu atstāj 4°C temperatūrā aptuveni 15min, līdz sacietē. Iegūtās tapas inkubē 0.5 M EDTA, kas satur 7.5% beta-merkapetanolu, uz 24h 37°C, attiecībā 1:2. Šķidrumu nolej, pievieno NDSK un inkubē uz 24h 50°C temperatūrā.

2.2.9 Vielas un aparatūra

10xPBS (P5493 Sigma Aldrich). Na₂EDTA (Sigma-aldrich E5134), NaOH (Sigma-aldrich 30620). Proteināze K (Thermo scientific (Fermentas) EO0492), *N-laurylsarcosyl* (Sigma-aldrich L5000), Tris bāze (Sigma-aldrich 252859), borskābe (Enola), Rnāze A (Thermo scientific EN0531), RPMI (R7131, Sigma Aldrich), Histopaque – 1077 (10771, Sigma Aldrich), zemas kušanas agarozes (LMA) gela pulveris (Sigma Aldrich A9414), agaroze, etīdija bromīds, transiluminators, mikroviļņu krāsns, hibridizācijas krāsns, *Rotaphor System 6.0*(Biometra).

2.3 Datu statistiskā apstrāde

Dati tika apkopoti, izmantojot *Microsoft Excel 2010*. Datu statistiskā analīze tika veikta, izmantojot statistikas programmu *IBM SPSS Statistics 23.0*.

Aprēķinot vidējos lielumus skaitliskajiem (kvalitatīvajiem) datiem, tika izmantots aritmētiskais vidējais, kam tika aprēķināts arī 95% konfidences intervāls (CI 95%, angļu val. *confidence interval*, CI, saukts arī par ticamības intervālu) jeb rādījums, kurā ar ticamību 95% ir jābūt populācijas vidējam rādījumam.

Sākotnēji tika noteikts, vai skaitlisko rādītāju sadalījums ir normālsadalījums. Tas tika veikts, izmantojot Šapirova – Vilka (Shapiro – Wilk) testu. Analizējamā grupa ir maza ($n < 50$), tādēļ tika izvēlēts šis tests. Iegūstot P_{SV} vērtību, kas lielāka par 0,05 jeb $5,00 \times 10^{-2}$, ir uzskatāms, ka dati ir normālsadalījums. Normālsadalījums tika noteikts, lai noskaidrotu, kuriem datiem drīkst pielietot parametriskās datu metodes, bet kuriem ir jāpielieto neparametriskās datu metodes.

Nomināliem datiem tika piešķirts grupas kods (piemēram, diabētiskā polineuropātija: ir=1, nav=0)

Tālāk, atkarībā no tā, vai tika konstatēts normālsadalījums vai nē, nominālo datu salīdzināšanā, tika pielietoti sekojoši testi: ja tika konstatēts normālsadalījums, tika izmantots t-tests vai ANOVA tests, bet, ja netika konstatēts normālsadalījums, tad tika izmantots Manna-Vitneja (*Mann-Whitney*) vai Kruskala-Valisa (*Kruskal-Walis*) tests.

Testa izvēle ir atkarīga no nominālo datu grupu skaita: ja ir divas grupas, tad tiek izmantots T-tests tests vai Mann-Vitnija tests, ja ir vairāk kā divas grupas - ANOVA tests vai Kruskala-Valisa.

Salīdzinot divu grupu datus, tika izmantots t-tests, iepriekš veicot rezultātu homogenitātes pārbaudi, vai abu grupu rezultātu izkliede ir homogēna vai nav. Tas tika veikts ar Levenjē (*Levene's*) testu. Ja abu grupu izkļedes bija vienādas (Levenjē testa $P > 0.05$), tad tika pielietots Studenta t-tests (*Student's*), bet, ja nē (Levenjē testa $P < 0.05$), tad tika izmantots Velša t-tests. Par svarīgu atšķirību starp grupām uzskatām, ja statistikā ticamība P_T bija mazāka par 0,05 jeb $5,00 \times 10^{-2}$.

Ja tika salīdzināti vairāk kā divu grupu vidējie rādītāji, tad atšķirība starp grupām tika noteikta, izmantojot viena virziena dispersijas jeb ANOVA testu. Metodes rezultāts ir F koeficients un tā P vērtība jeb statistiskā ticamība. Par svarīgu atšķirību starp grupām tiek uzskatīta, ja statistikā ticamība P_F ir mazāka par 0,05 jeb $5,00 \times 10^{-2}$.

Analizējot saistību starp nomināliem datiem un skaitliskiem datiem (konkrēts skaitlis, kas ir izmērāms), tiek lietots lielums eta (η), pieņemot, ka atkarībā no eta lieluma: 0- 0,2 korelācija jeb saistība ir ļoti vāja; no 0,2-0,4 korelācija jeb saistība ir vāja; no 0,4-0,7 korelācija jeb saistība ir vidēji cieša; no 0,7-0,9 korelācija jeb saistība ir cieša; virs 0,9 korelācijas jeb saistība ir ļoti cieša; 1,00 – korelācijas jeb saistība ir ideāla.

Analizējot saistību starp diviem nomināliem rādītājiem, tika noteikts (1) statistiski nozīmīgas atšķirības esamība starp analizējamajām grupām un (2) statistiski nozīmīgas korelācijas esamība starp analizējamajiem lielumiem.

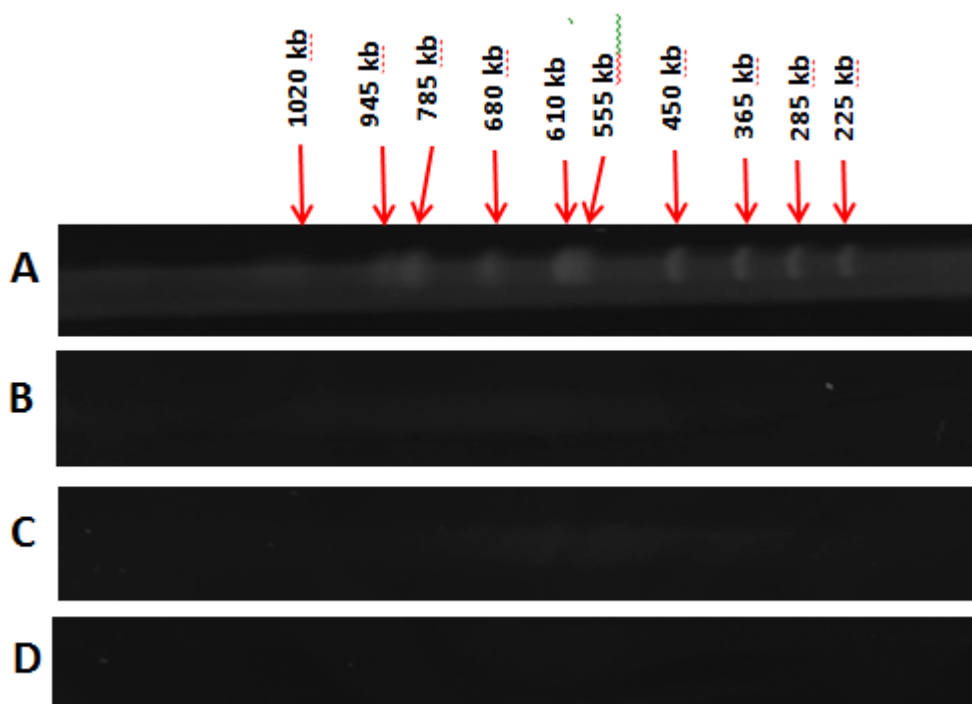
Statistiski nozīmīgo atšķirību noteikšanai tika izmantota krustu rēķina analīze (*crosstab*), iegūta kontingences tabula. Analīze tika veikta, izmantojot hī kvadrāta (χ^2) kritērija jeb Pīrsona χ^2 metodi vai Fišerta tiešais tests (ja kaut vienā grupā vērtība mazāka par pieci). Abu metožu gadījumā par svarīgu atšķirību uzskatījām, ja statistikā ticamība (P_x) bija mazāka par 0,05 jeb $5,00 \times 10^{-2}$.

Divu nominālu rādītāju saistību analīze ar Krāmera V metodi, iegūstot vērtību rādījumu V. Krāmera V ticamības līmenis jeb nozīmīguma rādītājs ir vienāds ar kontingences tabulā iegūto P vērtību. Korelācijas jeb saistības līmenis tika noteikts pēc V koeficienta vērtības: līdz $\pm 0,10$ saistība ir ļoti vāja; no 0,10 – 0,19 saistība ir vāja; no 0,20 – 0,29 saistība ir vidēja; no 0,30 – 0,40 saistība ir stipra; no 0,40 – 0,50 saistība ir ļoti stipra; virs 0,50 saistības noteikšana ir lieka, jo tā ir gandrīz ideāla.

