

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MIHELA POVŠNAR

**DINAMIKA SPREMINJANJA DOLŽINE
TELOMEROV PRI BOLNIKI S SLADKORNO
BOLEZNIJO TIPA 1**

**TELOMERE LENGTH DYNAMICS IN
PATIENTS WITH TIPE 1 DIABETES**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Pediatrični kliniki, UKC Ljubljana, Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko pod mentorstvom doc. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem., spec. lab. genet.

ZAHVALA

Doc. dr. Katarina Trebušak Podkrajšek zahvaljujem se Vam, da ste me sprejeli pod svoje mentorstvo in mi posredovali strokovno znanje.

Tine Tesovnik, hvala za pomoč pri eksperimentalnem delu v laboratoriju, za nasvete, pozitivno kritiko in usmerjanje pri izdelavi magistrskega dela ter za veliko mero potrpežljivosti.

Hvala tudi vsem ostalim iz Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike UKC Ljubljana za prijetno sodelovanje tekom mojega raziskovalnega dela.

Iskrena hvala **vsem prijateljem**, ki ste me optimistično spodbujali, mi nesebično pomagali in strpno prenašali moje pomanjkanje časa tekom študija.

Še posebej pa hvala tebi **mami**, ker si razumevajoče spremljala mojo študijsko pot, mi stala ob strani in verjela vame. Hvala ti, da si moj navdih, podpora in spodbuda.

Izjava o avtorstvu

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem., spec. lab. genet.

Mihela Povšnar

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	III
1 UVOD	1
1.1 SLADKORNA BOLEZEN.....	1
1.1.1 SLADKORNA BOLEZEN TIPA 1	3
1.1.2 ETIOPATOGENEZA SBT1	4
1.1.3 GENETSKI DEJAVNIKI RAZVOJA SLADKORNE BOLEZNI TIPA 1.....	6
1.1.4 OKOLJSKI DEJAVNIKI RAZVOJA SLADKORNE BOLEZNI TIPA 1	7
1.1.5 AVTOIMUNSKO UNIČENJE β -CELIC	8
1.1.6 HbA1c IN GLIKEMIČNA UREJENOST SBT1	9
1.2 TELOMERI	10
1.2.1 DOLŽINA TELOMEROV	11
1.2.2 KRAJŠANJE IN VZDRŽEVANJE DOLŽINE TELOMEROV	12
1.2.3 VPLIV OKSIDATIVNEGA STRESA	14
2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA	16
3 PREISKOVANCI IN METODE	17
3.1 PREISKOVANCI	17
3.2 METODE.....	19
3.2.1 OSAMITEV GENOMSKE DNA IZ LEVKOCITOV PERIFERNE KRVI.....	19
3.2.2 SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN ČISTOČE DNA.....	20
3.2.3 DOLOČANJE RELATIVNE DOLŽINE TELOMEROV Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU.....	21
3.2.4 IZRAČUN RELATIVNE DOLŽINE TELOMEROV	27

3.2.5 STATISTIČNA ANALIZA	29
4 REZULTATI.....	32
4.1 KLINIČNE ZNAČILNOSTI BOLNIKOV S SLADKORNO BOLEZNIJO TIPA 1.....	32
4.2 DOLOČANJE DINAMIKE DOLŽINE TELOMEROV V ODVISTNOSTI OD GLIKEMIČNE UREJENOSTI SBT1	34
5 RAZPRAVA.....	42
6 SKLEP	49
7 LITERATURA	50

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I. Sestava reakcijske zmesi za določanje dolžine telomerov s PCR v realnem času	25
Preglednica II. Sestava reakcijske zmesi za določanje števila kopij referenčnega gena s PCR v realnem času.....	26
Preglednica III. Uporabljeni oligonukleotidni začetniki za določanje telomerov (TelG in TelC) in β -globinskega referenčnega gena (BG1b_F in BG1b_R)..	26
Preglednica IV. Osnovne klinične značilnosti preiskovancev s SBT1 vključenih v raziskavo.....	32
Preglednica V. Klinične značilnosti bolnikov iz skupine z dobro glikemično urejenostjo SBT1 in bolnikov iz skupine s slabo glikemično urejenostjo SBT1 ter razlike in ujemanja med skupinama.....	33
Preglednica VI. Vrednosti P parnega t-testa oz. Wilcoxonovega testa primerjav med skupinami preiskovancev z dobro glikemično urejenostjo SBT1 (skupina 1 in 2) in slabo glikemično urejenostjo SBT1	41
Preglednica VII. Rezultati dvosmerne ANOVE pri opredelitvi razlik v dinamiki dolžine telomerov med skupinami.	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura telomerov: telomerna DNA in nanjo vezani šelterinski proteini (TRF1, TRF2, PO1, TIN2, TPP1, RAP1).....	11
Slika 2: Spreminjanje dolžine telomerov zarodnih celic, somatskih celic in telomerov v celicah pri boleznih prezgodnjega staranja.....	13
Slika 3: Vezava oligonukleotidnih začetnikov	22
Slika 4: Razporeditev vzorcev na reakcijski plošči s 96-vdolbnicami	24
Slika 5: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 1 in bolniku z dobro glikemično urejenostjo 1a.....	34
Slika 6: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 2 in bolniku z dobro glikemično urejenostjo 2a.....	35
Slika 7: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 3 in pri bolnikoma z dobro glikemično urejenostjo 3a in 3b.....	36
Slika 8: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 4 in pri bolnikoma z dobro glikemično urejenostjo 4a in 4b.....	36
Slika 9: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 5 in pri bolnikoma z dobro glikemično urejenostjo 5a.....	37
Slika 10: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 6 in pri bolnikoma z dobro glikemično urejenostjo 6a in 6b.....	38
Slika 11: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 7 in pri bolnikoma z dobro glikemično urejenostjo 7a in 7b.....	38
Slika 12: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 8 in pri bolnikoma z dobro glikemično urejenostjo 8a in 8b.....	39
Slika 13: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 9 in pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 9a.....	40

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Izračun ΔC_t za vzorec ($\Delta C_t V$)	28
Enačba 2: Izračun standardnega odklona	28
Enačba 3: Izračun povprečja ΔC_t vrednosti ($povp. \Delta C_t$)	28
Enačba 4: Izračun relativne dolžine telomerov (T/S)	28

POVZETEK

Sladkorna bolezen tipa 1 (SBT1) je avtoimunska bolezen za katero je značilen avtoimunski propad β -celic trebušne slinavke in s tem povezano pomanjkanje inzulina, zaradi česar se pojavi stanje kronične hiperglikemije. Stanje hiperglikemije spremlja tudi povišan oksidativni stres in vnetje, kar pospeši krajšanje dolžine telomerov. Telomeri so nukleoproteinske strukture na koncu kromosomov večine evkariontskih organizmov, ki vzdržujejo genomsko stabilnost. Dolžina telomerov je značilna za vsakega posameznika, nanjo pa vplivajo številni genetski in okoljski dejavniki. Zdravljenje SBT1 je usmerjeno k zmanjšanju koncentracije glukoze v krvi k vrednostim, ki jih imajo zdravi ljudje, zmanjšanju oksidativnega stresa in preprečevanju nastanka akutnih in kroničnih zapletov SBT1.

Namen magistrske naloge je bil ovrednotiti vpliv glikemične urejenosti SBT1 na dinamiko spreminjanja dolžine telomerov pri otrocih in mladostnikih s SBT1. V raziskavo smo vključili 24 preiskovancev s SBT1 (14 dečkov in 10 deklic), med njimi 9 preiskovancev s slabo glikemično urejenostjo SBT1 s povprečno vrednostjo HbA1c od začetka vodenja bolezni nad 9 % in 15 preiskovancev z dobro glikemično urejenostjo SBT1 s povprečno vrednostjo HbA1c pod 7,5 %. Preiskovanci so se ujemale po spolu, starosti in trajanju bolezni in so bili glede na prvi izbran vzorec DNA za raziskavo stari od 3 do 16 let. Za posameznega preiskovanca smo z metodo PCR v realnem času določili relativne dolžine telomerov petim vzorcem DNA, ki so bili pridobljeni na vsakoletnih kontrolnih ambulantnih pregledih bolnikov. Dinamiko dolžine telomerov v preiskovanem obdobju smo za preiskovance s slabo glikemično urejenostjo SBT1 in za njihove ujemajoče preiskovance z dobro glikemično urejenostjo SBT1 določili z linearno regresijsko analizo relativne dolžine telomerov (T/S) od leta izolacije DNA. Statistično značilnega vpliva glikemične urejenosti na dinamiko spreminjanja dolžine telomerov nam ni uspelo dokazati. Zato bi bilo v prihodnje potrebno natančneje definirati skupine bolnikov in razširiti raziskavo na večje število preiskovancev.

Ključne besede: sladkorna bolezen tipa 1, dinamika dolžine telomerov, glikemična urejenost, oksidativni stres.

ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by autoimmune destruction of β -cells of the pancreas, and associated with lack of insulin which causes the state of chronic hyperglycemia. The state of hyperglycemia, accompanied by increased oxidative stress and inflammation, contributes to accelerated telomere shortening. Telomeres are nucleoprotein structures located at the ends of chromosomes of most eukaryotic organisms. Their role is to maintain genomic stability. The telomere length is typical for each individual; however, it is influenced by numerous genetic and environmental factors. The goals of type 1 diabetes treatment are to reduce blood glucose level to as close to normal as possible, to reduce oxidative stress, and to prevent acute and chronic complications of type 1 diabetes.

The aim was to determine influence of glycemetic control on telomere length dynamics in children and adolescents with type 1 diabetes. Study was carried out in a study group of 24 patients with type 1 diabetes (14 boys and 10 girls). Among them 9 patients had poor glycemetic control with mean HbA1c level over 9 % from the beginning of the management of disease, and of 15 patients had good glycemetic control with mean HbA1c level under 7,5 %. Patients were matched by sex, age and duration of disease, and were aged 3 to 16 years according to the first selected DNA sample. We determined the relative telomere length of 5 DNA samples for each patient with real-time PCR. The samples were obtained at the patient's annual examinations at the outpatient clinic. The telomere length dynamics for patients with poor glycemetic control and for their matching patients with good glycemetic control was determined with the linear regression analysis between relative telomere length (T/S) and the year of DNA isolation. Our results did not show a statistically significant impact of glycemetic control on telomere length dynamics. Therefore, more detailed definition of the analysed groups of patients and higher number of the individuals in each group would be needed in the future.

Key words: type 1 diabetes, telomere length dynamics, glycemetic control, oxidative stress.

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

ADA	ameriško združenje diabetikov
ALT	alternativno podaljševanje telomerov
bp	bazni par
Celice CD4+	celice T pomagalk
Celice CD8+	celice T zaviralke
Ct	kvantifikacijski cikel, pri merjenju s qPCR
C-veriga	s citozinom bogata veriga
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksi-ribonukleotidtrifosfat
dsDNA	dvoverižna DNA
D-zanka	izpodrinjena zanka
GAD 65	protitelesa proti dekarboksilazi glutaminske kisline 65
G-veriga	z gvaninom bogata veriga
HbA1c	glikiran hemoglobin
HLA	človeški poglavitni histokompatibilnostni kompleks
IA-2	protitelesa proti tirozinski kinazi
IAA	protitelesa proti insulinu
ICA	protitelesa proti celicam trebušne slinavke
IDF	Mednarodna organizacija za sladkorno bolezen
kb	kilo baza

MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
OGGT	oralni glukozni tolerančni test
PCR	verižna reakcija s polimerazo
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
ROS	reaktivne kisikove spojine
SBT1	sladkorna bolezen tipa 1
SBT2	sladkorna bolezen tipa 2
SD	standardni odklon
ssDNA	enoverižna DNA
T/S	relativna dolžina telomerov
TERC	RNA komponenta telomeraze
TERT	telomerazna reverza transkriptaza
T-zanka	telomerna zanka
ZnT8	protitelesa proti cinkovemu transporterju

1 UVOD

1.1 SLADKORNA BOLEZEN

Sladkorna bolezen (SB) ali »*diabetes mellitus*« je skupina presnovnih motenj, za katero je značilna povišana koncentracija glukoze v krvi oz. hiperglikemija, ki nastane zaradi nezadostnega izločanja inzulina, njegovega pomanjkljivega delovanja ali obojega (1). Za normalno delovanje celičnih in fizioloških procesov presnove je potreben inzulin, ki nastaja v trebušni slinavki. Inzulin omogoča, da glukoza v krvi prehaja v celice, kjer se uporabi za energijo ali ustrezno uskladišči. Zaradi nezadostnega delovanja inzulina na tarčna tkiva se pojavijo nenormalnosti v metabolizmu ogljikovih hidratov, maščob in proteinov, kar povzroča nastanek celičnega in oksidativnega stresa ter akutnih in kroničnih zapletov sladkorne bolezni (2). Normalno se SB izraža z značilnimi simptomi in znaki: poliurija (prekomerno izločanje urina), polidipsija (prekomerna žeja), polifagija (povečan vnos hrane), motnje vida, izguba telesne teže, utrujenost, dehidracija. V najhujših primerih se lahko kot posledica akutne hiperglikemije razvije ketoacidoza ali diabetični hiperosmolarni sindrom, ki v odsotnosti učinkovitega zdravljenja vodi v komo in smrt (2, 3). Kronična hiperglikemija lahko z leti povzroči okvaro, motnjo delovanja ali odpoved različnih organov, še posebno oči, živčevja, srca in ožilja ter ledvic. Sladkorna bolezen lahko z akutnimi in kroničnimi zapleti bolniku poslabša kakovost življenja in je pomemben vzrok prezgodnje smrtnosti bolnikov. Z zgodnjim odkrivanjem bolezni in skrbnim zdravljenjem lahko razvoj in napredovanje zapletov upočasnimo, medtem ko jih odpraviti za zdaj še ne znamo (1).

Kriteriji za diagnozo sladkorne bolezni (ADA) (4):

- glukoza v krvi na tešče 7,0 mmol/L ali več,
- naključno izmerjena koncentracija glukoze v krvi 11,1 mmol/L ali več ob prisotnosti hiperglikemičnih znakov,
- koncentracija glukoze v krvi 2 uri po oralnem glukoznem tolerančnem testu (OGGT - obremenitev s 75 g glukoze) 11,1 mmol/L ali več,

- raven glikiranega hemoglobina v krvi (HbA1c) 6,5 % ali več (4).

ADA priporoča določanje vrednosti HbA1c v diagnostiki sladkorne bolezni, z izjemo nosečnic, otrok (<18 let), oseb z anemijo ali abnormalnim hemoglobinom, ob sumu na SBT1, ob prisotnosti akutnih simptomov SB, kjer določitev HbA1c za postavitev diagnoze SB ni priporočljiva (5).

Glede na etiopatogenetske značilnosti SB razvrstimo v 4 klinične oblike:

- sladkorna bolezen tipa 1,
- sladkorna bolezen tipa 2,
- sladkorna bolezen v nosečnosti,
- drugi tipi sladkorne bolezni.

Sladkorna bolezen tipa 1 (SBT1) ima približno 4 % bolnikov s sladkorno boleznijo. Povišana koncentracija glukoze v krvi je posledica avtoimunskega propada β -celic trebušne slinavke, ki ne izločajo inzulina ali pa ga izločajo v zanemarljivih količinah. Pri SBT1, za katero je značilen pojav v otroštvu, se simptomi običajno pojavijo izrazito in nenadoma, medtem ko so pri SBT2 simptomi lahko odsotni in je zato ta tip SB težje odkriti (1).

Sladkorna bolezen tipa 2 (SBT2) ima okoli 95 % bolnikov s SB. Povišana koncentracija glukoze v krvi je posledica nezadostnega izločanja inzulina iz β -celic trebušne slinavke zaradi njihovih degenerativnih sprememb, zmanjšane občutljivosti na delovanje inzulina v tarčnih tkivih (predvsem mišicah) in čezmernega nastajanja glukoze v jetrih (1). Največja pojavnost SBT2 je med 40. in 59. letom starosti. Ta tip SB se pogosto pojavlja skupaj s previsokim krvnim tlakom in debelostjo, zato je nujno sočasno zdravljenje previsokega krvnega sladkorja, povišanega krvnega tlaka in zmanjšanje prekomerne telesne teže (6).

Sladkorna bolezen v nosečnosti se pojavi med nosečnostjo in večinoma po porodu izgine. Ženske, ki so imele SB v nosečnosti, imajo veliko tveganje, da bodo kasneje v življenju zbolele za SBT2, zato potrebujejo posebno obravnavo (6).

Drugi tipi sladkorne bolezni nastanejo kot posledica nekaterih zdravil, operacij, okužb, genetskih sindromov in drugih redkih bolezni (6).

