ZNACZENIE PROCESÓW NAPRAWY DNA ORAZ POLIMORFIZMÓW GENÓW MECHANIZMU WYCINANIA ZASAD AZOTOWYCH: *OGG1, XRCC1, MUTYH, ADPRT, APE1* W PATOGENEZIE NEUROPATII CUKRZYCOWEJ

Mgr Anna Merecz
PROMOTOR: prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek

Neuropatia cukrzycowa to przewlekłe powikłanie, które występuje u 10-90% chorych ze zdiagnozowaną cukrzycą. Patomechanizm powstawania tego schorzenia jest złożony i nie do końca poznany. Rozważa się istotny wpływ stresu oksydacyjnego na uszkodzenia nerwów oraz utratę ich funkcji. Stres oksydacyjny zaburzenie równowagi pomiędzy generacją reaktywnych form tlenu (RFT), a zdolnościami antyoksydacyjnymi organizmu. Zwiększony poziom cukru we krwi jest jedną z przyczyn ich nadmiernej produkcji poprzez intensyfikację procesów wytwarzania rodników tlenowych w procesie nieenzymatycznej glikacji białek, nasilenia przemian glukozy w cyklu poliolowym, zwiększonego powstawania diacyloglicerolu i aktywacji białkowej kinazy C oraz aktywności polimerazy poli (ADP-rybozy). Nadmiar RFT powoduje uszkodzenia wszystkich składników komórki; białek, lipidów, węglowodanów oraz DNA, a w konsekwencji indukcję procesu apoptozy.

W pracy poddano analizie 140 pacjentów z cukrzycą typu 2 (T2DM), 130 z cukrzycą powikłaną neuropatią (T2DM/DSPN) oraz 190 osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej stanowiących grupę kontrolną. Typowe dla cukrzycy typu 2 oksydacyjne modyfikacje DNA takie jak 8-okso-guaniana (8-okso-G), usuwane są głównie w mechanizmie naprawy przez wycinanie zasad (BER). W związku z tym w pracy przy użyciu metody PCR-RFLP (ang. *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) analizowano warianty polimorficzne następujących genów: 326 Ser/Cys OGG1, 194 Arg/Trp XRCC1, 399 Arg/Gln XRCC1, 726 Val/Ala ADPRT, 324 His/Glu MUTYH i 148 Asp/Glu APE, które kodują białka naprawcze BER. Z zastosowaniem metody comet assay, przeprowadzono także badanie kinetyki naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA indukowanych przez nadtlenek wodoru przy użyciu endonukleaz Nth i Fpg rozpoznających specyficznie utlenione pirymidyny/puryny. W celu określenia poziomu naprawy DNA typu BER posłużono się testem BER *in vitro* z zastosowaniem ekstraktów komórkowych. W tym celu zaprojektowano znakowany radioaktywnie heterodupleks DNA z zasadą 2-

hydroksymetylo-3-hydroksy-tetrahydrofuranową jako substrat do indukcji naprawy BER w ekstraktach limfocytów od pacjentów z DSPN.

Analiza polimorfizmów genów naprawy DNA wykazała istotny statystycznie wzrost ryzyka zachorowania na T2DM i T2DM/DSPN dla genotypu Gln/Gln polimorfizmu 399 Arg/Gln w genie *XRCC1* oraz dla allelu Ala polimorfizmu 726 Val/Ala w genie *ADPRT*. Ponadto u chorych z współistniejąca neuropatią wykazano znaczny wzrost poziomu uszkodzeń oksydacyjnych, a efektywność naprawy okazała się istotnie obniżona w porównaniu z pacjentami z cukrzycą bez powikłań oraz grupą kontrolną.

Analiza efektywności usuwania tetrahydrofuranu w szlaku BER nie wykazała istotnych statystycznie zależności aktywności tego mechanizmu naprawy z występowaniem DSPN, w odniesieniu do grupy kontrolnej. Ponieważ analiza BER *in vitro* umożliwia ocenę etapu polimeryzacji DNA, na podstawie uzyskanych wyników sugeruje się iż, nieprawidłowości w tym mechanizmie naprawy dotyczyć mogą etapu wycinania utlenionych zasad, co wykazano przy pomocy testu kometowego.

Kliniczne następstwa przebiegu cukrzycy wiążą się z poważnymi powikłaniami, które mogą prowadzić do kalectwa, a nawet utraty życia. Jedynie wczesne wykrycie neuropatii cukrzycowej daje realne szanse na zahamowanie jej postępu i zapobiega nieodwracalnemu uszkodzeniu nerwów oraz ich następstwom. W związku z tym niezbędne jest poszukiwanie nowych efektywnych metod wczesnej diagnostyki oraz terapii neuropatii cukrzycowej. Dlatego, uzyskane w pracy wyniki mogą się przyczynić do lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów patogenezy neuropatii cukrzycowej oraz roli reaktywnych form tlenu w tym procesie chorobowym.

Anna Herman