3. REZULTĀTI

3.1 DNS dubultspirāles pārrāvumi

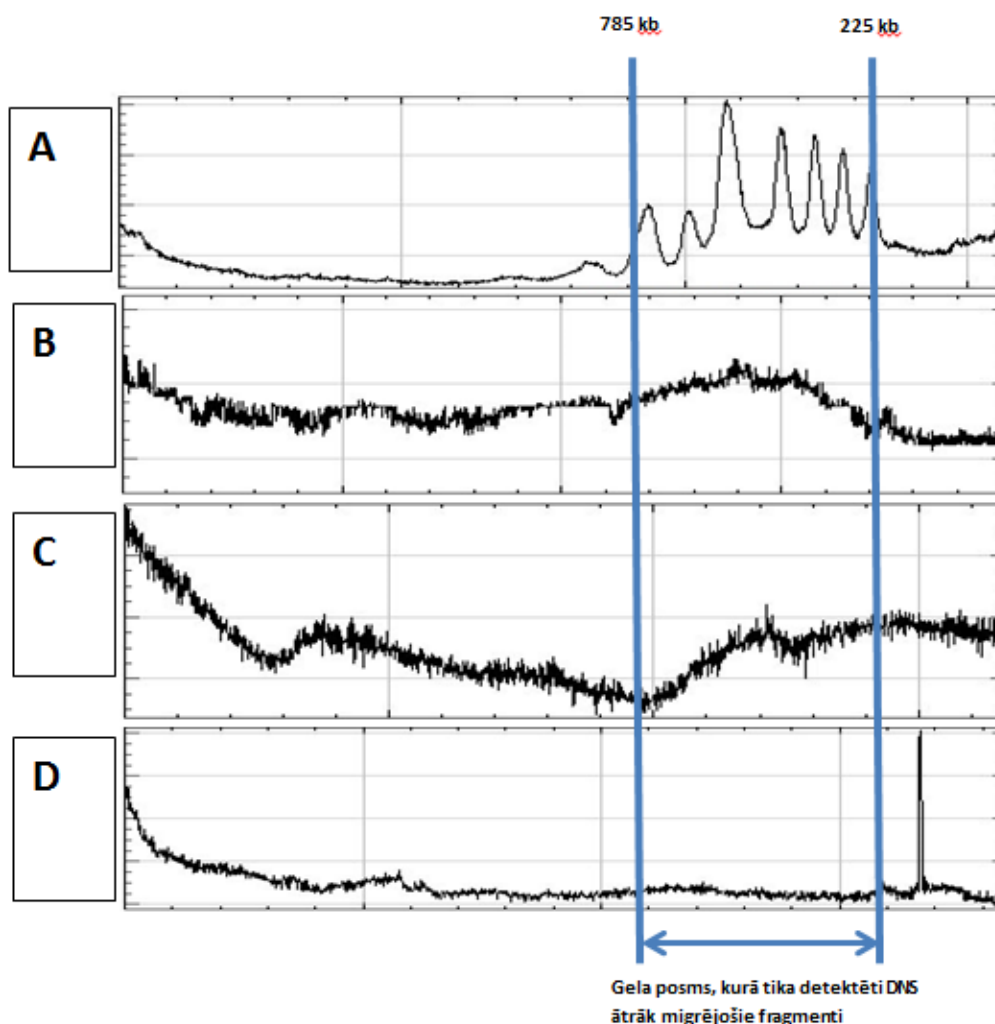
Pētījumā tika analizēti 47 perifēro venozo asiņu limfocītu DNS paraugi, no kuriem 40 paraugi sastāda 1TCD pacientu paraugi un 7 paraugi kontrolei. DNS paraugu analizējamais materiāls tika iegūts ar pulsējošā lauka elektroforēzi, fotografēts ultravioletajā starojumā (skatīt 7.attēlu). Iegūtā fotogrāfija tika apstrādāta ar *ImageJ* programmu, iegūstot fotografētā parauga densitogrammu (skatīt 8.attēlu). Analizējot densitogrammu un salīdzinot to ar attiecīgā parauga marķieri, tika noteikts, vai paraugā ir DNS dubultspirāles pārrāvumi un DNS ātrāk migrējošo fragmentu frakcija (turpmāk DĀMF).



7.attēls. Pulsējošā lauka elektroforēzes reprezentatīvie gēli. DNS fragmentu analīzes paraugs – limfocīti, kas izdalīti no perifērām venozām asinīm.

A: *S. cerevisiae* hromosomas kā DNS fragmentu izmēra marķieris ar attiecīgi norādītām hromosomu pozīcijām un izmēriem. B un C: 1TCD paraugs, kurā tika detektēta DNS ātrāk migrējošo fragmentu frakcija. C: 1TCD paraugs, kurā netika detektēta DNS ātrāk migrējošo fragmentu frakcija.

Analizējot krāsu maiņas vērtības intensitāti ar Image J programmu, veidojot densitogrammas, tika noteikts, vai paraugā ir vai nav DNS ātrāk migrējošo fragmentu frakcija (skatīt 8.attēlu).



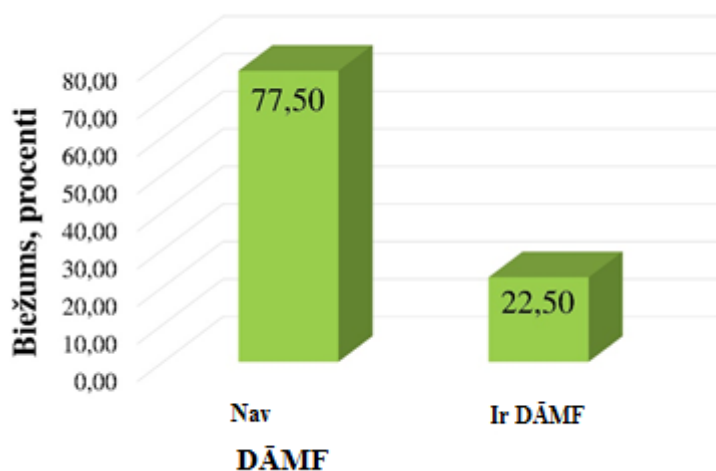
8.attēls. Densitogramma.

A: *S. cerevisiae* hromosomas kā DNS fragmentu izmēra marķieris ar attiecīgi norādītām hromosomu pozīcijām un izmēriem. B un C: ITCD paraugs, kurā tika detektēta DNS ātrāk migrējošo fragmentu frakcija. C: ITCD paraugs, kurā netika detektēta DNS ātrāk migrējošo fragmentu frakcija

Kontroles paraugu grupā, DĀMF netika konstatēta. Starp 40 CD pacientu paraugiem 9 jeb 22,50% tika detektēta DNS ātrāk migrējošo fragmentu frakcija (skat.2.tabula, 9.attēls).

2.tabula. DNS pārrāvumu sadalījums CD grupas paraugos.

DNS pārrāvumi	Visi respondenti	
	Skaitis	Procenti
Nav	31	77,50
Ir mazi pārrāvumi	9	22,50



9.attēls. DĀMF frakciju sadalījums CD pacientu paraugos. DĀMF-DNS ātrāk migrējošo fragmentu frakcija.

3.2 Normālsadalījums

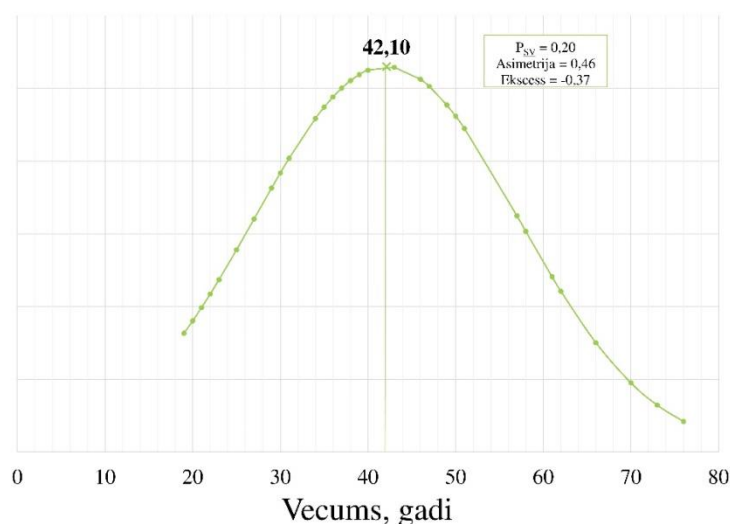
Normālsadalījums tiek analizēts CD grupas paraugiem, jo kontroles grupā ir par maz rezultātu. Normālsadalījums tika noteikts vecumam, dzimumam, ĶMI.

CD pacientu (40) grupas datiem normālsadalījums tika noteikts vecumam, dzimuma sadalījumam un ĶMI (2.tabula). Var konstatēt, ka izveidotā grupa ir normālsadalījumā pēc analizētajiem trim lielumiem, jo $P > 0,05$. Tātad skaitlisko datu analizēs drīkst izmantot parametrisko datu metodes.

3.tabula. Datu normālsadalījums pēc demogrāfiskajiem un rādītājiem CD grupā.

Rādītājs	Atbilde	Visi respondenti			Normālsadalījums, P _{SV} vai P _{VI}
		Skaitis / Vidējais	Procenti / Standartnovirze	CI 95%	
Vecums, vidējais		42,10	15,06	37,28 ... 46,92	0,20
Dzimums	Vīrietis	15	37,50	-	0,15
	Sieviete	25	62,50	-	
ĶMI, vidējais		25,22	3,51	24,09 ... 26,34	0,15

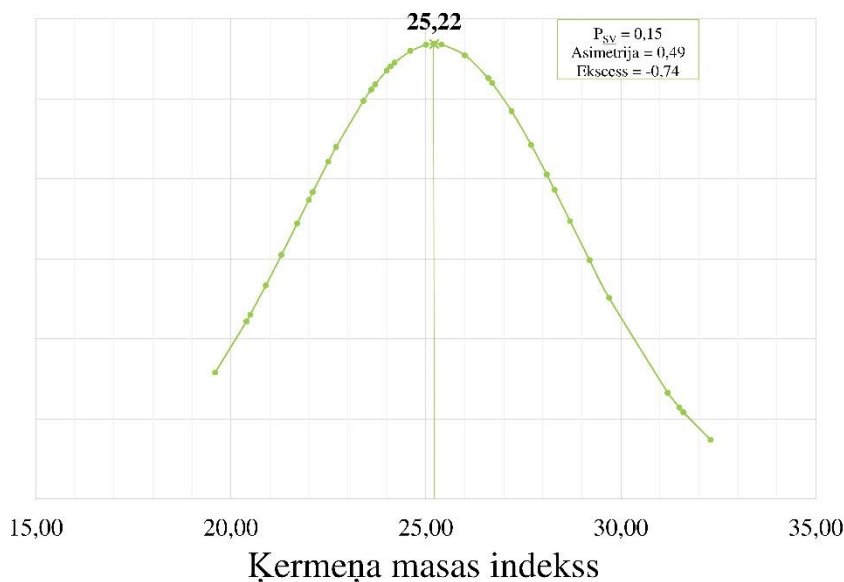
Pacientu vecuma gadījumā (skat.3.tabula, 10.attēls) ir redzams, ka respondentu vidējais vecums ir $42,10 \pm 15,06$ (CI 95% 37,28 – 46,92) gadi ar intervālu no 19 līdz 76. Gausas līknes grafika un pēc asimetrijas koeficienta (pozitīva vērtība) ir redzams, ka konkrētajā grupā ir vairāk jauni pacienti, kas rada vidējā vecuma nobīdi uz mazāku vērtību un attiecīgi labais grafika zars ir izstiepts.