Po poteku bolezni je sladkorna bolezen ena najbolj nepredvidljivih in ena najbolj psihično obremenjujočih bolezni, ter zahteva skrbno samozdravljenje, ki ga izvaja vsak bolnik sam, skupaj z usmeritvami zdravstvenih delavcev. SB je tudi ena najbolj razširjenih kroničnih bolezni, ki je še vedno v porastu, zato predstavlja velik javnozdravstveni problem. Po podatkih Mednarodne organizacije za sladkorno bolezen (IDF; angl. *International Diabetes Federation*) je bilo leta 2014 na svetu 387 milijonov bolnikov s SB, kar je 8,3 % svetovnega prebivalstva, od tega v Sloveniji 158.800 sladkornih bolnikov. 179 milijonov bolnikov s SB naj bi bilo na svetu trenutno še nediagnosticiranih. Predvidevajo, da bo do leta 2035 celokupno število sladkornih bolnikov naraslo na 592 milijonov. Vsi tipi SB so v porastu, še posebej SBT2. Po ocenah IDF je bila SB v letu 2014 vzrok za 4.9 milijonov smrti (7, 8).

1.1.1 SLADKORNA BOLEZEN TIPA 1

Sladkorna bolezen tipa 1 (SBT1) nastane zaradi avtoimunske vodene propada β -celic trebušne slinavke, ki izločajo inzulin (3). Pojavi se lahko v vseh starostnih obdobjih pri približno 0,15 % prebivalstva. Bolezen najpogosteje izbruhne pri otrocih, v puberteti in pri mladih. Ob odkritju SBT1 je uničeno do 90 % β -celic, pri čemer je zaradi pomanjkanja bolnikovega lastnega inzulina potrebno takojšnje zdravljenje z eksokrinimi odmerki inzulina, ki traja doživljenjsko (2). Inzulin je po sestavi beljakovina, zaradi česar se ga ne more nadomeščati peroralno in ga je zato potrebno injicirati v podkožje (9).

Cilj zdravljenja SB je zmanjšanje koncentracije glukoze v krvi in s tem preprečevanje nastanka zapletov SB, saj je hiperglikemija osnovni dejavnik za razvoj kroničnih zapletov. Poleg zdravljenja z inzulinom je pri preprečevanju hiperglikemije in kroničnih zapletov pomembna še ustrezna zdravstvena vzgoja, izobraževanje, redna samokontrola krvne koncentracije glukoze, redna telesna aktivnost in zdrava prehrana. Pri zdravljenju je izrednega pomena pripravljenost bolnika, da aktivno sodeluje pri zdravljenju, pri čemer je ključnega pomena dogovor med bolnikom in zdravnikom. Ker pri kar 90 % bolnikov

bolezen nastopi v otroštvu, je potrebno v začetek zdravljenja vključiti tudi bližnje sorodnike (2, 10).

Pogostost SBT1 po svetu je izrazito geografsko raznolika. Epidemiološke raziskave kažejo, da pogostost sladkorne bolezni narašča na obeh poloblah z oddaljenostjo od ekvatorja. Najnižja pojavnost je v državah Azije (Indija, Kitajska), na Karibih, v Latinski Ameriki (Venezuela) okoli 0.1/100.000 letno, najvišjo pojavnost na svetu ima Finska (okoli 40 primerov / 100.000 prebivalcev), podobno številčno pojavnost ima tudi Sardinija. Medtem, ko avtoimunske bolezni pogosteje prizadenejo ženske, je SBT1 nekoliko pogostejša pri moškem spolu. Pojavnost SBT1 variira z letnimi časi (sezonsko pojavljanje) in mesecem rojstva. Najpogosteje se pojavlja v jesenskih in zimskih mesecih, v času številnih virusnih okužb, kar potrjuje vpliv okoljskih dejavnikov, ki sprožijo patogeni proces. S SBT1 pogosteje obolevajo otroci, rojeni v poletnih mesecih (11, 12).

Glede na izvor razdelimo SBT1 na dve podskupini:

- Imunsko povzročena SBT1 je navadno končni rezultat tihega večletnega avtoimunskega procesa, ki povzroči okvaro β -celic Langerhansovih otočkov.
- Idiopatska SBT1 je redkejša. Izvor idiopatske SBT1 ni znan, večina bolnikov je afriškega ali azijskega rodu. Gre za spremenljivo potrebo po inzulinu, kjer genetsko ozadje ni povezano z antigeni HLA in bolniki ne kažejo imunoloških znakov propada β -celic (1, 3).

1.1.2 ETIOPATOGENEZA SBT1

Ker pri SBT1 primanjkuje inzulina, glukoza ne more vstopati v celice, zato se koncentracija glukoze v krvi poveča (hiperglikemija) in se začne izločati z urinom (glukozurija). Če bolniki niso deležni hitre diagnoze bolezni in pravočasnega zdravljenja, se začne zaradi pomanjkanja glukoze v celicah glukoneogeneza, pri čemer nastajajo ketoni. V velikih količinah ketoni povzročijo zakisanje telesa oz. diabetično ketoacidozo, ki je lahko življenjsko ogrožajoča (10).

Zaplete SBT1 delimo v dve skupini:

- akutni zapleti: diabetična ketoacidoza, hipoglikemija, diabetični hiperosmolarni sindrom.
- kronični zapleti:
 - mikrovaskularni (diabetična retinopatija - poškodba žilja mrežnice, lahko povzroči slepoto, diabetična nevropatija - zmanjšana zaznavnost perifernega živčevja, nevarnost za nastanek razjed na stopalih, diabetična nefropatija - okvara ledvic),
 - makrovaskularni (arterioskleroza, miokardni infarkt) (10).

Etiologija nastanka SBT1 je večfaktorska in vključuje genetske dejavnike in dejavnike okolja. Genetski dejavniki, med katerimi so tudi določeni genotipi HLA značilni za SBT1 in so povezani z večjim tveganjem za to bolezen (2).

Ali se bo dedna nagnjenost dejansko izrazila kot bolezen, je odvisno od vplivov iz okolja, na katere te osebe reagirajo drugače kot osebe, ki niso genetsko podvržene k razvoju te bolezni (2). Obstajajo številne teorije, ki trdijo, da dedni dejavniki sami niso dovolj za sprožitev avtoimunskega procesa v β -celicah, in da so za sprožitev razvoja bolezni ključni okoljski dejavniki (13). To potrjujejo naslednji dokazi: relativno majhen odstotek genetsko nagnjenih oseb (<10 %) razvije klinično obliko SBT1 (14), skladnost v pojavu SBT1 pri enojajčnih dvojčkih <40 % (15), več kot 10-kratna razlika v pojavnosti SBT1 med kavkazijsko raso v Evropi (16) in migracijske študije, ki kažejo na porast pojavnosti SBT1 v skupinah, ki so se preselile z območja nizke pojavnosti SBT1 na območje visoke pojavnosti SBT1 (17).

1.1.3 GENETSKI DEJAVNIKI RAZVOJA SLADKORNE BOLEZNI TIP 1

Najpomembnejši do zdaj poznani genetski dejavniki za pojav SBT1 so nekateri aleli HLA (HLA; angl. *Human Leukocyte Antigen*), ki so del poglobitnega histokompatibilnega kompleksa (MHC; angl. *Major Histocompatibility Complex*) in nosijo zapis za molekule HLA. Vsak posameznik ima specifično kombinacijo podtipov molekul HLA, na podlagi katere imunski sistem loči med lastnimi in tujimi molekulami v organizmu. Najmočnejši vpliv na povečanje tveganja za razvoj SBT1 imajo geni HLA razreda II (17). Geni HLA razreda II kodirajo molekule HLA-DP, HLA-DQ in HLA-DR, ki se nahajajo na antigen predstavitevni celici (limfociti B, makrofagi, dendritične celice), kjer predstavljajo peptide tujega izvora limfocitom razreda T, kateri nato sprožijo imunski odgovor (10, 18). Določeni podtipi molekul HLA povečajo tveganje za SBT1, drugi pred njo ščitijo (19).

HLA-DR3-DQB1*0201 (znan kot DR3-DQ2) in HLA-DR4-DQB1*0302 (DR4-DQ8) genotipa predstavljata največje tveganje za nastanek SBT1 (OR=1:16) (20). Na Japonskem je pogostost teh dveh genotipov nizka in s tem povezujejo tudi nizko pojavnost SBT1 (21). Posamezniki z visoko rizičnimi HLA genotipi imajo približno 6 % večje tveganje za razvoj SBT1 v primerjavi z osebami z drugačnim genotipom. Najbolj znan zaščitniški genotip pred razvojem SBT1 je DRB1*15-DQB1*0602, prisoten pri manj kot 1 % otrok s SBT1 (22). Geni HLA prispevajo okoli 60 % genetske nagnjenosti za pojav SBT1, 40 % prispevajo drugi geni (23). Spremembe v področju gena za inzulin razložijo 10 % primerov SBT1. Zmeren vpliv na razvoj SBT1 imajo še različice gena *CTLA-4*, katerega produkt vpliva na aktivacijo imunskega sistema (18).

Približno 10 % otrok, ki zbolijo za SBT1, ima pozitivno družinsko anamnezo. Med bližnjimi sorodniki bolnika (sorojenci, starši, potomci) velja 5-6 % tveganje za razvoj SBT1, enako tveganje velja za dvojajčne dvojčke (11). Verjetnost sopojavnosti SBT1 pri enojajčnih dvojčkih, ki so genetsko identični, znaša okoli 30-40 % in s starostjo pade na 6-25 %, kar kaže na pomen ne-genetskih dejavnikov, ki vplivajo na posameznika tekom življenja (18).

1.1.4 OKOLJSKI DEJAVNIKI RAZVOJA SLADKORNE BOLEZNI TIP 1

Okoljski dejavniki naj bi bili sprožilci za avtoimunsko uničenje β -celic in pojav SBT1 pri osebah, ki so genetsko nagnjene k tej bolezni (13). Dejavniki, ki naj bi pripomogli k razvoju SBT1 so: virusne okužbe, določene prehranske sestavine v različnih obdobjih otroštva (npr. mlečni proteini), toksini, stres, vpliv okoljskih onesnaževalcev (nitrozamini, nitriti, nitrati). Med okoljskimi dejavniki naj bi bila virusna okužba najpogostejši dejavnik odgovoren za razvoj SBT1 (18). Največ dokazov za povezavo z razvojem SBT1 je za virus rdečk in *Coxsackie* virus, ki ga uvrščamo med enteroviruse. Enterovirusne okužbe, ki so pogoste med otroci in najstniki povzročajo aseptični meningitis, miokarditis, paralizo, respiratorne okužbe, naj bi bile glavni virusni sprožilec SBT1 (18, 24). Okužba z virusom *Rubella* je sprožilec SBT1 v 20 % (12). SBT1 je lahko tudi stranski učinek delovanja nekaterih zdravil, kot so glukokortikoidi. Zaščitno vlogo pred razvojem SBT1 naj bi imel vitamin D, ki naj bi s svojim delovanjem že med nosečnostjo in v prvem letu starosti zmanjševal pojav SBT1 (11, 25).

Dojenje ima glede na nekatere raziskave zaščitno vlogo, medtem ko naj bi zgodnja izpostavljenost kravjemu mleku predstavljala dejavnik tveganja. Po ugotovitvah ene izmed raziskav naj bi bilo manj kot 3-mesečno dojenje povezano z 1,4-krat večjim tveganjem za razvoj SBT1 (14). Pri drugi raziskavi zmanjšano dojenje ni bil faktor tveganja za pojav avtoprotiteles ICA, ki so povezana s pojavom SBT1. Lahko pa bi bilo zmanjšano dojenje dejavnik tveganja za pojav SBT1 v kombinaciji z drugimi dejavniki (26). Uživanje z glutenom bogate hrane pred 3. mesecem starosti naj bi predstavljalo 5-krat večje tveganje za razvoj avtoprotiteles ICA kot uživanje enake hrane po 3. mesecu starosti. Prav tako naj bi pozna izpostavljenost glutenu, po 6. mesecu starosti, povečala tveganje za nastanek avtoprotiteles ICA (26). Tveganje za pojav ICA naj bi bilo zmanjšano kljub uživanju glutena, če mati otroka doji (27). Te ugotovitve, ki še vedno niso jasno dokazane, predlagajo, da naj bi se uživanju glutena izognili otroci, ki so genetsko nagnjeni k razvoju SBT1, saj naj bi imela genetska nagnjenost v kombinaciji z glutenom velik vpliv na razvoj avtoimunskega procesa v β -celicah pankreasa (26, 28).

1.1.5 AVTOIMUNSKO UNIČENJE β -CELIC

Avtoimunski napad je zelo specifičen in uperjen proti celicam, ki izločajo inzulin (β -celice) in se nahajajo v sferičnih gručah, imenovanih Langerhansovi otočki, ki so razpršeni po trebušni slinavki. α -celice, ki so ravno tako prisotne v Langerhansovih otočkih in izločajo glukagon, medtem ostanejo nedotaknjene (29). Antigen predstavitvene celice predstavijo antigene celicam T pomagalkam (celice CD4+) in celicam T zaviralkam (celice CD8+) in jih tako aktivirajo. Celice CD8+ uničijo β -celice z aktivacijo preko molekul MHC I, ki so izražene na površini β -celic. Celice CD4+, ki se aktivirajo preko MHC II, izločajo citokine, ter pomagajo limfocitom B, da se preobrazijo v plazmatke in proizvajajo protitelesa proti β -celicam (10). Razkroj β -celic je posledica delovanja citokinov (IFN- γ , TNF- α in IL-1), ki se sprostito pri vnetju, litičnih encimov iz aktiviranih makrofagov in oksidativnega stresa. Za SBT1 je značilen insulitis, vnetno stanje, ki je povezano s prisotnostjo velikega števila celic CD4+ in CD8+ ter makrofagov (29). Avtoimunski proces, ki vodi v uničenje β -celic je povezan z različnimi avtoprotitelesi: protitelesa proti inzulinu (IAA), protitelesa proti celicam trebušne slinavke (ICA), protitelesa proti tirozinski kinazi (IA-2), protitelesa proti dekarboksilazi glutaminske kisline 65 (GAD65), protitelesa proti cinkovem transporterju (ZnT8). Vloga teh avtoprotiteles v patogenezi SBT1 zaenkrat še ni poznana (30, 31). Avtoprotitelesa so prisotna v visokem odstotku že v obdobju pred izbruhom in ob kliničnem pričetku bolezni, ko pa so uničene skoraj vse β -celice, koncentracija avtoprotiteles pade in postane v serumu nezaznavna. Zato poleg tega, da imajo protitelesa diagnostično vrednost, pomagajo skupaj z genotipom HLA-DQ pri odkrivanju zgodnjih faz bolezni. Več kot 90 % bolnikov ima ob izbruhu SBT1 zaznavno vsaj eno vrsto avtoprotiteles v serumu (12). Prisotnost kombinacije avtoprotiteles poveča tveganje za nastanek SBT1 v družini. Ob prisotnosti treh ali štirih vrst omenjenih avtoprotiteles, je verjetnost za razvoj klinične oblike SBT1 v naslednjih 5-10 letih 60-100 % (14). Nekateri posamezniki imajo lahko prisotna zaznavna avtoprotitelesa povezana s SBT1, vendar za boleznijo ne bodo zboleli (13).

1.1.6 HbA1c IN GLIKEMIČNA UREJENOST SBT1

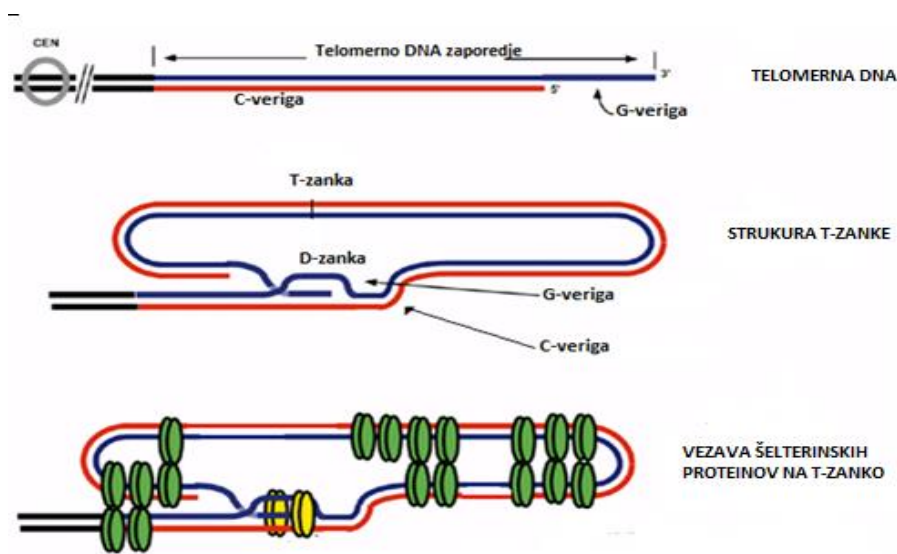
Hemoglobin je beljakovina v eritrocitih, sestavljena iz 4 polipeptidnih verig, ki vsebujejo nebeljakovinski del hem. Večino človeškega hemoglobina predstavlja HbA (98 % vsega hemoglobina) z dvema α in dvema β podenotama, ostali hemoglobin predstavljata HbA₂ (<3,5 %) in HbF (<1 %) (32). Med življenjsko dobo eritrocitov, ki normalno znaša okoli 120 dni, se glukoza neencimsko veže na hemoglobin, pri čemer nastane glikiran hemoglobin. Dlje kot je prisotno stanje hiperglikemije, več glukoze se veže na hemoglobin, kar poviša nivo glikiranega hemoglobina. HbA1c nastane z ireverzibilno vezavo glukoze na N-terminalni aminokislinski ostanek valina β -verige hemoglobina HbA₁ (33). Urejenost glikemične ravni preiskovancev se določa z oceno glikiranega hemoglobina HbA1c, ki odraža povprečno koncentracijo glukoze v krvi v preteklih 2-3 mesecih in ima dobro napovedno vrednost za nastanek in razvoj zapletov sladkorne bolezni (34). Normalna vrednost HbA1c pri zdravih posameznikih je manj kot 6,0 %, dalj časa trajajoče obdobje z vrednostmi HbA1c v območju 6,0-6,4 % pomeni večje tveganje za nastanek SB. HbA1c služi tudi kot označevalec za postavitev diagnoze SB pri vrednostih HbA1c 6,5 % ali več (35). Za zdravljenje SBT1 je merjenje HbA1c ključnega pomena, saj se pri zdravljenju SBT1 poskuša vzdrževati koncentracije krvne glukoze nizke in vrednosti HbA1c čim bližje ciljnim vrednostim oz. nižje od ciljnih vrednosti, če ni pomembnega tveganja za hipoglikemijo in tako zmanjšati tveganje za razvoj kroničnih zapletov SBT1 (34). Ciljna vrednost HbA1c pri odraslih s SBT1 je <7,0 %. ADA (angl. *American Diabetes Association*) priporoča določanje HbA1c na 3 mesece pri slabi glikemični urejenosti SBT1, v stabilnem obdobju na 6 mesecev oz. 2-krat letno (35). Ciljna vrednost HbA1c za vse pediatrične skupine je <7,5 % (36).

Bolj (HbA1c<6,5 %) ali manj strogi (HbA1c<8 %) glikemični cilji so pri odraslih bolnikih s SBT1 individualizirani glede na trajanje SB, leta, pričakovano življenjsko dobo, nenadne hipoglikemije in napredovane zaplete. Bolniki z nižjo ciljno vrednostjo HbA1c so odrasli bolniki s kratko trajajočo SBT1, mlajši odrasli bolniki, brez srčno-žilnih bolezni in dobro prognozo preživetja (37). Zniževanje HbA1c pri otrocih s SBT1 je manj strogo zaradi omejenih sposobnosti prepoznave hipoglikemičnih simptomov in odreagirane nanje (36).

1.2 TELOMERI

Telomeri so nukleoproteinske strukture na koncu linearnih kromosomov večine evkariontskih organizmov, ki jih sestavljajo ponavljajoča se, nekodirajoča zaporedja DNA, bogata z gvaninom in citozinom, ki jih obdajajo proteini. Telomeri ščitijo konce kromosomov pred razgradnjo in pred fuzijo z drugimi kromosomi ter imajo pomembno vlogo pri vzdrževanju genomske stabilnosti (38). Če se kromosomi celic zlepijo med sabo in ponovno preuredijo, je takšna poškodba nepopravljiva in takšna celica mora v apoptozo, sicer lahko postane maligna (39). Pri ljudeh in drugih vretenčarjih je telomerna DNA sestavljena iz heksanukleotidnih tandemskih ponovitev 5'TTAGGG/CCCTAA3' (40). Število teh ponovitev se razlikuje med organizmi, tkivi, celicami, posameznimi kromosomi in tudi med telomeroma istega kromosoma. Telomerni konci oz. telomeri so podobni lomu dvoverižne DNA z enoverižnim štrlečim koncem na 3' koncu G-verige (z gvaninom bogata veriga), ki štrli od 35 do 600 nukleotidov preko komplementarne C-verige (s citozinom bogata veriga) (41). DNA-veriga tvori telomerno T-zanko, pri čemer G-veriga dvoverižne DNA preide v enoverižno DNA na 3' koncu nazaj v dvoverižno DNA v D-zanko (izpodrinjena, angl. *displacement*) (Slika 1) (38).

T-zanka ščiti telomerne konce, da ne bi bili prepoznani kot lomi dvoverižne DNA, in uravnava podaljševanje in krajšanje telomerov (41). Tvorbo in stabilizacijo telomerne strukture (T-zanke) omogoča šest osnovnih šelterinskih (angl. *shelterin*) proteinov: TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1, RAP1 (38). Posledica krajšanja telomerov je destabilizacija kromosomov in nezmožnost vezave šelterinskih proteinov. Takrat se T-zanka težje tvori, kromosomski konci ostanejo nepokriti, prepoznani so kot mesta poškodbe DNA, kar aktivira p53, ki vodi v apoptozo (42). Prva stopnja ustavitve celične delitve ob kritično skrajšanih telomerih je kontrolna točka M1 (senescenčna točka), ki jo lahko celica preide, če proteini p53 in pRB niso aktivirani. Takrat se telomeri še naprej krajšajo, kar vodi v fuzijo kromosomskih koncev in genomsko nestabilnost, ki je lahko odgovorna za nadaljnje mutacije in zaustavitev celičnega cikla v kontrolni točki M2 (celična kriza), kjer večina celic preide v apoptozo (43). Nekatere celice kljub poškodbam telomerov v kontrolni točki M2 ne preidejo v apoptozo, temveč aktivirajo mehanizme, ki vzdržujejo dolžino telomerov (telomeraza, alternativno podaljševanje telomerov), in s tem postanejo nesmrtni (41).



Slika 1: Struktura telomerov: telomerna DNA in nanjo vezani šelterinski proteini (TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1, RAP1). TRF1 in TRF2 se vežeta direktno na dvoverižno telomerno DNA (dsDNA), POT1 pa na enoverižno DNA (ssDNA). POT1, ki se veže na 3' štrleči konec telomerne DNA, je pomemben pri tvorbi D-zanke. Povzeto po (42, 44).

1.2.1 DOLŽINA TELOMEROV

Dolžina telomernih ponovitev se razlikuje med vrstami, kakor tudi znotraj vrste. Na razlike med posamezniki vplivajo genetski in okoljski dejavniki. Mišji telomeri so dolžine približno 100 kb in so daljši kot človeški, ki merijo 8-14 kb (42). Ob rojstvu v dolžini človeških telomerov med spoloma ni razlike. Kasneje imajo ženske daljše telomere kot moški. Razlike nastanejo verjetno zaradi okoljskih dejavnikov in razlik v nivoju estrogena. Največje spremembe v dolžini telomerov nastanejo v prvih nekaj letih po rojstvu (42).

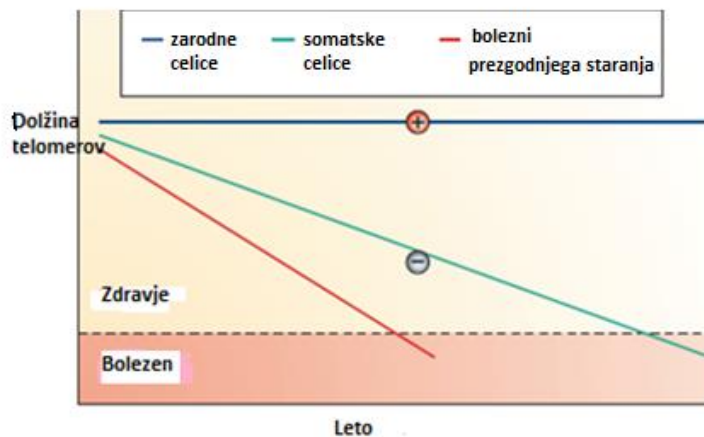
Najpogosteje se za določanje dolžin telomerov uporablja vzorec DNA krvnih levkocitov, saj so ti razmeroma lahko dostopni (45). Največja slabost določanja dolžin levkocitnih telomerov je, da je njihova dolžina tudi odraz procesa vnetja in ne le staranja. Telomeri se krajšajo s staranjem oz. z vsako celično delitvijo, krajšanje je pospešeno ob vnetju in bolezenskih procesih, kjer je udeležen tudi oksidativni stres. Dolžina telomerov je tako lahko pokazatelj biološkega staranja in kazalec bolezni (42). Na dolžino telomerov vplivajo vnetni procesi, kajenje, telesna aktivnost, spol, socialnoekonomski status, indeks telesne teže, vnos vitaminov, antioksidanti v prehrani, uživanje alkohola, nadomestna

terapija s hormoni. Vitamin D naj bi upočasnil krajšanje levkocitnih telomerov, saj je potencialni inhibitor vnetnega odgovora in upočasnjuje levkocitno pretvorbo. Kajenje negativno vpliva na dolžino telomerov, verjetno zaradi mehanizmov, ki vključujejo oksidativni stres (46).

1.2.2 KRAJŠANJE IN VZDRŽEVANJE DOLŽINE TELOMEROV

Pred celično delitvijo morajo celice podvojiti DNA, da hčerinske celice dobijo svoj komplet kromosomov. Zaradi nezmožnosti DNA polimeraze pri podvojevanju koncev DNA se z vsako celično delitvijo DNA konci oziroma telomeri skrajšajo, kar imenujemo replikacijski problem (angl. *end-replication problem*) (47, 48). Po ocenah se pri ljudeh v vsakem replikacijskem ciklu levkocitov dolžina telomerov skrajša za 30-150 bp (42). Ko se telomeri dovolj skrajšajo, celice s tem dosežejo maksimalno število celičnih delitev in preidejo v senescenčno fazo. Senescenčna faza vključuje delovanje p53 in pRB, ki ustavi celično delitev in na koncu poskrbi za apoptotsko uničenje senescenčnih celic. V povprečju preidejo celice v senescenčno fazo po približno 50 delitvah delitvah, kar je nekoliko prej kot je predvideno glede na replikacijski problem. Verjetno je prisotnost šelterinskih proteinov pomemben kofaktor povezan z indukcijo celičnega staranja in s tem pomemben zaviralec tumorogeneze (42).

Mnoge s starostjo povezane bolezni so povezane s skrajšanimi telomeri, kjer celice hitreje preidejo v senescenčno fazo, kar lahko zmanjša delovanje organov in prispeva k staranju organizma (39, 22). Takšne bolezni so: kardiovaskularne bolezni (srčne bolezni, ateroskleroza), demenca, jetrna ciroza (49). Za številne dedne bolezni prezgodnjega staranja (Dyskeratosis congenita, Wernerjev sindrom, aplastična anemija, Ataxia telangiectasia) je značilno pospešeno krajšanje telomerov, kratke dolžine telomerov in kromosomska nestabilnost (50).



Slika 2: Spreminjanje dolžine telomerov zarodnih celic, somatskih celic in telomerov v celicah pri boleznih prezgodnjega staranja. Telomere večine somatskih celic se krajšajo z vsako celično delitvijo (na grafu znak -), pri boleznih prezgodnjega staranja je krajšanje telomerov pospešeno (na grafu rdeča črta). Dolžina telomerov zarodnih celic se kljub celičnim delitvam zaradi visoke aktivnosti telomeraze ohranja (na grafu znak +). Povzeto po (50).

Dolžino telomerov vzdržuje telomeraza in mehanizmi alternativnega podaljševanja telomerov (ALT; angl. *Alternative Lengthening of Telomeres*) (38). Telomeraza je ribonukleinski kompleks, ki podaljšuje telomere v smeri od 5' proti 3', z dodajanjem TTAGGG zaporedja na 3' štrleči konec. Sestavljena je iz telomerazne reverzne transkriptaze (TERT) in RNA komponente (TERC), ki je komplementarna telomernemu zaporedju in služi kot matrica za novo sintezo telomernega DNA zaporedja (38, 42).

Telomerazna aktivnost je ohranjena v zarodnih celicah, matičnih celicah in tumorskih, odsotna oziroma zanemarljiva v večini človeških somatskih celic. Majhne količine aktivnosti so bile zaznane v aktiviranih limfocitih T in B, ovarijih, testisih (34, 36). Pretirano izražanje telomeraze lahko prepreči celično staranje in spodbudi celično nesmrtnost, kar je osnova za tvorbo tumorjev, medtem ko je inaktivacija telomeraze tumorski zaviralec (41).

Mehanizmi alternativnega podaljševanja telomerov vzdržujejo dolžino telomerov z rekombinacijo DNA (51). Šelterinski proteini uravnavajo dolžino telomerov z vplivanjem na telomerazno aktivnost. TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 so negativni regulatorji dolžine telomerov. Če so telomeri predolgi, se veže več šelterinskih proteinov na TTAGGG ponovitve in inhibirajo telomerazo. Pri prekratkih telomerih, se šelterinski

proteini sprostijo in telomeraza lahko podaljša telomere (38, 41). ALT je prisotno v nekaterih rakavih celicah, v normalnih celicah pa je običajno inhibirano s šelterinskimi proteini (npr. TRF2 in POT1), ki zavirajo rekombinacijo DNA (51).

1.2.3 VPLIV OKSIDATIVNEGA STRESA

Zaradi visoke vsebnosti gvanina v telomerni DNA so telomeri dokaj občutljivi na oksidativni stres in poškodbe. Oksidativne poškodbe se kopičijo med življenjsko dobo celice oz. organizma, skrajšajo telomere in s tem prispevajo k pospešenemu staranju. Mnogokrat imajo na krajšanje telomerov večji vpliv oksidativne poškodbe, kot ga ima sam replikacijski problem (52). Zmanjševanje oksidativnega stresa z antioksidanti, kot je vitamin C, podaljša življenjsko dobo celic s počasnejšim krajšanjem telomerov. Popravljanje poškodb povzročenih z reaktivnimi kisikovimi spojinami (ROS) je manj učinkovito v telomerih kot v preostalem genomu, saj šelterinski protein TRF2 blokira dostop DNA popravljalnih encimov do telomernih enovijačnih prelomov (38, 39, 45). Reaktivne kisikove spojine, še posebej hidroksilni radikal, povzročajo enovijačne lome DNA. Enovijačni lomi, ki se kopičijo v celici med G0 in G1 fazo, predstavljajo oviro za delovanje DNA polimeraze, zaradi česar se telomeri hitreje skrajšajo (49).

Pri aterosklerozi, debelosti, sladkorni bolezni, kronični pljučni bolezni in številnih drugih boleznih je kronično vnetje povezano s spremljajočim povišanim oksidativnim stresom (45). Osebe s krajšimi telomeri imajo pogosteje povišan krvni tlak in s tem večjo nagnjenost k razvoju ateroskleroze. Prav tako so posamezniki s krajšimi telomeri bolj nagnjeni k boleznim povezanim s staranjem in malignimi obolenji in imajo večje tveganje za zgodnjo smrtnost (42).

Povišan oksidativni stres pri sladkorni bolezni (SBT1 in SBT2) je posledica povečanega nastajanja prostih radikalov, še posebej ROS, zaradi hiperglikemije. Hiperglikemija povzroča nastanek ROS z neencimsko glikacijo, avtooksidacijo glukoze in aktivacijo poliolne poti (redukcija glukoze → sorbitol-kopičenje pri SB) (53). Zmanjša se tudi antioksidativna obramba, saj lahko hiperglikemija z glikacijo antioksidantnih encimov (superoksid dismutaza, glutathion peroksidaza, katalaza) zmanjša njihovo aktivnost (54).

Povišan nivo ROS pri bolnikih s SB pospeši krajšanje telomerov in povzroča zaplete SB (55, 56).

Le malo raziskav je preučevalo dolžino telomerov pri SBT1, pri čemer so bile raziskave opravljene na skupinah odraslih bolnikov s SBT1. Dokazano je bilo, da so telomeri bolnikov s SB1 krajši, kot telomeri ujemajočih zdravih preiskovancev (57). Ugotovljeno je bilo tudi, da lahko dobra glikemična urejenost SBT1 upočasni krajšanje telomerov, saj so imeli bolniki z dobro glikemično urejenostjo SBT1 daljše telomere kot bolniki s slabo glikemično urejenostjo SBT1 (58). Pri bolnikih s SBT1 s prisotno ali odsotno diabetično nefropatijo razlike v dolžini telomerov niso dokazali (59). So pa lahko krajši telomeri pokazatelj napredovanja diabetične nefropatije, saj so bili telomeri z napredovanjem diabetične nefropatije krajši (60). V edini raziskavi do sedaj, kjer je bila preučevana dolžina telomerov pri otrocih in mladostnikih s SBT1, so bile krajše telomere ugotovljene pri otrocih in mladostnikih s SBT1 in nekoliko višjimi vrednostmi indeksa telesne teže. Povezave med serumskimi vrednostmi vitamina D, starostjo ob izbruhu bolezni, glikiranim hemoglobinom in dolžino telomerov niso bile dokazane (61).