10.attēls. Pacientu vecuma sadalījums jeb Gausa līkne. P_{SV} – Šapirova – Vilka testa statistiskā ticamība.

Pacientu ĶMI gadījumā (skat.3.tabula, 11.attēls) ir redzams, ka respondentu vidējais ķermeņa masas indekss ir $25,22 \pm 3,51$ (CI 95% 24,09 – 26,34) ar intervālu no 19,60 līdz

32,30. Gausas līknes grafika un pēc asimetrijas koeficienta (pozitīva vērtība) ir redzams, ka konkrētajā grupā ir vairāk zemo KMI vērtību, kas rada vidējās vērtības nobīdi uz mazāku vērtību un attiecīgi labais grafika zars ir izstiepts.



11.attēls. Pacientu ķermeņa masas indeksa sadalījums jeb Gausa līkne. P_{sv} – Šapirova – Vilka testa statistiskā ticamība.

Lai noskaidrotu, kādas metodes izmantot, veicot statistisko analīzi, ar pārējiem skaliskiem jeb skaitliskiem datiem, normālsadalījuma analīze tika veikta pārējiem analizējamiem datiem. Pēc iegūtajiem rezultātiem (skat. 4.tabula) ir redzams, ka kafijas lietošanas daudzuma gadījumā nevar lietot parametrisko datu metodes, bet ir jāpielieto neparametrisko datu metodes.

4.tabula. Normālsadalījums skaliskiem datiem.

Rādītājs	P_{sv}	Normālsadalījums
CD slimības laiks	0,19	Ir
Kafijas lietošana	$5,87 \times 10^{-3}$	Nav

3.3 DNS pārrāvumu saistība ar rādītājiem CD grupā

3.3.1 Saistība ar demogrāfiskajiem rādītājiem

DNS pārrāvumiem nav statistiski nozīmīga jeb ticama saistība ($P > 0,05$) ar Ķermeņa masas indeksu gan veselām vērtībām, gan grupas iedalījumu. Grupā, kurā detektēta DĀMF frakcija, četri no tiem ietilpst grupā ar normālu ĶMI, savukārt, pārējie pieci grupā ar lieko svaru un aptaukošanos (skat.5.tabulu).

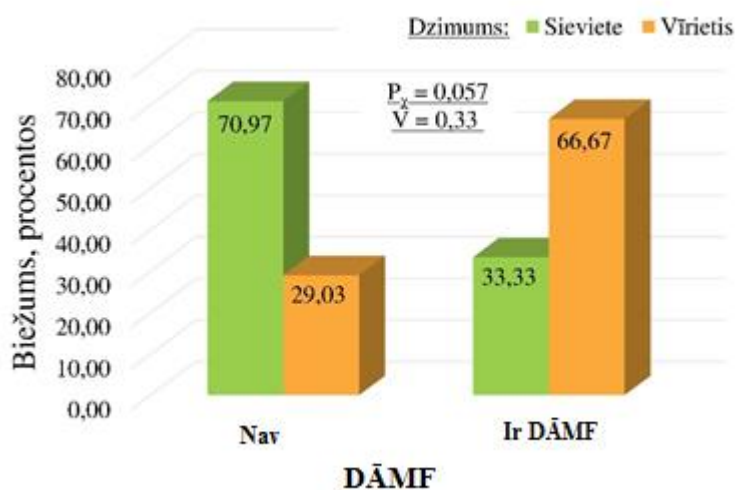
5. tabula. DNS pārrāvumu saistība ar ĶMI cukura diabēta pacientiem

Rādītāja grupa	DNS pārrāvumi				Statistiskā analīze	
	Nav DĀMF		Ir DĀMF			
	Skaits / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze	Skaits / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze	P_{χ} vai P_T	V vai η
ĶMI, vērtība						
Vērtība	25,07	3,45	25,71	3,87	0,64	0,08
ĶMI grupa						
Zem 24.9	18	58,06	4	44,44	0,58	0,17
25-29.9	10	32,26	3	33,33		
Virs 30	3	9,68	2	22,22		

DNS pārrāvumiem saistība ar cukura diabēta pacientu dzimumu nav statistiski nozīmīga jeb ticama, bet ticamības vērtība ir uz robežas: $P_{\chi} = 0,057$ (skat.12.attēlu). Turklāt saistība pēc Krāmēra V ir stipra, bet tās statistiskai nozīmīgums ir uz robežas (saistības P ir vienāds ar P_{χ}). Tātad iespējams, ka ir atšķirības un saistības tendence, bet to var pārbaudīt tikai palielinot pacientu grupas. Tomēr grupā, kurā detektēta DĀMF frakcija (skat.6.tabulu), vīriešu dzimums sastāda divas reizes lielāku ($n=6$) skaitu, nekā sievietes ($n=3$).

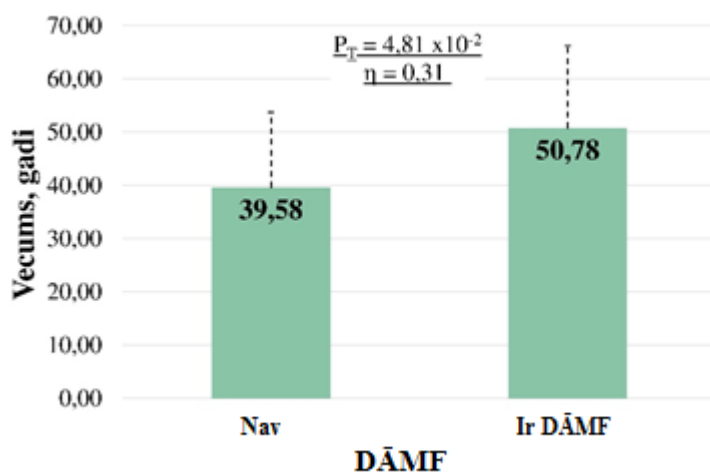
6.tabula. DNS pārrāvumu saistība ar dzimumu CD pacientiem

Rādītāja grupa	DNS pārrāvumi				Statistiskā analīze	
	Nav DĀMF		Ir DĀMF			
	Skaitis / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze	Skaitis / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze	P_{χ} vai P_T	V vai η
Dzimums						
Sieviete	22	70,97	3	33,33	0,057	0,33
Vīrietis	9	29,03	6	66,67		



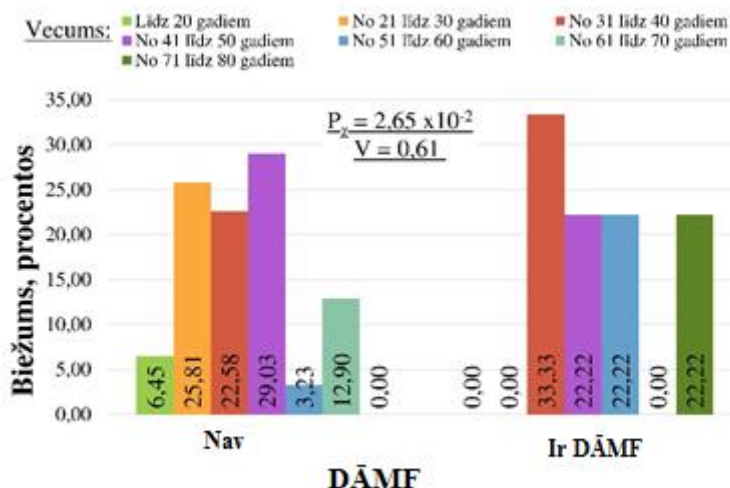
12.attēls. DNS pārrāvuma saistība ar respondentu dzimumu CD pacientu paraugos. P_{χ} – Crosstaba testa statistiskā ticamība, V – saistības rādītājs.

Vidējais vecums statistiski nozīmīgi ($P_{\chi}=4,81 \times 10^{-2}$) atšķiras CD pacientiem ar un bez DNS pārrāvumiem (skat.13.attēlu). Šī atšķirība ir ar stipru saistību ($V = 0,31$) starp vidējo vecumu un DNS pārrāvumu esamību. Grupā, kurā detektēta DĀMF frakcija, vidējais vecums ir 50.78 (SD 15.48) gadi, taču grupā bez DĀMF 39.58 (SD 14.20) gadi.



13.attēls. DNS pārrāvumu saistība ar respondentu vidējo vecumu CD pacientu paraugos. Stabiņš ar nogriezni – vidējais ar standartnovirzi. P_T – T- testa statistiskā ticamība, η – saistības rādītājs.

Analizējot pacientu iedalījumu pēc vecuma grupām statistiski nozīmīgi ($P_\chi = 2.65 \times 10^{-2}$) atšķiras CD pacientiem ar un bez DNS pārrāvumiem (skat.14.attēlu, 1.pielikums). Šī atšķirība ir ar gandrīz pilnīgu saistību ($V = 0,61$) starp pacientu iedalījuma pēc vecuma un DNS pārrāvumu esamību. Skatot grupu, kurā tika detektēta DĀMF, lielākais skaits ($n=3$) novērojams grupā 31-40 gadu vecumā, pieaugot vecumam, katrā grupā tika detektēti pa diviem paraugiem ar DĀMF, izņemot grupu vecumā 61-70 gadiem.