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

Dokazano je, da se dolžina telomerov s staranjem krajša. Hitrost krajšanja telomerov je v različnih življenjskih obdobjih različna, razlike pa so prisotne tudi med spoloma. Na dolžino telomerov vplivajo genetski in okoljski dejavniki in bolezni povezane s povečanim oksidativnim stresom ter vnetjem.

Namen dela je opredeliti vpliv glikemične urejenosti SBT1 na dinamiko spreminjanja dolžine telomerov pri otrocih in mladostnikih s SBT1.

Namen dela zajema naslednje specifične cilje:

- Iz obstoječe medicinske dokumentacije bomo za posameznega bolnika pridobili klinične podatke.
- Preiskovancem bomo na podlagi povprečja 5-letnih vrednosti HbA1c določili glikemično urejenost SBT1.
- Z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času bomo preiskovanim bolnikom s SBT1 določili relativne dolžine telomerov v petih vzorcih DNA odvzetih ob zadnjih petih letnih kontrolah.
- Z linearno regresijsko analizo bomo določili dinamiko spreminjanja dolžine telomerov pri bolnikih z dobro in slabo glikemično urejenostjo SBT1.
- S statističnimi metodami bomo primerjali dinamike spreminjanja dolžine telomerov med skupinami preiskovancev s slabo in dobro glikemično urejenostjo SBT1.

Hipoteza

Glikemična urejenost sladkorne bolezni tipa 1 vpliva na dinamiko spreminjanja dolžin telomerov pri pediatričnih bolnikih s SBT1.

3 PREISKOVANCI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 24 bolnikov s SBT1, 14 dečkov in 10 deklic, ki so vodeni na Kliničnem oddelku za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove na Pediatrični kliniki UKC Ljubljana, kjer jim na rednih zdravniških pregledih med drugimi preiskavami določijo vrednost glikiranega hemoglobina (HbA1c) 2-krat letno.

Na podlagi večletnih vrednosti HbA1c določenih na letnih kontrolah bolnikov, smo izračunali povprečno vrednost meritev HbA1c zadnjih pet let. Preiskovance z večletno povprečno vrednostjo HbA1c več kot 9 % smo uvrstili v skupino s slabo glikemično urejenostjo SBT1. Vsakemu preiskovancu s slabo glikemično urejenostjo SBT1 smo poiskali enega ali dva po spolu, starosti (± 1 leto) in trajanju bolezni (± 1 leto) ujemajočega preiskovanca z dobro glikemično urejenostjo SBT1, kjer povprečna vrednost HbA1c v obdobju zadnjih 5 let ni presegala 7,5 %. Te preiskovance smo uvrstili v skupino z dobro glikemično urejenostjo SBT1. Ker je imelo nekaj preiskovancev s slabo glikemično urejenostjo SBT1 po dva ujemajoča preiskovanca z dobro glikemično urejenostjo SBT1, smo na podlagi tega ločili dve skupini z dobro glikemično urejenostjo SBT1: skupina 1 z enim ujemajočim bolnikom in skupina 2 z dvema ujemajočima bolnikoma z dobro glikemično urejenostjo SBT1.

Podatke o spolu, datumu rojstva, letu začetka bolezni, spremljajočih boleznih, vrednosti HbA1c smo za posameznega bolnika pridobili iz razpoložljive medicinske dokumentacije. Izbrani bolniki poleg SBT1 niso imeli prisotnih drugih avtoimunskih bolezni.

Izolirano DNA bolnikov, vključenih v raziskavo, smo izbrali iz banke DNA, ki jo vodijo v Genetskem laboratoriju Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike UKC Ljubljana. Za določanje dolžin telomerov smo za vsakega bolnika uporabili zadnjih pet kronoloških vzorcev shranjene DNA, ki so bili izolirani v razmaku vsaj enega leta in so bili pridobljeni na letnih kontrolnih pregledih bolnikov. Za bolnike, kjer na podlagi zastavljenih kriterijev ni bilo na voljo 5 vzorcev, smo zbrali po 4 vzorce DNA. Izbrani vzorci DNA ujemajočih preiskovancev se po datumu izolacije DNA niso razlikovali za več

kot 1 leto. Skupaj smo tako analizirali 120 vzorcev DNA 24 bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1.

Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije (št : 29/02/13).

3.2 METODE

3.2.1 OSAMITEV GENOMSKE DNA IZ LEVKOCITOV PERIFERNE KRVI

Genomsko DNA smo osamili iz levkocitov periferne krvi po uveljavljenem laboratorijskem postopku z reagenčnim kompletom FlexiGene DNA isolation kit (Qiagen).

Reagenti in raztopine

- komercialno dostopen reagenčni komplet FlexiGene DNA isolation kit (Qiagen),
- pufer za lizo celic FG1 (FlexiGene DNA isolation kit, Qiagen),
- proteazni pufer FG2 (FlexiGene DNA isolation kit, Qiagen),
- pufer za hidracijo FG3 (FlexiGene DNA isolation kit, Qiagen),
- izopropanol,
- 70 % etanol.

Inštrumenti in materiali

- centrifugirke (50 mL, Falcon),
- sterilne mikrocentrifugalne epruvete (1,5 mL),
- pipete (10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L),
- sterilni nastavki za pipete,
- centrifuga,
- vibracijski mešalnik.

Postopek

V 50 mL centrifugirko (Falcon) smo prenesli 5 mL periferne venske krvi, odvzete z antikoagulantom EDTA, dodali 12,5 mL pufera za lizo celic FG1, premešali in centrifugirali 5 min pri 2000 g. Supernatant smo zavrgli, oborini dodali 2,5 mL proteaznega pufera FG2,

zmes homogenizirali in inkubirali v vodni kopeli 10 minut pri 65 °C. Po inkubaciji smo zmesi dodali 2,5 mL izopropanola, s čimer smo oborili DNA. Suspenzijo smo centrifugirali 3 minute pri 2000 g, supernatant zavrgli, oborino pa sprali z 2,5 mL 70 % etanola in tako odstranili nečistoče. Ponovno smo centrifugirali 3 minute pri 2000 g in odstranili supernatant. Oborino, kjer se je nahaja DNA smo posušili na zraku in na koncu raztopili v 0,5 mL pufru za hidracijo FG3.

3.2.2 SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN ČISTOČE DNA

Reagenti in raztopine

- destilirana voda,
- vzorec – izolirana DNA.

Inštrumenti in materiali

- mikrokvarčna kiveta (10 mm),
- spektrofotometer (Lambda 25, Perkin Elmer).

Postopek

Koncentracijo in čistost DNA smo določili spektrofotometrično, z merjenjem absorbance pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm. Pri 260 nm imajo največjo absorbanco dušikove baze v molekuli DNA, pri 280 nm proteini. Čistost DNA smo določili na podlagi razmerja A260/A280. Za molekularno-genetske preiskave smo uporabili le vzorce z razmerjem A260/A280 med 1,7 in 2,0 in koncentracijo DNA vsaj 50 µg/mL, katere smo hranili v banki DNA pri 4 °C.

3.2.3 DOLOČANJE RELATIVNE DOLŽINE TELOMEROV Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) je kvantitativna metoda, ki omogoča sočasno pomnoževanje in merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo. Reakcija poteka ciklično, vsak cikel je sestavljen iz 3 stopenj: denaturacija, prileganje oligonukleotidnih začetnikov, izgrajevanje komplementarne verige. Z vsakim ciklom se število kopij zelenega odseka DNA podvoji. Običajno pri meritvah izvedemo 20-40 ciklov. Detekcija produktov PCR temelji na merjenju fluorescence na vsakem koncu cikla izgrajevanja komplementarne verige. Tako dobimo krivulje, ki podajo odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov. Za vsak vzorec določimo cikel, kjer je intenziteta fluorescence značilno večja od fluorescence ozadja in se nahaja v linearnem delu krivulj ciklov od fluorescence. Ta cikel imenujemo kvantifikacijski cikel (Ct) (62).

Za določanje dolžine telomerov smo uporabili nespecifični način detekcije in sicer fluorescenčno barvilo EvaGreen (Qiagen), ki se vgradi v dvoverižno DNA. V stopnji prileganja je DNA enoverižna, barvilo EvaGreen je prosto in ne fluorescira. V stopnji podaljševanja se barvilo vgradi v nastajajočo dvoverižno DNA in ob ekscitaciji močno fluorescira. Količina fluorescence je sorazmerna s količino nastale dvoverižne DNA.

S PCR v realnem času smo v vsakem vzorcu izmerili dolžino telomerov in število kopij referenčnega gena v enakem volumnu delovne raztopine vzorčne DNA in sicer v ločenih vdolbinicah reakcijske plošče in z različnim temperaturnim programom. Število kopij referenčnega gena smo določili s pomnoževanjem referenčnega gena β -globina - BGIb. Oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje referenčnega gena so bili konstruirani za specifično vezavno DNA, saj so se vezali na točno določena zaporedja genoma.

Oligonukleotidni začetniki za določanje dolžin telomerov so bili nespecifični, vezali so se na več mest vzdolž telomerne DNA, zaradi česar smo dobili različno dolge amplikone. Metoda, ki smo jo uporabili v raziskavi za določanje relativne dolžine telomerov, je prirejena po metodi, objavljeni v članku »*Telomere length measurement by a novel*

Reagenti in raztopine

- komercialno dostopna reakcijska mešanica Type-IT HRM Mastermix (Qiagen),
- destilirana voda,
- osnovna raztopina DNA s koncentracijo 100 ng/ μ L,
- vzorčna DNA – delovna raztopina s koncentracijo DNA 5 ng/ μ L,
- referenčni vzorec s koncentracijo DNA 5 ng/ μ L,
- oligonukleotidna začetnika TelG in TelC,
- oligonukleotidna začetnika BGIb_F in BGIb_R,
- referenčno barvilo ROX (Applied Biosystems).

Inštrumenti in materiali

- centrifuga,
- vibracijski mešalnik,
- reakcijska plošča s 96-vdolbinicami (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems),
- pipete (10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L) in sterilni nastavki za pipetiranje,
- optični lepilni film (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA),
- aparat za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Postopek

Za namen analize dolžin telomerov je bila za vsak vzorec preiskovancev pripravljena osnovna raztopina DNA s koncentracijo 100 ng/ μ L in delovna raztopina s koncentracijo 5 ng/ μ L.

Delovne raztopine vzorčne DNA so bile shranjene na -20 °C, zato smo jih pred vsako uporabo odtalili, kratko premešali na vibracijskem mešalniku in centrifugirali. V večji količini volumna smo pripravili referenčni vzorec DNA, ki je bil izbran vzorec DNA,

razredčen na koncentracijo 5 ng/ μ L. Ker je referenčni vzorec služil za umeritev med ploščami, je bil prisoten na vseh reakcijskih ploščah pri vseh meritvah.

Za merjenje relativne dolžine telomerov smo uporabili optične reakcijske plošče s 96-vdolbnicami (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems). Posamezni vzorčni DNA smo izmerili količino telomernega produkta in količino produkta referenčnega gena v treh paralelkah na plošči in na treh reakcijskih ploščah. Razporeditev vzorcev je bila enaka pri določanju števila kopij referenčnega gena kot pri določanju dolžine telomerov in je prikazana na sliki 4.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12
B	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12
C	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12
D	V13	V14	V15	V16	V17	V18	V19	V20	V21	V22	V23	V24
E	V13	V14	V15	V16	V17	V18	V19	V20	V21	V22	V23	V24
F	V13	V14	V15	V16	V17	V18	V19	V20	V21	V22	V23	V24
G	V25	V25	V25	V26	V26	V26	V27	V27	V27	V28	V28	V28
H	V29	V29	V29	V30	V30	V30	V31	V31	V31	R1	R1	R2

Slika 4: Razporeditev vzorcev na reakcijski plošči s 96-vdolbnicami. Na vsaki reakcijski plošči je bilo 31 vzorčnih DNA (V1-V31) in 1 referenčni vzorec (R1), nanešeni so bili v treh paralelkah. Vzorcem smo na eni reakcijski plošči merili dolžino telomerov, na drugi število kopij referenčnega gena.

V vsako vdolbinico smo k 20 ng vzorčne DNA ali k 20 ng referenčnega vzorca DNA dodali 11 μL reakcijske zmesi za merjenje dolžine telomerov (Preglednica I) ali za določanje števila kopij referenčnega gena (Preglednica II), odvisno kaj smo na plošči določali, pri čemer sta se reakcijski zmesi razlikovali v parih oligonukleotidnih začetnikov. Za pomnoževanje telomerov smo uporabili oligonukleotidna začetnika TelG in TelC, ter za referenčni gen BGIb_F in BGIb_R. Končni volumen reakcijske raztopine na vzorec je bil 15 μL . Ploščo smo nato zatesnili z optičnim lepilnim filmom (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA), reakcijske mešanice premešali na vibracijskem mešalniku, ploščo centrifugirali ter izvedli meritev na aparatu 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Preglednica I. Sestava reakcijske zmesi za določanje dolžine telomerov s PCR v realnem času: Type-IT HRM Mastermix, oligonukleotidna začetnika TelG in TelC, referenčno barvilo ROX, H₂O.

Type-IT HRM Mastermix (Qiagen) sestavlja: HotStarTaq Plus DNA polimeraza, reakcijski pufer, fluorescenčno barvilo EvaGreen, dNTP-ji (dATP, cCTP, dGTP, dTTP). HotStarTaq Plus DNA polimerazo aktiviramo na začetku PCR reakcije z 10-minutno inkubacijo na 95 °C. Referenčno barvilo ROX omogoča normalizacijo fluorescenčnega signala po vdolbinicah.

Reagent	Volumen na vdolbinico
Type-IT HRM Mastermix (Qiagen)	7,50 μL
Oligonukleotidni začetnik TelG	3,5 pg
Oligonuklotidni začrtnik TelC	3,5 pg
Referenčno barvilo ROX (Applied Biosystems)	0,05 μL
H₂O	do 15 μL

Preglednica II. Sestava reakcijske zmesi za določanje števila kopij referenčnega gena s PCR v realnem času: Type-IT HRM Mastermix, oligonukleotidna začetnika BGIb_F in BGIb_R, referenčno barvilo ROX, H₂O.

Reagent	Volumen na vdolbinico
Type-IT HRM Mastermix (Qiagen)	7,50 µL
Oligonukleotidni začetnik BGIb_F	3,5 pg
Oligonuklotidni začetnik BGIb_R	3,5 pg
Referenčno barvilo ROX (Applied Biosystems)	0,05 µL
H ₂ O	do 15 µL

Preglednica III. Uporabljeni oligonukleotidni začetniki za določanje telomerov (TelG in TelC) in β-globinskega referenčnega gena (BGIb_F in BGIb_R). Oligonukleotidni začetniki so bili pred uporabo razredčeni na delovno koncentracijo 10 pg/µL. Na reakcijo je znašala koncentracija posameznega oligonukleotidnega začetnika 3,5 pg.

IME OLIGONUKLEOTIDNEGA ZAČETNIKA	ZAPOREDJE
TelG	ACA CTA AGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTA GTG T
TelC	TGT TAG GTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA ACA
BGIb_F	CGG CGG CGG GCG GCG CGG GCT GGG CGG ctt cat cca cgt tea cct tg
BGIb_R	GCC CGG CCC GCC GCG CCC GTC CCG CCG gag gag aag tct gcc gtt

Temperaturni profil metode

Temperaturna profila za določanje telomernih produktov in referenčnega gena z metodo qPCR sta se med seboj razlikovala.

Določanje telomerov

- aktivacija DNA polimeraze: 95 °C/10 min
- pomnoževanje: 4 cikli: 95 °C/15 s; 49 °C/20 s;
30 ciklov: 95 °C/15 s; 62 °C/ 10 s; 71 °C/ 15 s.

Določanje referenčnega gena

- aktivacija DNA polimeraze: 95 °C/10 min
- pomnoževanje: 40 ciklov: 94 °C/17 s; 62 °C/10 s; 87 °C/15 s.

Po končani meritvi smo izmerjene podatke za vsako reakcijsko ploščo v obliki vrednosti Ct izvozili v datoteko xlsx.