14.attēls. DNS pārrāvuma ar respondentu vecumu grupu CD pacientu paraugos. P_χ – Crosstaba testa statistiskā ticamība, V – saistības rādītājs.

3.3.2 Saistība ar smēķēšanu

Analizējamā grupā vērojami 20 nesmēķētāji un 20 izbijuši vai esoši smēķētāji. Analizējot iespējamo saistību DNS pārrāvumiem un smēķēšanas faktoru atrasts, ka nav statistiski nozīmīga jeb ticama saistība ($P > 0,05$) ar smēķēšanas faktoru cukura diabēta pacientu grupā. Analizējamā grupā vērojami 20 nesmēķētāji un 20 izbijuši vai esoši smēķētāji. Skatot atsevišķi grupu, kurā tika detektēti DĀMF, vērojams, ka piecos gadījumos pārrāvumi vērojami nesmēķētāju vidū, divi gadījumi indivīdu vidū, kas kādreiz ir smēķējuši un divi tagadējo smēķētāju vidū.

7.tabula. DNS pārrāvumu saistība ar smēķēšanu CD pacientiem.

Rādītāja grupa	DNS pārrāvumi				Statistiskā analīze	
	Nav pārrāvumi		Ir mazi pārrāvumi		P_{χ} vai P_{MV}	V vai η
	Skaitis / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze	Skaitis / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze		
Smēķēšana						
Nekad	15	48,39	5	55,56	1,00	0,06
Tagad smēķē	8	25,81	2	22,22		
Vairs nesmēķē	8	25,81	2	22,22		

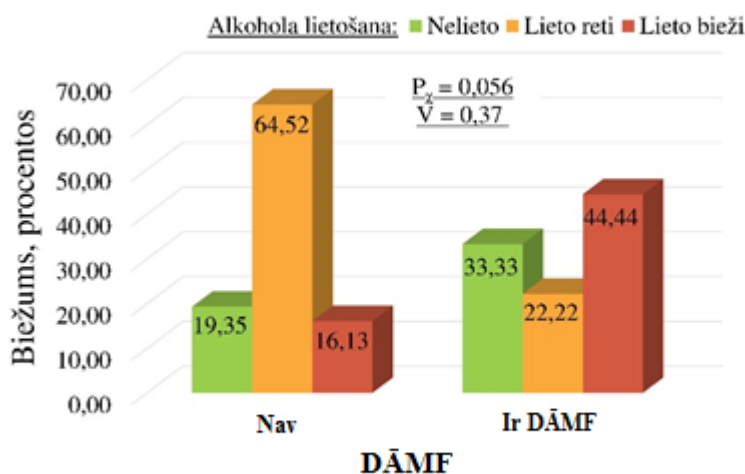
3.3.3 Saistība ar alkohola lietošanu

Analizējot iespējamo saistību DNS pārrāvumiem un alkohola lietošanu, indivīdi tika sadalīti grupās. Pirmā grupa ietver indivīdus, kas nelieto alkoholu vispār, otrā grupa sastāv no indivīdiem, kas alkoholu lieto reti (mazāk par vienu vienību nedēļā), trešā grupa sastāv no indivīdiem, kas alkoholu lieto bieži (vairāk par vienu vienību vairākas reizes nedēļā). Statistiski ticama atšķirība starp pacientu iedalījumu pēc alkohola lietošanas faktora un DNS pārrāvumu esamības, tā ir uz robežas jeb $P_{\chi} = 0,056$ (skat. 15.attēlu). Konkrētā atšķirība ir ar

stipru saistību ($V=0,37$), bet saistības statistiskā ticamība arī ir uz robežas. Tātad iespējams, ka ir atšķirības un saistības tendence, bet to var pārbaudīt, tikai palielinot pacientu grupas.

8.tabula. DNS pārrāvumu saistība ar alkohola lietošanu CD pacientiem.

Rādītāja grupa	DNS pārrāvumi				Statistiskā analīze	
	Nav pārrāvumi		Ir mazi pārrāvumi		P_{χ} vai P_{MV}	V vai η
	Skaitis / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze	Skaitis / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze		
Alkohola lietošana						
Nelieto	6	19,35	3	33,33	0,056	0,37
Lieto reti	20	64,52	2	22,22		
Lieto bieži	5	16,13	4	44,44		



15.attēls. DNS pārrāvumu saistība ar respondentu alkohola lietošanas biežumu CD pacientu paraugos. P_{χ} – Crosstaba testa statistiskā ticamība, V – saistības rādītājs.

3.3.4 Saistība ar ikdienas uztura paradumiem

Tika analizēta iespējamā saistība starp DNS pārrāvumiem un ikdienas uztura paradumiem, ietverot zivi un zivju ēdienus, svaigu dārzeņu, kā arī konditorejas izstrādājumu lietošanu uzturā (skat.2.pielikumu). Katras pārtikas produktu grupas lietošana uzturā tika

sadalītas grupās pēc to lietošanas biežuma – nekad, 1-3 reizes mēnesī, vienu reizi nedēļā, 2-3 reizes nedēļā un 4-6 reizes nedēļā.

Kopumā zivis vai zivju ēdienus uzturā nelieto vispār 6 indivīdi, 1-3 reizes mēnesī 7 indivīdi, bet vismaz vienu reizi nedēļā 17 indivīdi. Pārējie 10 norāda, ka zivju ēdienus lieto biežāk kā reizi nedēļā.

Svaigu dārzeņu lietošanu uzturā 38 no 40 indivīdiem uzrāda 2-3 reizes nedēļā un biežāk, tikai divi svaigu dārzeņu uzturā lieto līdz trīs reizēm mēnesī.

Konditorejas izstrādājumu lietošanas paradumi ir ļoti atšķirīgi. 12 no indivīdiem konditorejas izstrādājumus un saldumus uzturā nelieto vispār savukārt 14 indivīdi 1-3 reizes mēnesī. Pārējie 14 uzrāda konditorejas lietošanu uzturā reizi nedēļā un biežāk.

Analizējot šos faktorus, netika statistiski nozīmīga jeb ticama saistība ($P > 0,05$) DNS pārrāvumiem un ikdienas uztura paradumiem cukura diabēta pacientu grupā.

3.3.5 Saistība ar kafijas lietošanu

Analizējot kafijas lietošanas paradumus un DNS pārrāvumu saistību, pacienti tika iedalīti grupās pēc kafijas lietošanas daudzuma dienā. Pirmo grupu sastādīja indivīdi, kas kafiju nelieto vispār, otro grupu indivīdi, kas lieto līdz 5 tasēm kafijas dienā un trešo grupu sastādīja indivīdi, kas lieto vairāk par piecām tasītēm dienā. Kopumā grupā vidējais kafijas krūzīšu skaits grupā ar DĀMF ir 2.89(sd 3.55), kas ir nedaudz vairāk nekā grupā, kurā netika detektēti DĀMF(2.16 sd 1.64). Skatot analizējamās pa grupām, 7 indivīdi kafiju nelieto vispār, 30 indivīdi, kas sastāda vairākumu, lieto līdz piecām tasītēm kafijas dienā un trīs indivīdi lieto vairāk par piecām tasītēm dienā.

Analizējot iespējamo saistību DNS pārrāvumiem un kafijas lietošanas paradumiem, tika atrasts, ka nav statistiski nozīmīga jeb ticama saistība ($P > 0,05$) ar kafijas lietošanas faktoru cukura diabēta pacientu grupā.

9.tabula. DNS pārrāvumu saistība ar kafijas lietošanu CD pacientiem.

Rādītāja grupa	DNS pārrāvumi				Statistiskā analīze	
	Nav pārrāvumi		Ir DĀMF		P _χ vai P _{MV}	V vai η
	Skaits / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze	Skaits / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze		
Kafijas lietošanas, krūzes dienā						
Krūzes dienā	2,16	1,64	2,89	3,55	1,00	0,14
Kafijas lietošanas, grupa						
Nelieto	6	19,35	1	11,11	1,00	0,11
Līdz 5 krūzēm	23	74,19	7	77,78		
Vairāk kā 5 krūzes	2	6,45	1	11,11		

3.3.6 Saistība ar fizisko aktivitāti

Analizējot fizisko aktivitāti, tika novērtēts fiziskās aktivitātes biežums attiecīgi mazāk par reizi nedēļā, 1-2 reizes nedēļā un vairāk par divām reizēm nedēļā, un fiziskās aktivitātes intensitāte, attiecīgi viegla, mērena vai intensīva. Kopumā pacienti tika iedalīti trīs grupās. Pirmo grupu sastāda mazaktīvi indivīdi, otro grupu mēreni aktīvi un trešo grupu aktīvi indivīdi.

Kopumā skatot, lielākā daļa analizējamo ir mēreni aktīvi vai aktīvi indivīdi, un tikai 7 no visiem ir mazaktīvi. Skatot DĀMF grupu, pārrāvumi biežāk konstatēti mēreni aktīvo indivīdu vidū(n=6).

Analizējot iespējamo saistību DNS pārrāvumiem un fizisko aktivitāti, tika atrasts, ka nav statistiski nozīmīga jeb ticama saistība ($P > 0,05$) ar fiziskās aktivitātes faktoru cukura diabēta pacientu grupā.

10.tabula. DNS pārrāvumu saistība ar fizisko aktivitāti CD pacientiem.

Rādītāja grupa	DNS pārrāvumi				Statistiskā analīze	
	Nav pārrāvumi		Ir mazi pārrāvumi		P _χ vai P _{MV}	V vai η
	Skaits / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze	Skaits / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze		
Fiziskās aktivitātes						
Mazaktīvs	5	16,13	2	22,22	0,24	0,27
Mēreni aktīvs	13	41,94	6	66,67		
Aktīvs	13	41,94	1	11,11		

3.3.7 Saistība ar cukura diabēta komplikācijām

Tika analizēta iespējamā saistība starp DNS pārrāvumiem un cukura diabēta komplikācijām, ietverot CD nefropātiju, CD retinopātiju, CD polineuropātiju (skat. 3. pielikumu).

Cukura diabēta nefropātijas gadījumā tika izdalīta grupa, kurai nefropātija nav, grupa ar mikroalbuminūriju un makroalbuminūriju. Kopumā cukura diabēta nefropātija vērojama 7 no 40 indivīdiem, no kuriem tikai vienam konstatēts DĀMF. Pārējie pārrāvumi konstatēti grupā indivīdiem, kuriem cukura diabēta nefropātija nav.

Cukura diabēta retinopātijas gadījumā pacientu sadalījums grupā ar retinopātiju un grupā bez retinopātijas dalās, attiecīgi 18 indivīdi bez retinopātijas un 22 indivīdi ar retinopātiju. Turklāt, šajā gadījumā vērojams, ka 6 paraugi, kuros konstatēts DĀMF ir pacienti ar cukura diabēta retinopātiju, kas ir divas reizes vairāk, nekā pacientiem bez retinopātijas.

Cukura diabēta polineuropātiju atzīmē 11 indivīdi no 40, starp kuriem tikai vienam konstatēta DĀMF frakcija.

Analizējot šos faktorus, tika atrasts, ka nav statistiski nozīmīga jeb ticama saistība ($P > 0,05$) DNS pārrāvumiem un cukura diabēta komplikācijām.

3.4 Rādītāju salīdzinājums pa grupām

Salīdzinot ITCD pacientu grupu ar kontroles grupu, DNS ātrāk migrējošo fragmentu frakcija tika konstatēta tikai ITCD pacientu grupā. Savukārt, pievienojot pie iepriekš analizētajām grupām kontroles grupu (skat.4. pielikumu), netika konstatēta neviena statistiski nozīmīga atšķirība starp analizētajiem rādītājiem. Tas saistāms ar mazo kontroles paraugu skaitu.

4. DISKUSIJA

Šī darba ietvaros tika veikts pētījums, kurā tika detektēta DNS ātrāk migrējošo fragmentu frakcija, kas norāda uz DNS dubultspirāles pārrāvumiem, kas, savukārt, uzskatāms par vienu no smagākajiem bojājumu veidiem, jo DNS ķēde tiek pilnībā pārrauta. Tās atjaunošana bieži notiek kļūdaini, kas ilgstošākā laika periodā, uzkrājoties DNS reparācijas kļūdām, var izraisīt mutācijas, citostatiskus un citotoksiskus procesus, kas rezultējas patoloģijas attīstībā. DNS integritāti ietekmē ne tikai eksogēni un endogēni patoloģiski faktori, bet arī tādi faktori kā – dzimums, vecums, sports, uztura paradumi u.c.

Kopumā tika analizēti 47 paraugi, no kuriem 9 paraugos tika detektēta DĀMF.

4.1 Saistība ar dzimumu, vecumu un ķermeņa masu

Saistība ar dzimumu. Ir dažādi pētījumu dati par DNS bojājumu saistību ar dzimumu. Noshang ar saviem kolēģiem pētījumos ar žurkām uzrāda, ka DNS bojājumi biežāk vērojami vīriešu dzimuma pārstāvjiem. Hofer ar kolēģiem pētījumā Zviedrijā arī uzrāda augstāku vienpavediena pārrāvumu līmeni vīriešu dzimtas pārstāvjiem, salīdzinot ar sievietēm. Divos čehu pētījumos tiek uzrādīti pretēji rezultāti un DNS bojājumi konstatēti biežāk sievietēm (Slyskova et al., 2011, 2014). Savukārt, Trzeciak pētot vienpavediena pārrāvumus cilvēku populācijā, norāda augstāku DNS bojājumu intensitāti afroamerikāņu populācijā, taču gaišās rases pārstāvjiem bojājumu intensitāte bija vienāda vīriešiem un sievietēm.

Šajā pētījumā DNS dubultspirāles pārrāvumu esamība jeb DĀMF frakcija vērojama divas reizes biežāk vīriešiem (n=6) nekā sievietēm (n=3). Grupu, kurā netika detektēta DĀMF frakcija, sastāda 22 sievietes un 9 vīrieši, kopumā par abām grupām sastādot 15 vīriešu dzimtas pārstāvjus un 25 sievietes. Ņemot vērā dažādos pētījumu rezultātus, viennozīmīgi nevaram izdarīt secinājumus par vīriešu dzimumu, kā riska faktoru uz DNS dubultspirāles pārrāvumu attīstību. Tomēr, ņemot vērā, ka pētījumā tika iesaistīti stipri mazāk vīriešu, nekā sieviešu, kopējais DĀMF frakcijas īpatsvars vīriešiem ir novērojams.

Saistība ar vecumu. Daudzi pētījumi norāda, ka DNS bojājumu intensitāte pieaug līdz ar vecumu, kas saistāms ar novecošanas procesu un mutāciju uzkrāšanos. Pētījumos ar žurkām, atrasta saistība DNS bojājumu intensitātes pieaugumam, salīdzinot žurkas dažu mēnešu vecumā ar žurkām, kuru vecums ir lielāks (Sahugi et al., 2014). DNS vienpavediena un divpavediena pārrāvumu intensitāte pieaug arī astrocītos un neironos (Swain et al., 2011).

Līdzīga atradne arī aknu un nieru audos, pētot vecas žurkas, taču šeit netika konstatēti DNS dubultspirāles pārrāvumi. Liela nozīme novecošanās procesā un pārrāvumu attīstībā ir reparācijas enzīmu darbībai, vecāka gada gājuma cilvēkiem konstatēta neefektīva pārrāvumu reparācija un samazināta enzīmu ekspresija, kas iesaistīti reparācijas procesā (Li Z et al., 2016). Kopumā pētījumu rezultāti ir dažādi, kamēr daži autori uzrāda bojājumu saistību ar vecumu, tikmēr citi atzīmē samazinātu vai stabilu DNS bojājumu līmeni (Collins et al., 2012).

Šajā pētījumā DĀMF uzrādās indivīdu grupā, sākot no 30 gadu vecumu, nevienam, jaunākam par 30 gadiem šī frakcija netika detektēta. Vidējais vecums statistiski nozīmīgi ($P_{\chi} = 4,81 \times 10^{-2}$) atšķiras CD pacientiem ar un bez DNS pārrāvumiem (6.attēls). Šī atšķirība ir ar stipru saistību ($V = 0,31$) starp vidējo vecumu un DNS pārrāvumu esamību. Grupā, kurā detektēta DĀMF frakcija, vidējais vecums ir 50.78(SD 15.48) gadi, taču grupā bez DĀMF 39.58(SD 14.20) gadi.

Varam domāt, ka saistība DNS dubultspirāles pārrāvumiem un vecumu ir, taču nevaram spriest, vai, pieaugot vecumam, pieaug pārrāvumu līmenis, jo šajā darbā netika kvantificēts DNS pārrāvumu līmenis.

Saistība ar ķermeņa masu. Kopumā pētījumi uzrāda saistību starp adipozītāti un DNS bojājumu līmeni. Pētījumos ar žurkām pierādījās, ka kaloriju ierobežošana samazināja DNS vienpavediena un divpavedienu pārrāvumu līmeni (Molz et al., 2016; Bankoglu et al., 2016), tomēr pastāv arī pieņēmums, ka iespējams, aptaukošanās ir sekas nevis iemesls (Sampath et al., 2012). Populāciju pētījumos dati atšķiras. Ir pētījumi, kuros bojājumu detektēti vairāk sievietēm ar lieko svaru, salīdzinājumā ar sievietēm bez liekā svara, turpretim atšķirība nav novērota vīriešu starpā (Hofer et al., 2006). Ķirurģijas laikā iegūto adipocītu analīze uzrādīja vienādu līmeni (Jones et al., 2014). Citi autori uzrāda DNS bojājuma līmeņa pieaugumu metabolā sindroma pacientiem (Donmez-Altuntas et al., 2014). Dubultspirāles pārrāvumu analīze pieaugušiem indivīdiem ar aptaukošanos, salīdzinājumā ar bērniem bez aptaukošanās, uzrāda sešas reizes augstāku līmeni (Azzara et al., 2016), tāpat arī tiek minēts paaugstināts DNS dubultspirāļu pārrāvums spermatoocītos vīriešiem ar aptaukošanos (Dupont et al., 2013).

Šajā pētījumā tika iedalīti grupās pēc to aprēķinātā ĶMI un detektējot DĀMF netika novērotas krasas atšķirības starp grupām, tieši pretēji pētījumiem, DĀMF nedaudz vairāk($n=4$) tika konstatēti indivīdiem ar normālu ĶMI, kas samazinās pretējā virzienā – grupā ĶMI virs 35 sastādot divas reizes mazāk($n=2$). Ņemot vērā šos rezultātus, nevar norādīt uz aptaukošanās kā iemeslu DNS dubultspirāles pārrāvumu attīstībai, taču nevar izslēgt DNS pārrāvumu, kā cēloni aptaukošanās attīstībai, piemēram, kombinācijā ar citiem faktoriem.

Tāpat arī pēc KMI nav iespējams spriest par centrālu aptaukošanos, kā arī muskuļu masas un tauku masas attiecību indivīda organismā.

Grupu, kurā netika konstatēta DĀMF frakcija 18 no iesaistītajiem indivīdiem ir ar normālu ķermeņa masas indeksu, un 13 ar KMI virs normas (virs 24.9). Taču nevaram spriest, vai paaugstinātais KMI skaidrojams ar aptaukošanos vai muskuļu masas attiecību ķermenī.