3.2.4 IZRAČUN RELATIVNE DOLŽINE TELOMEROV

Za preračunavanje eksperimentalno pridobljenih podatkov smo uporabili računalniški program Microsoft Office Excel 2010. Relativno dolžino telomerov (T/S) smo določili po Livakovi metodi, ki jo imenujemo tudi primerjalna ali $\Delta\Delta C_t$ metoda. Metoda temelji na primerjavi vrednosti C_t telomerov (T) in referenčnega gena (S) za posamezen vzorec, s čimer določimo ΔC_t .

Vsak vzorec je bil na vsaki reakcijski plošči merjen 3-krat, poleg tega pa smo vsako meritev vzorca ponovili na treh reakcijskih ploščah in s tem dobili tri meritve C_t vrednosti za telomere ($C_{t\text{tel}}$) in tri C_t vrednosti za referenčni gen ($C_{t\text{ref.gen}}$). Z izračunom smo dobili tri ΔC_t vrednosti. Izmerjenim C_t vrednostim za telomere smo prišteli 4 cikle, ki so bili izvedeni zaradi boljše vezave oligonukleotidov, saj se telomerni oligonukleotidi vežejo nespecifično na preiskovano DNA. Tako smo izračunali ΔC_t za vzorec (ΔC_{tV}).

Enačba 1: Izračun ΔCt za vzorec (ΔCtV).

$$C_{ttel} = 4 + Ct_{tel}$$
$$\Delta CtV = Ct_{tel} - Ct_{ref.gen}$$

Izračunali smo standardni odklon (SD) vrednosti ΔCt za vsak vzorec (ΔCtV). SD je statistični kazalec razpršenosti preiskovanih vrednosti, ki jih vsebuje populacija, pove nam koliko vrednosti odstopajo od povprečja.

Enačba 2: Izračun standardnega odklona.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

Pri vzorcih, kjer je bila SD ΔCtV večja od 5 % povprečne vrednosti ΔCtV teh meritev, smo ΔCtV vrednost z največjim odklonom odstranili iz nadaljnje analize. Pri tem smo meritev za posamezen vzorec sprejeli kot veljavno, če sta bili uspešno določeni dve ΔCtV meritvi s SD ΔCtV manjšo od 5 %.

Enačba 3: Izračun povprečja ΔCt vrednosti (povp. ΔCt).

$$povp.\Delta CtV = \frac{\Delta Ct1 + \Delta Ct2 + \Delta Ct3}{3}$$

V eksperimentu smo uporabili referenčni vzorec (RV), za katerega smo po enakem postopku kot za preiskovani vzorec (V) izračunali ΔCt , povp. ΔCt in SD.

Enačba 4: Izračun relativne dolžine telomerov (T/S).

$$T/S = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$
$$\Delta \Delta Ct = povp.\Delta CtV - povp.\Delta CtRV$$

Ker je bil vsak vzorec določen 3-krat, smo določili tri T/S vrednosti za posamezen preiskovan vzorec. Za vse tri meritve smo izračunali standardni odklon T/S vrednosti. V primeru odstopanja standardnega odklona T/S vrednosti meritev nad 15 % smo meritev z največjim odklonom izločili iz nadaljnje analize, za katero sta bili potrebni vsaj dve T/S vrednosti.

3.2.5 STATISTIČNA ANALIZA

Klinične značilnosti preiskovancev s SBT1 smo zbrali in uredili v računalniškem programu Microsoft Office Excel 2010. Skupina preiskovancev s slabo glikemično urejenostjo SBT1 in skupina preiskovancev z dobro glikemično urejenostjo SBT1 sta se med seboj razlikovali v vrednosti HbA1c, kar smo statistično dokazali z neodvisnim t-testom za normalno porazdeljene preiskovane vrednosti. Ostale neodvisne spremenljivke, ki smo jih primerjali med skupinama, so bile: spol, starost ob izbruhu bolezni, starost ob prvi izolaciji DNA, starost ob zadnji izolaciji DNA, trajanje bolezni ob zadnjem izmerjenem vzorcu in se med primerjanima skupinama niso signifikantno razlikovale. Za normalno porazdeljene spremenljivke smo uporabili parametrični neodvisni t-test, za nenormalno porazdeljene spremenljivke neparametrični Mann-Whitneyev test. Porazdelitev spremenljivk smo preverili z D'Agostino Pearsonovim testom normalnosti in glede na to izbrali ustrezen statistični test. V primeru, da so vrednosti P dobljene z D'Agostino Pearsonovim testom večje od 0,05 ($P > 0,05$), se spremenljivke porazdeljujejo normalno. Spremenljivko smo opredelili kot statistično značilno, kadar je bil izid neodvisnega t-testa oz. Mann-Whitneyevega testa vrednost $P < 0,05$.

V računalniškem programu Microsoft Office Excel 2010 smo eksperimentalno pridobljene podatke, to so bile vrednosti Ct za telomere in referenčni gen, uredili in izračunali vrednosti T/S, ki smo jih nato izvozili v program za statistično obdelavo podatkov GraphPad Prism 6. Analizo linearne regresije smo izvedli z vrednostmi T/S in z grafi linearne regresije prikazali dinamiko dolžin telomerov pri dobri in slabi glikemični urejenosti SBT1.

Enostavna linearna regresija je študij povezave odvisne spremenljivke (y) z neodvisno spremenljivko (x), kjer vrednost odvisne spremenljivke y želimo izraziti s pomočjo neodvisne spremenljivke x v obliki linearne zveze: $y = a + bx$ (66). V našem eksperimentu je bila odvisna spremenljivka relativna dolžina telomerov (T/S), neodvisna spremenljivka pa leto izolacije vzorca DNA.

Z GraphPad Prism 6 smo z ustrezno izbiro računske metode izračunali povprečje vseh treh meritev relativne dolžine telomerov (T/S) za posamezen vzorec in z izračunanim povprečjem T/S izrisali linearno regresijsko premico $y = a + bx$ za posameznega preiskovanca, ki je predstavljala najboljše linearno prileganje na povprečje treh meritev T/S. Z določitvijo linearne regresije smo za preiskovance določili naklone premic, ki predstavljajo dinamiko dolžin telomerov v preiskovanem obdobju. V kolikor se podatki v ravnini grafa dobro prilegajo regresijski premici, med spremenljivkama T/S in letom izolacije DNA obstaja močna povezanost (pozitivna, negativna).

Računsko smo povezanost spremenljivke T/S in leta izolacije DNA določili z izračunom Pearsonovega oziroma Spearmanovega koeficienta korelacije. Izbira je odvisna od porazdelitve podatkov (vrednosti T/S), katero smo preverili s Kolmogorov-Smirnovim testom. Če so bili podatki porazdeljeni normalno, smo izračunali Pearsonov korelacijski koeficient, katerega vrednost se nahaja med vrednostma -1 (na grafu navzdol usmerjena premica) in 1 (na grafu navzgor usmerjena premica). Vrednost 1 oz. -1 pomeni popolno linearno povezanost spremenljivk, medtem ko vrednost 0 označuje ničelni vpliv ene spremenljivke na drugo (67, 68).

S statističnimi metodami smo primerjali naklone premic skupin preiskovancev z različno glikemično urejenostjo SBT1, ki smo jih določili z linearno analizo in s tem določili razliko v dinamiki dolžin telomerov med preiskovanimi skupinami. Za statistično primerjavo dinamike telomerov med skupinama so bile uporabljene metode: parametrični parni t-test, neparametrični Wilcoxonov test in dvosmerna analiza variance (angl. *two-way ANOVA*).

Porazdelitev naklonov skupine bolnikov s slabo glikemično urejenostjo SBT1 in skupine z dobro glikemično urejenostjo SBT1 smo preverili s Kolmogorov-Smirnovim testom. Pri normalni porazdelitvi naklonov smo uporabili parni t-test, pri nenormalni Wilcoxonov test. Statistično značilno razliko v dinamiki dolžine telomerov med primerjanima skupinama smo dokazali v primeru, da je bila vrednost $P < 0,05$.

ANOVA je statistična metoda za statistično primerjavo, ki jo lahko uporabimo, kadar so podatki normalno porazdeljeni (69). Z ANOVO smo primerjali naklone premic linearne regresije skupine s slabo glikemično urejenostjo SBT1, skupine 1 in skupine 2 z dobro glikemično urejenostjo SBT1. Statistično značilno razliko v dinamiki dolžine telomerov med skupinama smo določili, če je bila vrednost $P < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 KLINIČNE ZNAČILNOSTI BOLNIKOV S SLADKORNO BOLEZNIJO TIPA 1

V opravljeni raziskavi, kjer smo določali relativne dolžine telomerov bolnikov z dobro in slabo glikemično urejenostjo SBT1, je bilo vključenih 24 preiskovancev, 14 dečkov in 10 deklic, brez drugih diagnosticiranih avtoimunskih bolezni. Osnovne klinične značilnosti celotne preučevane populacije s SBT1 smo podali v Preglednici IV, kjer so podane povprečne vrednosti spremenljivk s standardnimi odkloni.

Preglednica IV. Osnovne klinične značilnosti preiskovancev s SBT1 vključenih v raziskavo.

Spremenljivka	Vrednost
Spol (moški/ženske)	14/10
Starost ob izbruhu bolezni (leta)	8,75 ± 4,44
Starost ob prvi izolaciji DNA (leta)	11,88 ± 3,94
Starost ob zadnji izolaciji DNA (leta)	14,96 ± 5,24
Trajanje bolezni ob zadnjem izmerjenem vzorcu (leta)	8,29 ± 2,91
HbA1c (%)	7,94 ± 1,51

9 preiskovancev je imelo slabo glikemično urejenost SBT1 s povprečno vrednostjo HbA1c nad 9 %, 15 dobro glikemično urejenost SBT1 s povprečno vrednostjo HbA1c pod 7,5 %.

Klinične značilnosti preiskovancev obeh skupin so podane v Preglednici V kot povprečne vrednosti spremenljivk s standardnimi odkloni.

Ujemanja in razlike med preiskovanima skupinama v posameznih spremenljivkah so v Preglednici V z navedenimi vrednostmi P. Statistično značilna razlika med skupino s slabo in skupino z dobro glikemično urejenostjo SBT1 je prisotna pri vrednosti HbA1c, kjer je dobljena vrednost P manjša od 0.0001. V ostalih spremenljivkah, podanih v Preglednici V se skupini statistično ne razlikujeta.

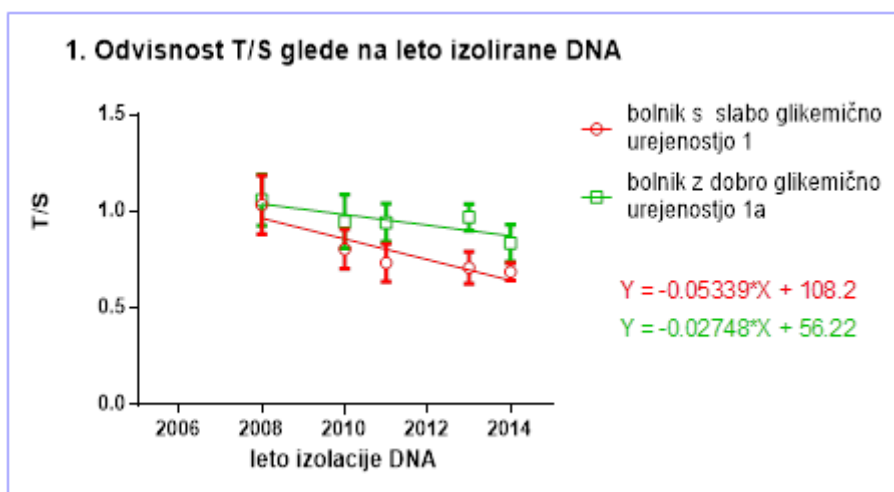
Preglednica V. Klinične značilnosti bolnikov iz skupine z dobro glikemično urejenostjo SBT1 in bolnikov iz skupine s slabo glikemično urejenostjo SBT1 ter razlike in ujemanja med skupinama. Porazdelitev med spoloma je bila glede na D'Agostino Pearsonov statistični test nenormalna, zato smo za primerjavo parametrov med skupinama uporabili Mann-Whitneyev test, katerega vrednost P je v preglednici označena z *. Ostale vrednosti parametrov s katerimi smo definirali skupine, so bile glede na D'Agostino Pearsonov test normalno porazdeljene, vrednosti P teh parametrov so rezultat neodvisnega t-testa. Statistično značilne razlike med skupinama smo določili, če je bila vrednost $P < 0,05$.

Spremenljivka	Skupina dobra glikemična urejenost SBT1 (HbA1c < 7,5 %)	Skupina slaba glikemična urejenost SBT1 (HbA1c > 9 %)	Vrednost P
Spol (moški/ženske)	9/6	5/4	>0,9999*
Starost ob izbruhu bolezni (leta)	8,67 ± 4,55	8,89 ± 4,51	0,9085
Starost ob prvi izolaciji DNA (leta)	11,93 ± 4,06	11,78 ± 3,96	0,9278
Starost ob zadnji izolaciji DNA (leta)	15,07 ± 5,40	14,78 ± 5,26	0,8993
Trajanje bolezni ob zadnjem izmerjenem vzorcu (leta)	8,4 ± 3,09	8,11 ± 2,76	0,8199
HbA1c	6,82 ± 0,58	9,63 ± 0,64	<0,0001

4.2 DOLOČANJE DINAMIKE DOLŽINE TELOMEROV V ODVISTNOSTI OD GLIKEMIČNE UREJENOSTI SBT1

Za posameznega preiskovanca smo z metodo PCR v realnem času določili relativne dolžine telomerov petim vzorcem DNA, ki so bili odvzeti pri vsakoletnih kontrolnih pregledih. Vsakemu vzorcu smo določili T/S trikrat. Povprečni standardni odklon vseh izmerjenih relativnih dolžin telomerov T/S vzorcev je bil 9 %.

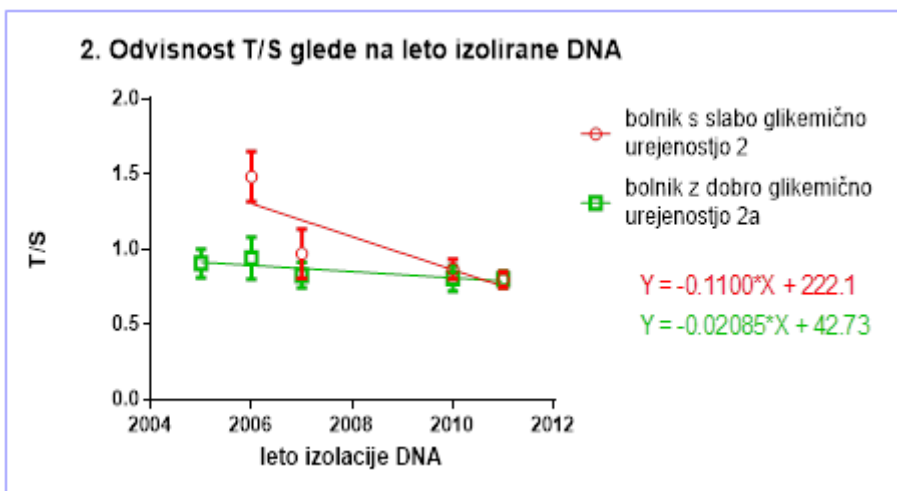
Dinamiko dolžine telomerov v preiskovanem obdobju smo za preiskovance s slabo glikemično urejenostjo SBT1 in za njihove ujemajoče preiskovance z dobro glikemično urejenostjo SBT1 določili z linearno regresijsko analizo relativne dolžine telomerov (T/S) od leta izolacije DNA (Slika 5-13) in tudi izrisali grafe za posamezne ujemajoče preiskovance. Šest preiskovancev s slabo glikemično urejenostjo SBT1 je imelo dva ujemajoča preiskovanca z dobro glikemično urejenostjo SBT1, trije preiskovanci s slabo glikemično urejenostjo SBT1 so imeli po enega ujemajočega preiskovanca z dobro glikemično urejenostjo SBT1.



Slika 5: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 1 in bolniku z dobro glikemično urejenostjo 1a.