4.2 Saistība ar kaitīgiem paradumiem

Alkohola lietošana. Izvērtējot pacientu alkohola lietošanas paradumus un DĀMF esamību, konstatējam, ka DĀMF biežāk novērojama indivīdu grupā, kas alkoholu lieto bieži (vairākas vienības vairākas reizes nedēļā; $n=4$), salīdzinājumā ar indivīdiem, kas alkoholu lieto reti ($n=2$). Turpretim, DĀMF frakcija tomēr konstatēta arī indivīdu grupā, kas alkoholu nelieto nemaz. Statistiski ticama atskirība ir uz robežas ($P\chi = 0,056$), bet saistības tendenci iespējams novērtēt, šajā gadījumā, tikai palielinot pacientu grupas. Grupā, kas alkoholu nelieto nemaz DĀMF frakcija veidojas, iespējams, citu faktoru vai faktoru kombināciju rezultātā, kā arī nav iespējams novērtēt indivīdu līdzestību korektu atbilžu sniegšanā, anketēšanas laikā. Grupā, kurā netiek detektēta DĀMF frakcija, 25 no respondentiem alkoholu lieto, no kuriem pieci atzīmē alkohola lietošanu bieži. Tikai seši respondenti šajā grupā alkoholu nelieto nemaz. Redzot šo tendenci alkohola lietošanas paradumos, tas ņemams vērā kā viens no faktoriem, kas tieši vai kombinācijā ar citiem faktoriem var ierosināt DNS dubultspirāles pārrāvumu veidošanos.

Smēķēšana. Grupā, kurā netika detektēta DĀMF frakcija, bijušie vai tagadējie smēķētāji sastāda aptuveni pusi no respondentiem, tātad kopumā smēķēšanas faktors ir aktuāls un vērā ņemams kaitīgais ieradums populācijā. Smēķēšanas faktors šajā pētījumā neuzrāda tendenci DĀMF frakcijas attīstībā. DĀMF frakcija konstatēta vienlīdz bieži kā nesmēķētāju, tā esošo un bijušo smēķētāju vidū. Taču nevar izslēgt šī faktora ietekmi kombinācijā ar citiem faktoriem uz DNS bojājumu attīstību.

4.3 Saistība ar uztura paradumiem un fizisko aktivitāti

Uztura paradumi. Analizējot iespējamo uztura ietekmi (piemēram, dārzeņu lietošanu uzturā) uz DĀMF frakcijas attīstību, netiek konstatēta saistība. Frakcija veidojas neatkarīgi no literatūras aprakstā aprakstītiem uztura paradumiem, kas spēj inducēt vai novērst DNS

bojājuma rašanos. Kopumā analizējamo respondentu vidū novērotās uztura tendences: nedaudz vairāk par pusi respondentu zivju ēdienus vai zivi lieto uzturā vismaz vienu reizi nedēļā, 10-20% no respondentiem zivi uzturā nelieto nemaz. Svaigu dārzeņu lietošanu uzturā atzīmē 1-3 reizes mēnesī 6% no respondentiem, pārējie 94% svaigus dārzeņus uzturā lieto vairākas reizes nedēļā. Saldumu un konditorejas izstrādājumu izslēgšanu no uztura atzīmē 30% respondentu, pārējie saldumus un konditorejas izstrādājumus lieto no dažām reizēm mēnesī līdz pat vairākām reizēm nedēļā(6-10%).

Kafijas lietošana. Analizējot kafijas lietošanas paradumus un DĀMF frakcijas, konstatēju, ka frakcija novērojama biežāk kafijas lietotājiem, salīdzinājumā ar indivīdiem, kas kafiju nelieto. Turpretim, salīdzinot kafijas lietošanas paradumus starp grupu, kurā nav detektēta DĀMF ar grupu, kurā ir detektēta DĀMF, kafijas lietošanas paradumi krasi neatšķiras. Šis varētu būt skaidrojams ar sarēžģīto kofeīna darbību cilvēka organismā, kas kombinējoties dažādiem faktoriem var izraisīt gan stresa veidošanos un sekojoši DNS bojājumu attīstību, kā arī inhibējošo iedarbību oksidatīvā stresa apstākļos. Šī pētījuma rezultāti neapstiprina pētījumos aprakstīto kofeīna iespējamo antioksidanta darbību, kombinējot to ar oksidatīvā stresa apstākļiem(Lee, et al, 2000; Noschang et al.,2009), pieņemot, ka šajā pētījumā pētāmās indivīdu grupas organisms ir pakļauts stresa apstākļiem, kā autoimūnas saslimšanas gadījumā, sagaidījām, ka kafijas lietošana ikdienas uzturā varētu teorētiski samazināt DNS dubultspirāles pārrāvumu veidošanos.

Fiziskā aktivitāte. Statistiski ticamu saistību starp indivīdu fizisko slodzi un DNS pārrāvumu esamību netika konstatēta. Ņemot vērā pētījumus, tika sagaidīts, ka DMĀF frakcija teorētiski varētu uzrādīties intensīvas un ilgstošas slodzes piekritējiem (Ryu et al., 2016; Gray et al., 2014). Taču šajā pētījumā lielākais īpatsvars DMĀF frakcijas uzrādās tieši mēreni aktīvo indivīdu vidū. Kopumā respondentu vidū lielāko īpatsvaru sastāda mēreni aktīvi(41%) un aktīvi respondenti(aptuveni 41%).

4.4 Saistība ar autoimūnu slimību

Šajā pētījumā tika analizēti 40 ITCD paraugi un 7 paraugi indivīdiem, kuriem nav glikozes tolerances traucējumu. Ņemot vērā pētījumu rezultātus, ir zināms, ka slimība un tās komplikācijas attīstās arī par spīti korektai glikēmijas kontrolei un insulīna terapijai(Steffes et al., 2003). Tāpat arī AGEs veidošanās cukura diabēta gadījumā var ne tikai var ierosināt DNS pārrāvumus, bet arī ierosina DNS bāžu oksidāciju, kā rezultātā pastiprināti veidojas 8OHdG

(Pazdro et al., 2012). Hiperinsulinēmija kā DNS pārrāvumu izraisošs faktors vēl tiek pētīts, taču ir zināms, ka tas ierosina DNS bāžu oksidāciju un veicinot ROS veidošanos (Othman et al., 2013).

Kopumā šajā pētījumā detektētā DĀMF frakcija tika konstatēta tikai 1TCD pacientu grupā, kas sakrīt ar iepriekš minēto pētījumu rezultātiem, kuros rasta saistība starp dažādiem stāvokļiem cukura diabēta gadījumā un DNS bojājumiem. Taču nevaram apgalvot, ka autoimūna slimība ir iemesls DNS dubultspirāles pārrāvumiem, mazās kontroles grupas paraugu skaita dēļ.

Cukura diabēta komplikāciju gadījumā – nefropātijas un polineuropātijas esamība nenorāda uz iespējamu saistību ar DMĀF, katrā iepriekšminētajā konstatēts viens paraugs ar DNS dubultspirāles pārrāvumiem, kas liek domāt par citu faktoru vai faktoru kombināciju iedarbību.

Kopumā analizējot, diabētiskās nefropātijas, diabētiskās polineuropātijas un diabētiskās retinopātijas saistību netika atrasta statistiski nozīmīga jeb ticama saistība ($P > 0,05$) DNS pārrāvumiem un cukura diabēta komplikācijām. Taču diabētiskās retinopātijas gadījumā DĀMF frakcija konstatēta divas reizes vairāk nekā indivīdu grupā bez diabētiskās retinopātijas. Hong Zhi Pan savā pētījumā apraksta, ka cukura diabēta gadījumā pacientiem ar diabētisko retinopātiju konstatēts augstāks 8-OHdG un paaugstinātu oksidācijas proteīnu līmenis, kas norāda uz DNS bojājumu (Pan et al., 2007).

SECINĀJUMI

1. Pulsējošā lauka elektroforēze kombinācijā ar iegūto gēlu apstrādes programmu ļauj novērtēt cilvēka limfocītu DNS fragmentu sadali.
2. Liela mēroga DNS fragmentu sadale cilvēku limfocītos atšķiras starp indivīdiem – tiek vai netiek detektēti DNS ātrāk migrējošie fragmenti.
3. DNS dubultspirāles pārrāvumiem ir saistība ar dzimumu un vecumu. Vīriešiem pārrāvumi tiek detektēti divas reizes biežāk nekā sievietēm. Vidējais vecums DĀMF grupā ir lielāks nekā grupā, kurā netika konstatēti DĀMF 50.78(SD 15.48) gadi, taču grupā bez DĀMF 39.58(SD 14.20) gadi.
4. DNS dubultspirāles pārrāvumiem ir saistība ar alkohola lietošanu. Indivīdiem, kas alkoholu lieto bieži, DĀMF tiek detektēta divas reizes biežāk nekā indivīdiem, kas alkoholu patērē mazāk.
5. DNS dubultspirāles pārrāvumiem ir saistība ar autoimūnu slimību, visi paraugi, kuriem tika detektēta DĀMF sastāda 1TCD pacienti. Kontroles grupā DNS dubultspirāles pārrāvumi netika konstatēti.
6. Kopumā, izvērtējot rezultātus, secinu, ka DNS dubultspirāles pārrāvumu attīstība ir saistāma ar dažādu faktoru mijiedarbību un kombināciju. Riska grupā ir vīriešu dzimuma pārstāvji, indivīdi, kuri lieto alkoholu un pacienti ar fonā esošo autoimūnu patoloģiju.
7. DNS dubultspirāles pārrāvumu, kā vienu no citotoksiskāko pārrāvumu veidiem, pētījumi noteikti ir jāturpina, palielinot pētāmo grupu un analizējot faktorus, kas var darboties kā ierosinātāji bojājumam.