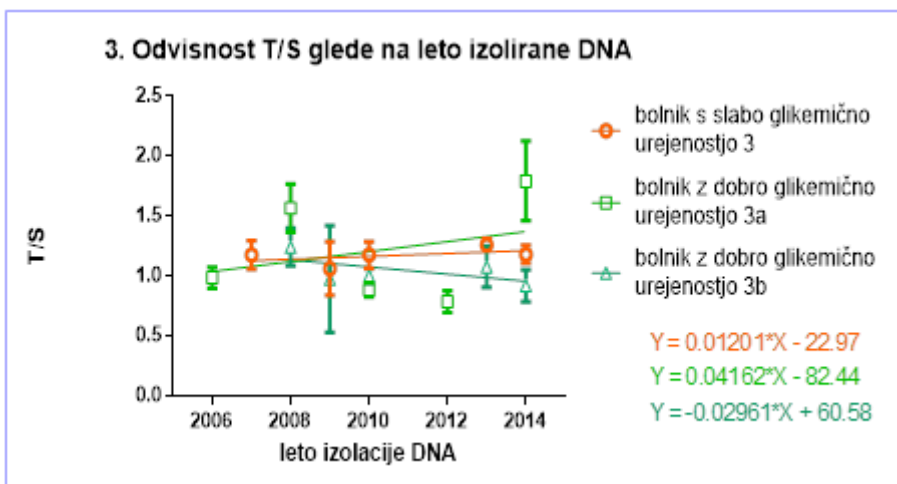
Iz grafa (Slika 5) je razviden padajoč naklon linearne regresijske premice pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 1 ($y = -0,05339x + 108,2$) in bolniku z dobro glikemično

urejenostjo 1a ($y = -0,02748x + 56,22$). Pearsonov koeficient korelacije pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 1 je $-0,9047$, pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 1a je $-0,8293$ in kaže strmejši naklon med spremenljivkama relativne dolžine telomerov (T/S) in leti izolirane DNA. Krajšanje telomerov je hitrejše pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 1 kot bolniku z dobro glikemično urejenostjo 1a.



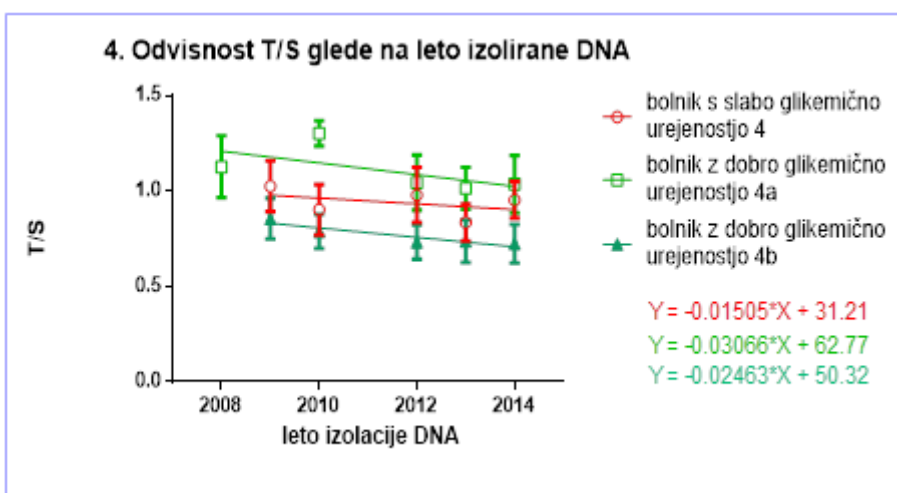
Slika 6: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 2 in bolniku z dobro glikemično urejenostjo 2a.

Na grafu (Slika 6) je viden padajoč naklon regresijske premice pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 2 ($y = -0,1100x + 222,1$) in bolniku z dobro glikemično urejenostjo 2a ($Y = -0,02085x + 42,73$). Pearsonov koeficient korelacije pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 2 je $-0,843$, pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 2a je $-0,852$, s čimer lahko trdimo, da pri obeh preiskovancih obstaja dobra negativna korelacija med spremenljivkama T/S in leti izolirane DNA. Večji naklon premice pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 2 nakazuje hitrejše krajšanje telomerov kot v primeru bolnika z dobro glikemično urejenostjo 2a.



Slika 7: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 3 in pri bolnikoma z dobro glikemično urejenostjo 3a in 3b.

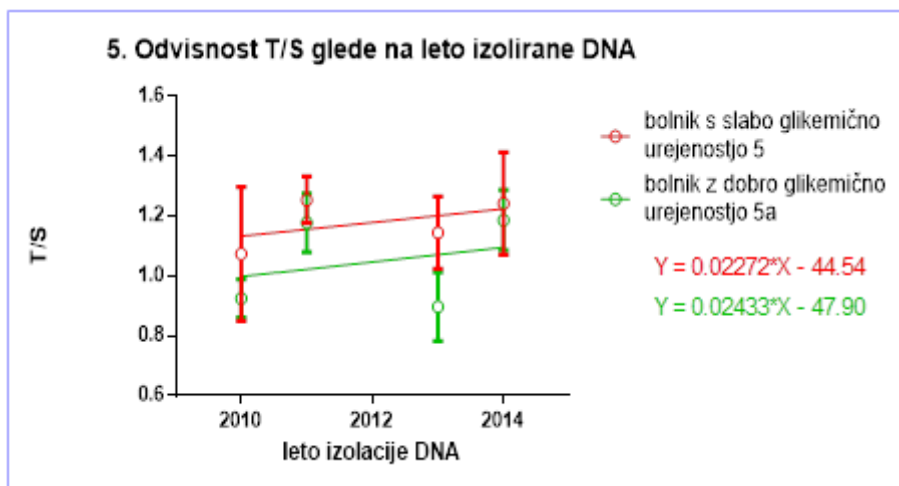
Zgornji graf (Slika 7) prikazuje padajoč naklon regresijske premice pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 3b ($y = -0,02961x + 60,58$) in naraščanje naklona premice pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 3 ($y = 0,01201x - 22,97$) ter bolniku z dobro glikemično urejenostjo 3a ($y = 0,04162x - 82,44$). Pearsonov koeficient korelacije pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 3 je 0,492, pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 3a je 0,295 in bolniku z dobro glikemično urejenostjo 3b je -0,556.



Slika 8: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 4 in pri bolnikoma z dobro glikemično urejenostjo 4a in 4b.

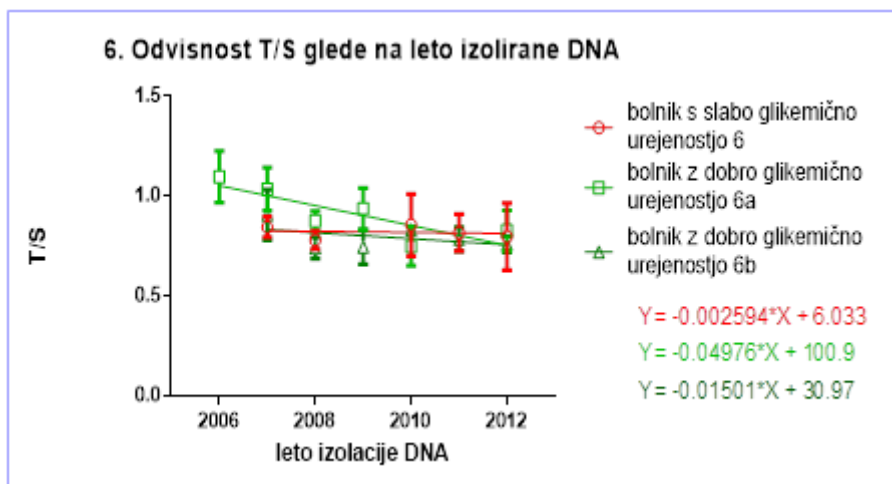
Na zgornjem grafu (Slika 8) je viden padajoč naklon regresijske premice pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 4 ($y = -0,01505x + 31,21$), bolniku z dobro glikemično

urejenostjo 4a ($y = -0,03066x + 62,77$) in bolniku z dobro glikemično urejenostjo 4b ($y = -0,02463x + 50,32$). Iz naklona je razvidno najhitrejše krajšanje telomerov pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 4a. Pearsonov koeficient korelacije pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 4 je $-0,428$, pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 4a je $-0,625$ in bolniku z dobro glikemično urejenostjo 4b je $-0,923$. Zelo dobra negativna korelacija med spremenljivkama T/S in leti izolacije je prisotna pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 4b.



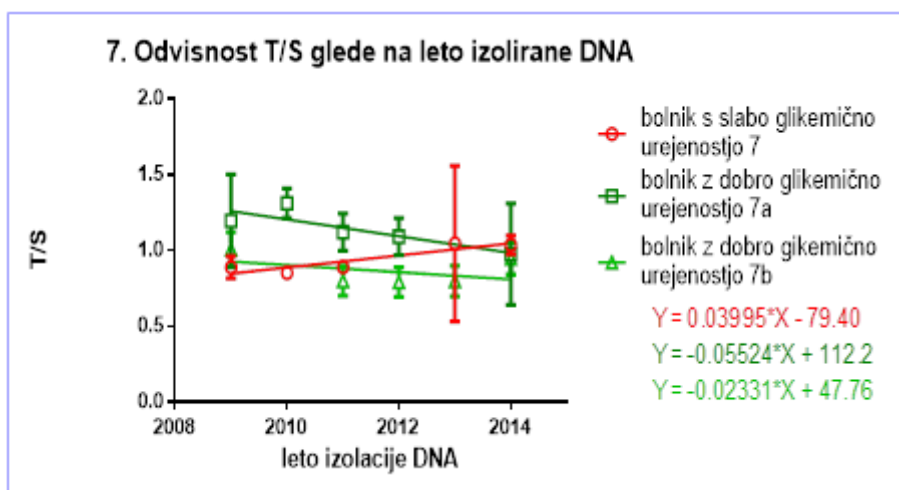
Slika 9: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 5 in pri bolnikoma z dobro glikemično urejenostjo 5a.

Zgornji graf (Slika 9) prikazuje naraščajoč naklon regresijske premice pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 5 ($y = 0,02272x - 44,54$) in bolniku z dobro glikemično urejenostjo 5a ($y = 0,02433x - 47,90$). Pearsonov koeficient korelacije pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 5 je $0,486$, pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 5a je $0,283$.



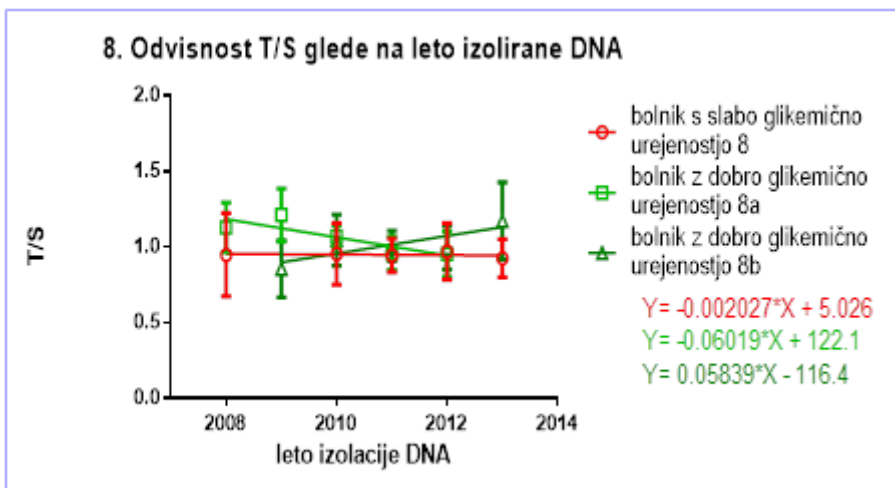
Slika 10: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 6 in pri bolnikoma z dobro glikemično urejenostjo 6a in 6b.

Iz zgornjega grafa (Slika 10) je razviden padajoč naklon regresijske premice pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 6 ($y = -0,002594x + 6,033$), bolniku z dobro glikemično urejenostjo 6a ($y = -0,04976x + 100,9$) in bolniku z dobro glikemično urejenostjo 6b ($y = -0,01501x + 30,97$). Iz naklona sklepamo, da je najhitrejše krajšanje telomerov pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 6a. Pearsonov koeficient korelacije pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 6 je $-0,171$, pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 6a je $-0,828$ in pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 6b je $-0,438$.



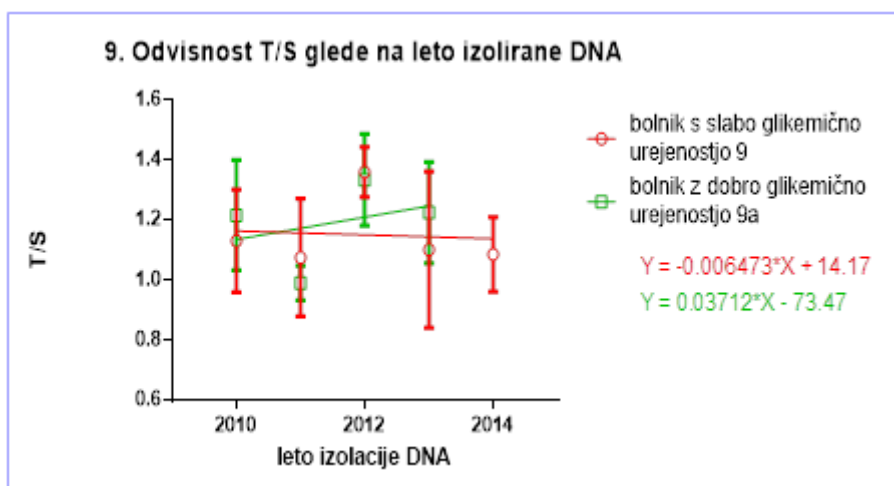
Slika 11: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 7 in pri bolnikoma z dobro glikemično urejenostjo 7a in 7b.

Na zgornjem grafu (Slika 11) je viden naraščajoč naklon regresijske premice pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 7 ($y = 0,03995x - 79,40$) ter padajoč naklon pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 7a ($y = -0,05524x + 112,2$) in bolniku z dobro glikemično urejenostjo 7b ($y = -0,02331x + 47,76$). Hitrejše krajšanje telomerov je opaziti pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 7a kot pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 7b. Pearsonov koeficient korelacije pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 7 je 0,907, pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 7a je -0,859. Spearmanov koeficient pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 7b je -0.300.



Slika 12: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 8 in pri bolnikoma z dobro glikemično urejenostjo 8a in 8b.

Iz zgornjega grafa (Slika 12) je razviden naraščajoč naklon regresijske premice pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 8b ($y = 0,05839x - 116,4$) ter padajoč naklon pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 8 ($y = -0,002027x + 5,026$) in bolniku z dobro glikemično urejenostjo 8a ($y = -0,06019x + 122,1$). Pearsonov koeficient korelacije pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 8a je -0,863, pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 8b je 0,813 in kaže v obeh primerih dobro linearno povezanost spremenljivke T/S z leti izolacije DNA. Pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 8 je Pearsonov koeficient korelacije -0,243.



Slika 13: Odvisnosti relativne dolžine telomerov glede na leto izolirane DNA pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 9 in pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 9a.

Na zgornjem grafu (Slika 13) je viden padajoč naklon regresijske premice pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 9 ($y = -0,006473x + 14,17$) in naraščajoč pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 9a ($y = 0,03712x - 73,47$). Spearmanov koeficient korelacije pri bolniku s slabo glikemično urejenostjo 9 je $-0,200$. Pri bolniku z dobro glikemično urejenostjo 9a je Pearsonov koeficient korelacije $0,332$.

Zbrane naklone premic linearnih regresij, ki predstavljajo dinamiko spreminjanja dolžine telomerov v časovni odvisnosti, preiskovancev s slabo glikemično urejenostjo SBT1 smo primerjali z nakloni premic preiskovancev z dobro glikemično urejenostjo SBT1 z uporabo parnega t-testa in Wilcoxonovega testa ter z dvosmerno ANOVO.

Rezultati parnega t-testa in Wilcoxonovega testa, ki so podani v Preglednici VI kot vrednosti P, dokazujejo, da ni statistično značilne razlike v dinamiki dolžine telomerov med preiskovanimi skupinami.

Preglednica VI. Vrednosti P parnega t-testa oz. Wilcoxonovega testa primerjav med skupinami preiskovancev z dobro glikemično urejenostjo SBT1 (skupina 1 in 2) in slabo glikemično urejenostjo SBT1. Vrednosti P Wilcoxonovega testa so označene z *, ostale vrednosti P so rezultat parnega t-testa pri normalni porazdelitvi naklonov. Statistično značilna razlika v dinamiki dolžine telomerov, če $P < 0,05$.

Primerjane skupine	Vrednost P
Skupina slaba glikemična urejenost SBT1 in Skupina 1 dobra glikemična urejenost SBT1 (vsi preiskovanci)	0,1696
Skupina slaba glikemična urejenost SBT1 in Skupina 2 dobra glikemična urejenost SBT1 (preiskovanci 3, 4, 5, 6, 7, 8)	0,3125*
Skupina 1 dobra glikemična urejenost SBT1 in Skupina 2 dobra glikemična urejenost SBT1 (preiskovanci 3, 4, 5, 6, 7, 8)	0,8438*

Rezultati dvosmerne ANOVE niso pokazali statistično značilne razlike v dinamiki dolžine telomerov med skupino s slabo glikemično urejenostjo SBT1 in skupino 1 z dobro glikemično urejenostjo SBT1. Prav tako ni bila ugotovljena statistično značilna razlika v dinamiki dolžine telomerov med skupino s slabo glikemično urejenostjo SBT1, skupino 1 z dobro glikemično urejenostjo SBT1 in skupino 2 z dobro glikemično urejenostjo SBT1 (Preglednica VII).

Preglednica VII. Rezultati dvosmerne ANOVE pri opredelitvi razlik v dinamiki dolžine telomerov med skupinami.

Primerjane skupine	Vrednost P
Skupina slaba glikemična urejenost SBT1 in Skupina 1 dobra glikemična urejenost SBT1 (vsi preiskovanci)	0,4568
Skupina slaba glikemična urejenost SBT1, Skupina 1 dobra glikemična urejenost SBT1 in Skupina 2 dobra glikemična urejenost SBT1 (preiskovanci 3,4, 5, 6, 7)	0,4678

5 RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo želeli opredeliti vpliv glikemične urejenosti SBT1 na spreminjanje dolžine telomerov pri otrocih in mladostnikih s SBT1. V prejšnjih raziskavah je bilo dokazano, da imajo bolniki s SBT1 krajše telomere kot zdravi preiskovanci (57). V eni izmed raziskav so preučevali vpliv glikemične urejenosti na dolžino telomerov pri odraslih preiskovancih z dlje časa trajajočo SBT1, pri čemer je bilo ugotovljeno, da imajo bolniki s slabo glikemično urejenostjo SBT1 krajše telomere kot tisti z dobro glikemično urejenostjo SBT1 (58). Vpliv glikemične urejenosti SBT1 na dolžino telomerov pri mlajši populaciji v dosedanjih raziskavah zaenkrat še ni bil raziskovan.

Raziskavo smo opravili na 24 preiskovancih s SBT1, ki so bili ob prvi izolaciji DNA, ki smo jo uporabili v raziskavi, stari od 3 do 16 let. Izbranim vzorcem DNA smo določali dolžino telomerov vsaj štirikrat v obdobju zadnjih 6 let. Znano je, da se dolžina telomerov z leti krajša (40), da obstajajo razlike v dolžini telomerov med spoloma (42), pri bolnikih s SBT1 pa na dolžino telomerov vpliva tudi trajanje bolezni (59). Ker smo želeli zmanjšati vpliv teh dejavnikov, so se primerjani preiskovanci v naši raziskavi ujemali po spolu, starosti, trajanju bolezni. Razlikovali pa so se v povprečni vrednosti HbA1c, kar nam je omogočilo jasnejšo opredelitev vpliva glikemične urejenosti na dinamiko spreminjanja dolžine telomerov. Prav tako smo iz raziskave izključili preiskovance s spremljajočimi drugimi avtoimunskimi boleznimi, saj bi lahko druge avtoimunske bolezni pospešile krajšanje telomerov in bi s tem zakrile vpliv glikemične urejenosti na dolžine telomerov. Predpostavili smo, da je pri slabi glikemični urejenosti SBT1, za katero je značilna povišana koncentracija glukoze v krvi in s tem povezan povečan oksidativni stres, dinamika spreminjanja dolžine telomerov drugačna oz. je krajšanje telomerov hitrejše kot pri dobri glikemični urejenosti SBT1.

Vpliva glikemične urejenosti na spreminjanje dolžine telomerov na naših vzorcih nismo opazili, saj nam statistično značilne razlike v dinamiki dolžine telomerov med preiskovanci s slabo glikemično urejenostjo SBT1 in preiskovanci z dobro glikemično urejenostjo SBT1 ni uspelo dokazati.

Iz grafov linearne regresije odvisnosti relativne dolžine telomerov z leti izolacije DNA opazimo, da krajšanje telomerov ni bilo vedno hitrejše pri bolnikih s slabo glikemično urejenostjo SBT1 kot pri bolnikih z dobro glikemično urejenostjo SBT1 (Slika 7, 8, 10, 11, 12). Pri nekaterih preiskovancih je mogoče opaziti celo podaljševanje dolžine telomerov s starostjo preiskovancev, tako pri bolnikih s slabo glikemično urejenostjo kakor tudi pri bolnikih z dobro glikemično urejenostjo SBT1 (Slika 7, 9, 11, 12, 13). V prejšnjih raziskavah so Chen in sodelavci (70) daljšanje dolžine telomerov pripisali napakam pri merjenju ali napakam pri regresijski analizi, kar bi bilo možno tudi pri določanju dolžin telomerov in telomerne dinamike naših preiskovancev. Pri drugih raziskavah je bilo jasno, da do daljšanja telomerov ne pride zaradi napake pri meritvah ali analizi, ampak zaradi uravnavanja dolžin telomerov s telomerozo (71). Telomeri so dinamična struktura in obstaja nekaj dokazov, da se lahko daljšajo s časom, kar pa še ni najbolje raziskano (72). Morda je vzdrževanje dolžine telomerov in daljšanje telomerov mogoče opaziti pri merjenju dolžin telomerov v krajšem časovnem obdobju (npr. 2-6 let) zaradi prerazporeditve celičnih subpopulacij med krvjo in tkivi, nadomestitve celic v obtoku in sprememb v deležu različnih tipov celic, kar lahko prispeva k navideznemu daljšanju telomerov. Daljše kot je obdobje merjenja telomerov (10 let ali več), manj verjetno je, da bi opazili navidezno podaljševanje dolžin telomerov (71), ki smo ga opazili pri naših preiskovancih.

Vzorec iz katerega smo izolirali DNA je bil polna kri, pri čemer smo merili dolžine telomerov vseh celic z jedrom v krvi, kar je lahko prispevalo k temu, da vpliva glikemične urejenosti na dinamiko spreminjanja dolžin telomerov nismo opazili. Levkociti so heterogena celična populacija sestavljena iz granulocitov, monocitov in limfocitov (limfociti T; celice CD4+ in celice CD8+, limfociti B, naravne celice ubijalke), ki imajo različno povprečno telomerno dolžino in različno hitrost krajšanja telomerov v različnih življenjskih obdobjih (73).

Nihanja v deležu levkocitnih populacij lahko pomembno vplivajo na dolžino telomerov, kar prispeva k variabilnosti telomerne dolžine pri vsakem posamezniku in tudi med posamezniki (71, 74-76). Razmerje v zastopanosti različnih tipov celic se spreminja s staranjem, vključno s povečanjem števila monocitov, znižanjem limfocitov, znižanjem naivnih limfocitov in povečanjem števila spominskih limfocitov (77).

Limfociti imajo precej različne dolžine telomerov in hitrost krajšanja telomerov. Možna razlaga za to je postopna diferenciacija naivnih celic T v spominske celice, ki imajo krajše telomere kot naivne celice T (78, 79). Na dolžino telomerov lahko delujejo tudi drugi zunanji dejavniki (npr. zmerna fizična aktivnost), ki stimulirajo proliferacijo naivnih limfocitov T, kar povzroči navidezno podaljšanje dolžine telomerov, merjenih pri vzorcih DNA izoliranih iz polne krvi (71).

Na dolžino telomerov vpliva tudi telomerazna aktivnost, ki variira med različnimi tipi celic imunskega sistema (72, 80). Med levkocitnimi populacijami so do sedaj zaznali telomerazno aktivnost v limfocitih T in limfocitih B, njena aktivnost pa ni bila zaznana v nevtrofilcih (76, 81). Pri preučevanju podvrsti limfocitov se je izkazalo, da imajo limfociti B daljše dolžine telomerov in višjo telomerazno aktivnost od ostalih vrst limfocitov, ki ne le ščiti pred krajšanjem telomerov, ampak lahko telomere tudi podaljša (76, 82). Aktivnost telomeraze v limfocitih se poviša z antigensko aktivacijo, ki inducira telomerazno aktivnost in se zniža ob prehodu naivnih limfocitov T in limfocitov B v spominske celice, zato so telomere daljše v naivnih limfocitih T kot v spominskih celicah (75). Prav tako lahko fizična aktivnost zviša aktivnost telomeraze (71). V eni izmed raziskav je bilo ugotovljeno, da lahko telomerazno aktivnost zniža slaba glikemična urejenost SB (SBT1 in SBT2), saj je bila telomerazna aktivnost signifikantno nižja pri sladkornih bolnikih z vrednostjo HbA1c več kot 7 % kot pri sladkornih bolnikih z vrednostjo HbA1c manj kot 7 % (84). Za jasnejšo opredelitev dolžine telomerov bi bilo morda smiselno določati tudi telomerazno aktivnost v celicah iz katerih se izolira DNA.

Velik vpliv na dolžino in na dinamiko spreminjanja dolžine telomerov imajo tudi genetski in okoljski dejavniki, kar je lahko prispevalo k temu, da vpliva glikemične urejenosti na naših vzorcih nismo opazili. Znano je, da na dolžino telomerov vplivajo genetski dejavniki, saj se dolžine telomerov razlikujejo med posamezniki že ob rojstvu. Na dolžino telomerov naj bi vplivala starost očeta ob rojstvu, kjer imajo otroci starejših očetov ob rojstvu daljše telomere, medtem ko med spoloma v otroštvu ni bilo opažene razlike (84). Tudi teža otroka ob rojstvu naj bi vplivala na dolžino telomerov, saj so imeli otroci z nižjo porodno telesno težo ob rojstvu krajše telomere kot njihovi sovrstniki z normalno telesno težo ob rojstvu (73). Poleg razlik v dolžini telomerov med posamezniki, je bila v naši raziskavi temeljnega pomena predvsem dinamika spreminjanja dolžine telomerov, pri čemer je bilo

v prejšnjih raziskavah ugotovljeno, da se tekom življenja daljši telomeri krajšajo hitreje kot krajši telomeri zaradi večje površine na katero lahko deluje oksidativni stres. Za preiskovance, ki smo jih vključili v raziskavo, podatkov o okoljski dejavniki kot so življenjski slog, prehrana, fizična aktivnost, virusne okužbe, psihološki stres in pomembno vplivajo na spreminjanje dolžine telomerov, niso bili na voljo.

Veliko raziskav je bilo osredotočenih na vpliv psihosocialnega stresa (slabi družinski odnosi, konflikti, nasilje, pretiran nadzor) na dolžino telomerov, pri čemer je bilo v 12 od 14 raziskav dokazano, da povečan psihosocialni stres korelira s krajšimi telomeri pri otrocih in odraslih (87). Stres poveča sproščanje stresnega hormona kortizola, ki je povezan z zmanjšano telomerazno aktivnostjo limfocitov T in povišanim nivojem oksidativnega stresa, povišanimi koncentracijami vnetnih citokinov, zviša pa se tudi proliferacija imunskih celic, kar vodi v hitrejše krajšanje telomerov (72, 85-87). Obstajajo hipoteze, da naj bi z zdravim življenjskim slogom, torej z manj stresa, več fizične aktivnosti in zdravo prehrano, lahko vplivali na vzdrževanje in celo na podaljševanje dolžine telomerov.

Na dolžino telomerov vpliva tudi stanje trenutnega imunskega sistema. Torej manj aktiviran ali zavrt imunski sistem lahko teoretično povzroči počasnejše krajšanje dolžin telomerov zaradi manjše celične proliferacije (80). Okužba z virusom ali reaktivacija virusa aktivira imunski sistem in povzroči skrajšanje dolžine telomerov. Večina ljudi je pozitivnih na latentne viruse, kot sta virus Epstein-Barr in citomegalovirus. Kronični stres lahko reaktivira latentni virus, zmanjša telomerazno aktivnost, aktivira imunski sistem in povzroči proliferacijo imunskih celic, kar skrajša dolžine telomerov (71). Okužba z virusom Epstein-Barr in citomegalovirusom povzroči obsežno proliferacijo limfocitov T. Dolžina telomerov limfocitov T se med akutno fazo virusne okužbe in še nekaj časa po preboleli okužbi vzdržuje oz. so telomere obolelih preiskovancev daljše od dolžin telomerov zdravih preiskovancev zaradi povečane telomerazne aktivnosti, ki nato sčasoma upade, dolžine telomerov pa se skrajšajo. Zaradi z virusi posredovanih sprememb v aktivnosti telomeraze in spremembah v populacijah celic imunskega sistema ob okužbah je možno, da lahko pri preiskovancih opazimo navidezno podaljševanje dolžin telomerov. Že med okužbo, kakor tudi po okužbi, se spremeni populacija limfocitov T, saj se zniža število naivnih celic in poviša število višje diferenciranih limfocitov T, ki imajo z višjo

stopnjo diferenciacije manjšo telomerazno aktivnost in krajše dolžine telomerov (88, 89). Podatkov o virusnih okužbah preiskovancev nimamo, ne vemo pa tudi kako močan vpliv imajo virusne okužbe na dinamiko dolžine telomerov pri spremljanju dolžin telomerov v daljšem časovnem obdobju in ali lahko te okužbe zakrijejo vpliv glikemične urejenosti.

Znano je, da so pri bolnikih s SB pogostejše bakterijske okužbe, predvsem okužbe respiratornega in urinarnega trakta ter kože, saj hiperglikemija pri SB zavira delovanje imunskega sistema (90). S slabo glikemično urejenostjo SB narašča dovzetnost za zaplete SB in okužbe. Možno je, da okužbe poslabšajo glikemično urejenost SB, saj vnetje, ki je posledica okužbe zmanjša občutljivost bolnikov na inzulin in posledično se poveša koncentracija glukoze v krvi, vendar pa aktivacija vnetnega odgovora pri nekaterih okužbah ni dovolj za poslabšanje glikemične urejenosti SB (91). Okužbe bi z aktivacijo imunskega sistema skupaj s poslabšano glikemično urejenostjo SB zaradi okužbe in spremljajočim povečanim oksidativnim stresom lahko vplivale na dolžino telomerov posamezne meritve pri preiskovancih, vendar to verjetno ne traja več let in ne spremeni bistveno dinamike telomerov naših preiskovancev, saj smo vključili preiskovance s konstantno glikemično urejenostjo.

Raziskave vpliva prehrane na dolžine telomerov kažejo, da ima hrana bogata z vlakninami in mikronutrienti, kot so vitamin C, vitamin E, folna kislina, omega-3 maščobne kisline, antioksidativne lastnosti, saj zmanjša oksidativni stres, s čimer lahko upočasnjuje krajšanje telomerov (92, 93). Debelost pri odraslih poveča tvorbo ROS, poveša nivo vnetja in pospeši krajšanje telomerov, medtem ko pri otrocih vpliv debelosti na dolžino telomerov še ni povsem pojasnjen, saj so rezultati dosedanjih raziskav neskladni. Zannolli in sodelavci niso dokazali razlike v dolžini levkocitnih telomerov med otroci s prekomerno telesno težo in otroci z normalno telesno težo (94). Al-Attaset in sodelavci so opazili krajše dolžine telomerov v otroštvu pri dečkih s prekomerno telesno težo, kar ni bilo opaženo pri deklicah (95). V eni izmed francoskih raziskav je bilo dokazano, da imajo dečki in deklice s prekomerno telesno težo signifikantno krajše telomere v primerjavi s tistimi z normalno telesno težo (96), kar je lahko vzrok spreminjajoče dolžine telomerov, ki smo jo opazili pri naših preiskovancih.

Dejanski vpliv glikemične urejenosti na spremembo dolžine telomerov je lahko pri preiskovancih, ki smo jih vključili v raziskavo, zakril vpliv pubertete, ki se pri posameznikih začne različno. Za puberteto so značilne hormonske spremembe, ki vplivajo na indeks telesne teže, oksidativni stres, aktivnost imunskega sistema in posledično na dolžino telomerov. Aktivnost imunskega sistema je največja v obdobju pubertete nato postopoma upada s starostjo zaradi atrofije timusa in zmanjšanja T celično posredovanega imunskega odgovora. Visoka koncentracija spolnih hormonov (estrogeni, androgeni) v obdobju pubertete lahko vpliva posredno na delovanje imunskega sistema, z delovanjem na receptorje celic imunskega sistema, saj imajo mnoge celice udeležene v imunskem odgovoru receptorje za spolne hormone (97, 98). Višji nivo estrogena zmanjšuje oksidativni stres, nastanek ROS in vnetje ter stimulira telomerazno aktivnost, kar lahko pripomore k upočasnjemu krajšanju telomerov. To prispeva k daljšim telomerom pri ženskah, ki imajo višji nivo estrogena kot moški, in s tem tudi daljše telomere. Da estrogen prispeva k daljšim telomeram, je bilo dokazano tudi pri ženskah v menopavzi, ki so prejemale hormonsko terapijo z estrogenom, saj so bile njihovi telomeri daljši kot pri ženskah, ki hormonski terapiji z estrogenom niso bile izpostavljene (99, 100). Za zmanjšanje vpliva pubertete bi bilo smiselno preveriti v klinični dokumentaciji, kdaj je bil opazen pojav začetka pubertete in preveriti, kako sama puberteta vpliva na dolžine telomerov.