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību Dr.Med.Evitai Rostokai par pētījuma vadīšanu, kā arī „LatDiane” projekta koordinatorei, Latvijas Organiskās sintēzes institūta pētniecei, ārstei Jeļizavetai Sokolovskai par sniegtajām konsultācijām un iespēju piedalīties šajā projektā. Pateicos Dr.habil.biol.,prof. Nikolajam Sjakstem par palīdzību un sniegtajām konsultācijām darba izstrādes procesā. Īpaši pateicos LU MBI pētniekam Dr. biol. Jānis Liepiņam par rauga šūnu audzēšanu. Tāpat arī pateicos pārējiem kolēģiem un „LatDiane” projekta pētniekiem par ieguldījumu klīniskajā darbā.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. A.B. Miller, F. Berrino, M. Hill, P. Pietinen, E. Riboli, J. Wahrendorf, Diet in the aetiology of cancer: a review, *Eur. J. Cancer*. 30A (1994) 207–220.
2. Azvolinsky, A., Giresi, P. G., Lieb, J. D., & Zakian, V. A. (2009). Highly transcribed RNA polymerase II genes are impediments to replication fork progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 34, 722–734.
3. Azzarà A, Pirillo C, Giovannini C, Federico G, Scarpato R. Different repair kinetic of DSBs induced by mitomycin C in peripheral lymphocytes of obese and normal weight adolescents. *Mutat Res*. 2016;789:9–14.
4. B.M. Sutherland, P.V. Bennett, N.S. Cintron, P.Guida, J. Laval, LOW levels of endogenous oxidative damage cluster levels unirradiated viral and human DNAs, *Free Radical Biol. Med.* 35 (2003) 495-503.
5. Bankoglu EE, Seyfried F, Rotzinger L, Nordbeck A, Corteville C, Jurowich C, Germer CT, Otto C, Stopper H. Impact of weight loss induced by gastric bypass or caloric restriction on oxidative stress and genomic damage in obese Zucker rats. *Free Radic Biol Med*. 2016;94:208–17.
6. Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., Sehested, M., Nesland, J. M., Lukas, C., Orntoft, T., Lukas, J., & Bartek, J. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434, 864–870.
7. Beeharry N, Lowe JE, Hernandez AR, Chambers JA, Fucassi F, Cragg PJ, et al. Linoleic acid and antioxidants protect against DNA damage and apoptosis induced by palmitic acid. *Mutat Res* 2003;530:27-33.
8. Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813–820.
9. Cadet, J., Berger, M., Douki, T., & Ravanat, J. L. (2006). Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 131,1–87.
10. Collins AR, Azqueta A. DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. *Mutat Res*. 2012;736(1–2):122–9.
11. Cristie Grazziotin Noschang , Leticia Ferreira Pettenuzzo , Eduardo von Pozzer Toigo, Ana Cristina Andrezza , Rachel Krolow , Andrelisa Fachin, Mônica Colpini Ávila , Danusa Arcego , Leonardo Machado Crema , Luísa Amália Diehl , Carlos Alberto Gonçalves , Deusa Vendite, Carla Dalmaz. Sex-specific differences on caffeine consumption and chronic stress-induced anxiety-like behavior and DNA breaks in the hippocampus. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. Elsevier. 94 (2009) 63–69

12. da Costa, L. T., Liu, B., El-Deiry, W. S., Hamilton, S. R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Markowitz, S., Willson, J. K. V., de la Chapelle, A., Downey, K. M., & So, A. G. (1995). Polymerase [delta] variants in RER colorectal tumours. *Nat Genet* 9, 10–11.
13. Donmez-Altuntas H, Sahin F, Bayram F, Bitgen N, Mert M, Guclu K, Hamurcu Z, Aribas S, Gundogan K, Diri H. Evaluation of chromosomal damage, cytostasis, cytotoxicity, oxidative DNA damage and their association with body-mass index in obese subjects. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014;771:30–6.
14. Dupont C, Faure C, Sermondade N, Boubaya M, Eustache F, Clément P, Briot P, Berthaut I, Levy V, Cedrin-Durnerin I, Benzacken B, Chavatte-Palmer P, Levy R. Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J Androl*. 2013;15(5):622–5.
15. Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A. G., & Panayiotidis, M. I. (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* 266, 6–12.
16. Friedberg, E. C., & Gerlach, V. L. (1999). Novel DNA polymerases offer clues to the molecular basis of mutagenesis. *Cell* 98, 413–416.
17. Habib SL, Phan MN, Patel SK, Li D, Monks TJ, Lau SS. Reduced constitutive 8-oxoguanine-DNA glycosylase expression and impaired induction following oxidative DNA damage in the tuberlin deficient Eker rat. *Carcinogenesis* 2003;24:573-82.
18. Hofer T, Karlsson HL, Möller L. DNA oxidative damage and strand breaks in young healthy individuals: a gender difference and the role of life style factors. *Free Radic Res*. 2006;40(7):707–14
19. Hofer T, Karlsson HL, Möller L. DNA oxidative damage and strand breaks in young healthy individuals: a gender difference and the role of life style factors. *Free Radic Res*. 2006;40(7):707–14.
20. J.D. Potter, Colorectal cancer: molecules and populations, *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (1999) 916–932.
21. Jae Hoon Ryu, Il Young Paik, Jin Hee Woo, Ki Ok Shin, Su youn Cho, Hee Tae Roh. Impact of different running distances on muscle and lymphocyte DNA damage in amateur marathon runners. *J. Phys. Ther. Sci.* 28: 450–455, 2016
22. Jones DA, Prior SL, Barry JD, Caplin S, Baxter JN, Stephens JW. Changes in markers of oxidative stress and DNA damage in human visceral adipose tissue from subjects with obesity and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;106(3):627–33.
23. Kazutetsu Aoshiba, Fang Zhou, Takao Tsuji, Atsushi Nagai. DNA damage as a molecular link in the pathogenesis of COPD in smokers. *Eur Respir J* 2012; 39: 1368–1376
24. Li Z, Zhang W, Chen Y, Guo W, Zhang J, Tang H, Xu Z, Zhang H, Tao Y, Wang F, Jiang Y, Sun FL, Mao Z. Impaired DNA double-strand break repair contributes to the age-associated rise of genomic instability in humans. *Cell Death Differ*. 2016;23(11):1765–77.

25. M.D. Gammon, R.M. Santella, A.I. Neugut, S.M. Eng, S.L. Teitelbaum, A. Paykin, B. Levin, M.B. Terry, T.L. Young, L.W. Wang, Q. Wang, J.A. Britton, M.S. Wolff, S.D. Stellman, M. Hatch, G.C. Kabat, R. Senie, G. Garbowski, C. Maffeo, P. Montalvan, G. Berkowitz, M. Kemeny, M. Citron, F. Schnabel, A. Schuss, S. Hajdu, C. Vinceguerra, Environmental toxins and breast cancer on Long Island. I. Polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11 (2002) 677–685
26. M.S. Cooke, N. Mistry, C.Wood, K.E.Herbert, J.Lunec. Immunogenicity of DNA damaged by reactive oxygen species – implications for anti-DNA antibodies in lupus, *Free Radical. Biol. Med.* 22. 151-159. (1997)
27. Maahs, D. M. & Rewers, M. Editorial: mortality and renal disease in type 1 diabetes mellitus—progress made, more to be done. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 3757–3759 (2006).
28. Maffei, F., Fimognari, C., Castelli, E., Stefanini, G. F., Forti, G. C. and Hrelia, P. (2000) Increased cytogenetic damage detected by FISH analysis on micronuclei in peripherallymphocytes from alcoholics. *Mutagenesis*, 15, 517–523.
29. Miyakoshi J., Yoshuda M., et al. (2000). Exposure to strong magnetic field at power frequency potentiates X-ray-induced DNA strand breaks. *J. Radiat. Res.*, 41,293-302.
30. Miral Dizdaroglu, Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease, *Cancer Letters*, Volume 327, Issues 1–2, 31 December 2012, Pages 26–47.
31. Molz P, Ellwanger JH, Zenkner FF, Campos D, Prá D, Putzke MT, Franke SI. Recognition memory and DNA damage in undernourished young rats. *An Acad Bras Cienc.* 2016;88(3 Suppl):1863–73.
32. Montecucco, A., & Biamonti, G. (2007). Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett* 252, 9–18.
33. O. Vladimirova, J.O’Conor, A.Cahill, H.Alder,C.Butunoi.,B.Kalman. Oxidative damage to DNA in plaques of MS bramins. *Mult.Scler.* 4. 413-418. 1998.
34. P. Regulus, B. Duroux, P.A. Bayle, A. Favier, J. Cadet, J.L. Ravanat, Oxidation of the sugar moiety of DNA by ionizing radiation or bleomycin could inducē the formation of a cluster DNA lesion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 14032 – 14037.
35. Pazdro R, Burgess JR. Differential effects of a-tocopherol and N-acetyl-cysteine on advanced glycation end product-induced oxidative damage and neurite degeneration in SH-SY5Y cells. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:550-6.
36. Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., & Marchand, C. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol* 17, 421–433.
37. R.K Brown, A. McBurney, J.Lunec, F.J.Kelly. Oxidative damage to DNA in patients with cystic fibrosis, *Free Radical Biol. Med.* 18. 801-806. 1995

38. Regulus, P., Duroux, B., Bayle, P. A., Favier, A., Cadet, J., & Ravanat, J. L. (2007). Oxidation of the sugar moiety of DNA by ionizing radiation or bleomycin could induce the formation of a cluster DNA lesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 14032–14037
39. Rinne De Bont, Nik van Larebeke. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 2004-05-01
40. Sahnugi Z, Hasenan SM, Jubri Z. Protective effects of gelam honey against oxidative damage in young and aged rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:673628.
41. Sampath H, Vartanian V, Rollins MR, Sakumi K, Nakabeppu Y, Lloyd RS. 8-Oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) deficiency increases susceptibility to obesity and metabolic dysfunction. *PLoS One.* 2012;7(12):e51697.
42. Schwartz, D.C. et al. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 47 (Part 1): 189–195 (1983).
43. Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Rivière J, Calmard P, Garcia I, et al. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta* 2002;321:89-96.
44. Shao Chin Lee, Juliana CN Chan. Evidence for DNA damage as a biological link between diabetes and cancer. *Chinese Medical Journal.* Volume 128. Issue 11. June 5, 2015.
45. Shao Jun. DNA Chemical Damage and Its Detected. *International Journal of Chemistry.* Vol. 2, No. 2; August 2010.
46. Shweta Bhatt, Manoj K. Gupta, Mogher Khamaisi, ..., Wei-Jun Qian, George L. King, Rohit N. Kulkarni. Preserved DNA Damage Checkpoint Pathway Protects against Complications in Long-Standing Type 1 Diabetes. *Cell Metabolism* 22, 239–252 August 4, 2015 Elsevier Inc.
47. Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22, 7265–7279.
48. Simone S, Gorin Y, Velagapudi C, Abboud HE, Habib SL. Mechanism of oxidative DNA damage in diabetes: Tuberin inactivation and downregulation of DNA repair enzyme 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine-DNA glycosylase. *Diabetes* 2008;57:2626-36.
49. Syv oja, J., Suomensaaari, S., Nishida, C., Goldsmith, J. S., Chui, G. S., Jain, S., & Linn, S. (1990). DNA polymerases alpha, delta, and epsilon: Three distinct enzymes from HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 6664–6668.
50. Sliwinska A, Blasiak J, Kasznicki J, Drzewoski J. In vitro effect of gliclazide on DNA damage and repair in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). *Chem Biol Interact* 2008;173:159-65.
51. Slyskova J, Lorenzo Y, Karlsen A, Carlsen MH, Novosadova V, Blomhoff R, Vodicka P, Collins AR. Both genetic and dietary factors underlie individual differences in DNA damage levels and DNA repair capacity. *DNA Repair (Amst).* 2014;16:66–73.

52. Slyskova J, Naccarati A, Polakova V, Pardini B, Vodickova L, Stetina R, Schmuczerova J, Smerhovsky Z, Lipska L, Vodicka P. DNA damage and nucleotide excision repair capacity in healthy individuals. *Environ Mol Mutagen*. 2011;52(7):511–7.
53. Soto AM, Sonnenschein C. One hundred years of somatic mutation theory of carcinogenesis: Is it time to switch? *Bioessays* 36:118-20. (2014)
54. Steffes, M.W. et al. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study. *J. Am. Med. Assoc.* 290,2159-2167.(2003).
55. Stopper H, Schinzel R, Sebekova K, Heidland A. Genotoxicity of advanced glycation end products in mammalian cells. *Cancer Lett* 2003;190:151-6.
56. Swain U, Subba Rao K. Study of DNA damage via the comet assay and base excision repair activities in rat brain neurons and astrocytes during aging. *Mech Ageing Dev*. 2011;132(8–9):374–81.
57. Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin Liver Dis*. 2007 Nov;27(4):339-50
58. T Lindahl, B Nyberg. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*. Washington. 1972-09-12
59. Tatsch E, Bochi GV, Piva SJ, De Carvalho JA, Kober H, Torbitz VD, et al. Association between DNA strand breakage and oxidative, inflammatory and endothelial biomarkers in type 2 diabetes. *Mutat Res* 2012;732:16-20.
60. Trzeciak AR, Barnes J, Ejiogu N, Foster K, Brant LJ, Zonderman AB, Evans MK. Age, sex, and race influence single-strand break repair capacity in a human population. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(12):1631– 41.
61. Vauzelle-Kervroedan, F. et al. Analysis of mortality in French diabetic patients from death certificates: a comparative study. *Diabete Metab*. 25, 404–411 (1999).
62. Xi ZG, Chao FH, Yang DF, Sun YM, Li GX, Zhang HS, Zhang W, Yang YH, Liu HL. The effects of DNA damage induced by acetaldehyde. 2004 May;25(3):102-5.
63. Zhang, C. C., Yang, J. M., Bash-Babula, J., White, E., Murphy, M., Levine, A. J., & Hait, W. N. (1999). DNA damage increases sensitivity to vinca alkaloids and decreases sensitivity to taxanes through p53-dependent repression of microtubule-associated protein 4. *Cancer Res* 59, 3663–3670.

PIELIKUMI

DNS pārrāvumu saistība ar vecumu CD pacientiem

Rādītāja grupa	DNS pārrāvumi				Statistiskā analīze	
	Nav DĀMF		Ir DĀMF			
	Skaitis / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze	Skaitis / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze	P_{χ} vai P_T	V vai η
Vecums, gadi						
Gadi	39,58	14,20	50,78	15,48	$4,81 \times 10^{-2}$	0,31
Vecuma grupa						
Līdz 20 gadiem	2	6,45	0	0,00	$2,65 \times 10^{-2}$	0,61
No 21 līdz 30 gadiem	8	25,81	0	0,00		
No 31 līdz 40 gadiem	7	22,58	3	33,33		
No 41 līdz 50 gadiem	9	29,03	2	22,22		
No 51 līdz 60 gadiem	1	3,23	2	22,22		
No 61 līdz 70 gadiem	4	12,90	0	0,00		
No 71 līdz 80 gadiem	0	0,00	2	22,22		

DNS pārrāvumu saistība ar ikdienas uztura paradumiem CD pacientiem.

Rādītāja grupa	DNS pārrāvumi				Statistiskā analīze	
	Nav DĀMF		Ir DĀMF		P _χ vai P _{MV}	V vai η
	Skaitis / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze	Skaitis / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze		
Zivs vai zivju ēdienu lietošana uzturā						
Nekad	5	16,13	1	11,11	1,00	0,14
1 – 3x mēnesī	6	19,35	1	11,11		
1x nedēļā	13	41,94	4	44,44		
2 – 3x nedēļā	5	16,13	2	22,22		
4 – 6x nedēļā	2	6,45	1	11,11		
Svaigu dārzeņu lietošanā uzturā						
Nekad	0	0,00	0	0,00	0,13	0,31
1 – 3x mēnesī	2	6,45	0	0,00		
1x nedēļā	0	0,00	0	0,00		
2 – 3x nedēļā	7	22,58	5	55,56		
4 – 6x nedēļā	22	70,97	4	44,44		
Konditorejas izstrādājumu lietošana uzturā						
Nekad	9	29,03	3	33,33	0,79	0,23
1 – 3x mēnesī	10	32,26	4	44,44		
1x nedēļā	5	16,13	1	11,11		
2 – 3x nedēļā	5	16,13	0	0,00		
4 – 6x nedēļā	2	6,45	1	11,11		

DNS pārrāvumu saistība ar cukura diabēta komplikācijām

Rādītāja grupa	DNS pārrāvumi				Statistiskā analīze	
	Nav DĀMF		Ir DĀMF		P _χ vai P _T vai P _M v	V vai η
	Skaitis / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze	Skaitis / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze		
CD nefropātija						
Nav	25	80,65	8	88,89	0,29	0,24
Mikro-albuminūrija	1	3,23	1	11,11		
Makro-albuminūrija	5	16,13	0	0,00		
CD retinopātija						
Nav	15	48,39	3	33,33	0,48	0,13
Ir	16	51,61	6	66,67		
CD polineuropātija						
Nav	21	67,74	8	88,89	0,40	0,20
Ir	10	32,26	1	11,11		

Cukura diabēta pacientu ar un bez DNS pārrāvumu un kontroles grupas salīdzināšana.

Rādītāja grupa	Grupa						Statistiskā analīze	
	CD_Nav DĀMF		CD_Ir DĀMF		Kontrole		Pχ vai PMV	V vai η
	Skaitis / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze	Skaitis / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze	Skaitis / vidējais	Biežums,% / Standartnovirze		
Dzimums								
Vīrietis	22	70,97	3	33,33	4	57,14	0,08	0,33
Sieviete	9	29,03	6	66,67	3	42,86		
Vecums, gadi								
Gadi	39,58	14,20	50,78	15,48	33,71	16,24	0,06	0,35
Vecums, grupa								
Līdz 20 gadiem	2	6,45	0	0,00	0	0,00	0,07	0,48
No 21 līdz 30 gadiem	8	25,81	0	0,00	4	57,14		
No 31 līdz 40 gadiem	7	22,58	3	33,33	1	14,29		
No 41 līdz 50 gadiem	9	29,03	2	22,22	1	14,29		
No 51 līdz 60 gadiem	1	3,23	2	22,22	0	0,00		
No 61 līdz 70 gadiem	4	12,90	0	0,00	1	14,29		
No 71 līdz 80 gadiem	0	0,00	2	22,22	0	0,00		

gadiem										
ĶMI										
Vērtība	25,07	3,45	25,71	3,87	22,93	3,60	0,27	0,24		
ĶMI										
Zem 25	18	58,06	4	44,44	6	85,71	0,30	0,21		
Norma	10	32,26	3	33,33	0	0,00				
Virš 35	3	9,68	2	22,22	1	14,29				
Vidukļa apkārtmērs, cm										
cm	83,03	9,97	86,78	11,12	78,14	8,84	0,24	0,25		
Gurnu apkārtmērs, cm										
cm	102,16	6,83	99,56	13,12	99,57	6,71	0,60	0,15		
SAS										
mm HG	124,89	15,78	135,00	-	120,71	13,67	0,64	0,19		
DAS										
mm HG	78,21	9,93	75,00	-	72,14	8,09	0,36	0,28		
AH										
Nav	16	51,61	3	33,33	6	85,71	0,13	0,31		
Ir	15	48,39	6	66,67	1	14,29				
Smēķēšana										
Nekad	15	48,39	5	55,56	5	71,42	0,95	0,12		
Tagad smēķē	8	25,81	2	22,22	1	14,29				
Vairs nesmēķē	8	25,81	2	22,22	1	14,29				