Rezultati so nam razkrili, da je dinamika spreminjanja dolžine telomerov bolj zapletena kot smo predvidevali, saj se razlikuje med posamezniki, nanjo pa vplivajo številni dejavniki tekom življenja. Ovrednotenje vpliva dejavnika s šibkim vplivom (npr. vpliv glikemične urejenosti) na spreminjanje dolžine telomerov je zelo oteženo, saj ga lahko drugi dejavniki zakrijejo. Morda bi bilo ta vpliv lažje ovrednotiti pri bolnikih s še slabšo urejeno sladkorno boleznijo, ki bi imeli več let še višje vrednosti glikiranega hemoglobina.

V prihodnosti bi bilo v primeru nadaljevanja raziskave priporočljivo podaljšati časovno obdobje določanja dolžin telomerov na 10 let ali več, tako bi imela nihanja v dolžini telomerov zaradi vseh možnih dejavnikov manjši vpliv na spreminjanje dolžine telomerov. Priporočljivo bi bilo DNA izolirati iz posameznega tipa krvnih celic npr. iz nevtrofilcev, pri katerih ni bilo opažene telomerazne aktivnosti, s čimer bi izključili vpliv tega dejavnika na spreminjanje dolžine telomerov. V primeru določanja dolžin telomerov celic, v katerih

je opaziti telomerazno aktivnost, bi morda bilo smiselno določati telomerazno aktivnost v teh celicah. Izolacija posameznega tipa celic bi bila sicer cenovno dražja in zahtevnejša kot pridobitev celotne populacije levkocitov iz krvi, vendar se bi pri določanju dolžine posameznega tipa celic izognili navideznim spremembam dolžin telomerov, ki nastanejo zaradi sprememb v deležu posameznih tipov celic. Smiselno bi bilo pridobiti tudi podatke o življenjskemu slogu preiskovancev, njihovi fizični aktivnosti, telesni teži, prehrani in o prebolelih virusnih okužbah ter ovrednotiti vpliv tudi teh dejavnikov.

6 SKLEP

Vpliv glikemične urejenosti SBT1 na dinamiko spreminjanja dolžine telomerov pri otrocih in mladostnikih s SBT1 je še popolnoma neraziskan. Hipoteza te raziskave je bila, da glikemična urejenost SBT1 vpliva na dinamiko spreminjanja dolžin telomerov pri pediatričnih bolnikih s SBT1. Žal rezultati raziskave ne kažejo statistično značilne razlike med preiskovanci z več let trajajočo slabo glikemično urejenostjo SBT1 in njihovimi ujemajočimi preiskovanci z dobro glikemično urejenostjo SBT1 in tako hipoteze nismo potrdili. Vendar s tem vpliva glikemična urejenost na dinamiko spreminjanja dolžine telomerov ne moremo dokončno izključiti. Možno je, da vpliva glikemične urejenosti na dinamiko spreminjanja dolžine telomerov na naših vzorcih nismo opazili zaradi naslednjih vzrokov:

- analizirana DNA izolirana iz polne krvi in ne iz posameznih tipov celic,
- kratko časovno obdobje spremljanja dolžin telomerov,
- razlike v dolžini telomerov med posamezniki že ob rojstvu,
- premajhna razlika v glikemični urejenosti med skupinami bolnikov,
- vpliv pubertete,
- neopredeljen status oksidativnega stresa bolnika,
- vpliv genetskih in okoljskih dejavnikov,
- vpliv virusnih okužb.

Telomeri so dinamična struktura, katerih dolžina je karakteristična za vsakega posameznika in se nenehno spreminja. Raziskovalno delo nam je dalo vpogled v spreminjanje dolžine telomerov pri bolnikih s SBT1 in nas pripeljalo do zaključkov, da je telomerna dinamika zelo kompleksna. V prihodnje bi bilo morda smiselno za preiskovance pridobiti še več podatkov, ki so morda zakrili dejanski vpliv glikemične urejenosti SBT1 in ponoviti raziskavo na razširjenih in natančneje opredeljenih skupinah bolnikov.

7 LITERATURA

1. Ravnik Oblak M. Epidemiologija, opredelitev, razvrstitev, klinična slika in diagnoza sladkorne bolezni. In: Vujičić S, Poljanec Bohnec M, Žargaj B. Sladkorna bolezen: priročnik za zdravstvene delavce. Ljubljana: Slovensko osteološko društvo, 2013: 26-31.
2. Franc Mrevlje. Sladkorna bolezen tipa 1. Birografika Bori. Ljubljana: Klinika za endokrinologijo in bolezni presnove, 1995.
3. Surveillance WHOD of ND. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. 1999. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/66040> (dostopno: 5.6.2015).
4. Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. Diabetes Care. 2016: 39: S13–22.
5. Diagnosing Diabetes using HbA1c. <http://www.blizard.qmul.ac.uk/ceg-resource-library/clinical-guidance/clinical-guidelines/229-diagnosing-diabetes-using-hba1c-clinical-guideline-february-2013/file.html>. (dostopno 16.4.2016).
6. Nacionalni program za obvladovanje sladkorne bolezni. <http://sladkorna.ezdrav.si>. (dostopno: 5.6.2015).
7. Slovenia. Int. Diabetes Fed. <http://www.idf.org/membership/eur/slovenia#membership>. (dostopno: 14.12.2015).
8. Diabetes Atlas Int. Diabetes Fed. <http://www.idf.org/diabetesatlas>. (dostopno: 5.6.2015).
9. Inzulin. http://diabetescenter.si/inzulin_in_zdravljenje/. (dostopno:5.6.2015).
10. Janež A. Sladkorna bolezen tip 1. www.mf.uni-lj.si/dokumenti/ed33f7cf0280493bbe619d775f7fb4fc.doc. (dostopno: 6.6.2015).

11. Levy D. Type 1 Diabetes. Classification and aetiology. Oxford: Oxford University Press; 2011: 1–15.
12. Eisenbarth GS. Type I Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1986; 314: 1360–8.
13. Causes of Diabetes. <http://www.niddk.nih.gov/health-information/health-topics/Diabetes/causes-diabetes/Pages/index.aspx>. (dostopno: 19.10.2015).
14. Knip M, Veijola R, Virtanen SM, Hyöty H, Vaarala O, Åkerblom HK. Environmental Triggers and Determinants of Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2005; 54: S125–36.
15. Barnett AH, Eff C, Leslie RDG, Pyke DA. Diabetes in identical twins: a study of 200 pairs. *Diabetologia* 20: 87–93, 1981.
16. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet Lond. Engl.* 2000; 355: 873–6.
17. Åkerblom HK, Knip M. Putative environmental factors in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Rev* 14: 31–67, 1998.
18. Avbelj Stefanija M. Genetika sladkorne bolezni. In: Bratina N. Sladkorčki: vse, kar ste želeli vedeti o sladkorni bolezni. Ljubljana: Društvo za pomoč otrokom s presnovnimi motnjami, 2012 : 29–31.
19. Stankov K, Benc D, Draskovic D. Genetic and Epigenetic Factors in Etiology of Diabetes Mellitus Type 1. Clinical Centre of Vojvodina, Medical Faculty, University of Novi Sad. 2013.
20. Barker JM, Barriga KJ, Yu L, Miao D, Erlich HA, Norris JM, et al. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89: 3896–902.
21. Bach J-F. The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 911–20.

22. Simon B, Jabbour S, Flood J. Type 1 Diabetes in Adults. Oxford American Endocrinology Library Oxford University Press, 2011: 3–8.
23. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 1987; 329: 599–604.
24. Akerblom HK, Vaarala O, Hyöty H, Ilonen J, Knip M. Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am. J. Med. Genet.* 2002; 115: 18–29.
25. Zella JB, DeLuca HF. Vitamin D and autoimmune diabetes. *J. Cell. Biochem.* 2003; 88: 216–22.
26. Ziegler A-G, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *Jama*. 2003; 290: 1721–8.
27. Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth GS, Erlich HA, et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *Jama*. 2003; 290: 1713–20.
28. Gianani R, Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes: 2005. *Immunol. Rev.* 2005; 204: 232–49.
29. Marjan Vozelj. Temelji imunologije. 1. izdaja. Ljubljana: DZS, 2000: 297.
30. Nataša Uršič Bratina. Epidemiološko in genetsko ozadje sladkorne bolezni tip 1 pri otrocih in mladostnikih v Sloveniji. Ljubljana; 2006.
31. Zinc Transporter 8 (ZnT8) Antibody. http://www.questdiagnostics.com/testcenter/testguide.action?dc=TS_ZnT8_Antibody. (dostopno: 21.2.2016).
32. Boyer R. Temelji biokemije. Ljubljana: Študentska založba, 2005: 634–83.
33. Glycated hemoglobin.
https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Glycated_hemoglobin&oldid=692028155. (dostopno: 6.12.2015).

34. Spremljanje urejenosti glikemije v ambulantni obravnavi. <http://endodiab.si/wp-content/uploads/sites/2/2015/12/6.SPREMLJANJEUREJENOSTIGLIKEMIJEVAMBULANTNI.pdf>. (dostopno: 9.12.2015).
35. Association AD. Standards of Medical Care in Diabetes—2011. *Diabetes Care*. 2011; 34: S11–61.
36. Association AD. 11. Children and Adolescents. *Diabetes Care*. 2015; 38: S70–6.
37. Association AD, others. 6. Glycemic targets. *Diabetes Care*. 2015; 38: S33–40.
38. Zhao Z, Pan X, Liu L, Liu N. Telomere length maintenance, shortening, and lengthening. *J. Cell. Physiol*. 2014; 229: 1323–9.
39. Telomere Function. <http://www.news-medical.net/life-sciences/Telomere-Function.aspx> (dostopno: 26.6.2015).
40. Dahse R, Fiedler W, Ernst G. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. *Clin. Chem*. 1997; 43: 708–14.
41. Samassekou O, Gadjji M, Drouin R, Yan J. Sizing the ends: normal length of human telomeres. *Ann. Anat.-Anat. Anz*. 2010; 192: 284–91.
42. Oeseburg H, de Boer RA, van Gilst WH, van der Harst P. Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflüg. Arch.-Eur. J. Physiol*. 2010; 459: 259–68.
43. Shay JW, Wright WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*. 2005; 26: 867–74.
44. Kathy Burgoin. Stabilising G-quadruplex DNA - A New Cancer Cure. <http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/burgoine/origins.txt.html>. (dostopno: 29.7.2015).
45. Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med*. 2008; 44: 235–46.
46. Mather KA, Jorm AF, Parslow RA, Christensen H. Is telomere length a biomarker of aging? A review. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci*. 2011; 66: 202–13.

47. Kipling D. Telomeres, replicative senescence and human ageing. *Maturitas*. 2001; 38: 25–37.
48. Martínez P, Blasco MA. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat. Rev. Cancer*. 2011; 11: 161–76.
49. Zglinicki T, Martin-Ruiz CM. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr. Mol. Med*. 2005; 5: 197–203.
50. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet*. 2005; 6: 611–22.
51. Calado Rodrigo T. Progress in Molecular Biology and Translational Science. *Telomeres in Health and Disease*. Academic Press; 2014: 4–29.
52. Von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci*. 2002; 27: 339–44.
53. Ceriello A. Oxidative stress and glycemc regulation. *Metabolism*. 2000; 49: 27–9.
54. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc*. 2000; 17: 171–80.
55. Moussa SA. Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. *Romanian J. Biophys*. 2008; 18 : 225–236,
56. King GL, Loeken MR. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem. Cell Biol*. 2004; 122: 333–8.
57. Jeanclos E, Krolewski A, Skurnick J, Kimura M, Aviv H, Warram JH, et al. Shortened telomere length in white blood cells of patients with IDDM. *Diabetes*. 1998; 47: 482–6.
58. Uziel O, Singer JA, Danicek V, Sahar G, Berkov E, Luchansky M, et al. Telomere dynamics in arteries and mononuclear cells of diabetic patients: effect of diabetes and of glycemc control. *Exp. Gerontol*. 2007; 42: 971–8.

- 59.** Astrup AS, Tarnow L, Jorsal A, Lajer M, Nzietchueng R, Benetos A, et al. Telomere length predicts all-cause mortality in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2010; 53: 45–8.
- 60.** Fyhrquist F, Tiitu A, Saijonmaa O, Forsblom C, Groop P-H. Telomere length and progression of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *J. Intern. Med.* 2010; 2
- 61.** Tesovnik T, Kovac J, Hovnik T, Kotnik P, Battelino T, Trebusak PK. Association of Average Telomere Length with Body-Mass Index and Vitamin D Status in Juvenile Population with Type 1 Diabetes / Povezava Povprečnih Dolžin Telomerov Z Indeksom Telesne Teže in Vitaminom D Pri Mladostnikih S Sladkorno Boleznijo Tipa 1. *Slov. J. Public Health*. 2015; 54: 74–8.67: 278–86.
- 62.** Černe D, Ostanek B. Biomedicinska analitika I. Učbenik za študente laboratorijske biomedicine. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2012.
- 63.** Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 :e21.
- 64.** Lan Q, Cawthon R, Shen M, Weinstein SJ, Virtamo J, Lim U, et al. A prospective study of telomere length measured by monochrome multiplex quantitative PCR and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2009; 15: 7429–33.
- 65.** Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: e47–e47.
- 66.** Košmelj K. Uporabna statistika. http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf. (dostopno: 26.8.2015).
- 67.** Pearsonov koeficient korelacije. https://sl.wikipedia.org/w/index.php?title=Pearsonov_koeficient_korelacije&oldid=447688 6. (dostopno: 18.8.2015).

- 68.** Correlation. http://www.graphpad.com/guides/prism/6/statistics/index.htm?stat_analysis_checklist_correlation.htm. (dostopno: 20.8.2015).
- 69.** ANOVA (Analiza variance). <http://www.statistik.si/storitve/statisticne-analize-testi/anova-analiza-variance/>. (dostopno: 20.8.2015).
- 70.** Chen W, Kimura M, Kim S, Cao X, Srinivasan SR, Berenson GS, et al. Longitudinal versus cross-sectional evaluations of leukocyte telomere length dynamics: age-dependent telomere shortening is the rule. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2011: glq223.
- 71.** Epel E. How “reversible” is telomeric aging. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)*. 2012; 5: 1163–8.
- 72.** Shalev I. Early life stress and telomere length: investigating the connection and possible mechanisms. *Bioessays*. 2012; 34: 943–52.
- 73.** Sidorov I, Kimura M, Yashin A, Aviv A. Leukocyte telomere dynamics and human hematopoietic stem cell kinetics during somatic growth. *Exp. Hematol.* 2009; 37: 514–24.
- 74.** Spyridopoulos I, Hoffmann J, Aicher A, Brümmendorf TH, Doerr HW, Zeiher AM, et al. Accelerated Telomere Shortening in Leukocyte Subpopulations of Patients With Coronary Heart Disease Role of Cytomegalovirus Seropositivity. *Circulation*. 2009; 120: 1364–72.
- 75.** Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol. Rev.* 2008; 88: 557–79.
- 76.** Lin J, Epel E, Cheon J, Kroenke C, Sinclair E, Bigos M, et al. Analyses and comparisons of telomerase activity and telomere length in human T and B cells: insights for epidemiology of telomere maintenance. *J. Immunol. Methods*. 2010; 352: 71–80.
- 77.** Weng N. Telomeres and immune competency. *Curr. Opin. Immunol.* 2012; 24: 470–5.
- 78.** Rufer N, Brümmendorf TH, Kolvraa S, Bischoff C, Christensen K, Wadsworth L, et al. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J. Exp. Med.* 1999; 190: 157–68.

- 79.** Aubert G, Baerlocher GM, Vulto I, Poon SS, Lansdorp PM. Collapse of telomere homeostasis in hematopoietic cells caused by heterozygous mutations in telomerase genes. *PLoS Genet.* 2012; 8: e1002696.
- 80.** Svenson U, Nordfjall K, Baird D, Roger L, Osterman P, Hellenius M-L, et al. Blood cell telomere length is a dynamic feature. *PloS One.* 2011; 6: e21485.
- 81.** Robertson JD, Gale RE, Wynn RF, Dougal M, Linch DC, Testa NG, et al. Dynamics of telomere shortening in neutrophils and T lymphocytes during ageing and the relationship to skewed X chromosome inactivation patterns. *Br. J. Haematol.* 2000; 109: 272–9.
- 82.** Kark JD, Goldberger N, Kimura M, Sinnreich R, Aviv A. Energy intake and leukocyte telomere length in young adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 2012; 95: 479–87.
- 83.** El Badawy A, Shawky M, El Hammady AM, Ellassal M, Talaat A, Dabour A, et al. Telomerase Activity In Diabetic Patients With Angiopathy. http://www.bu.edu.eg.sci-hub.io/portal/uploads/Medicine/INTERNAL%20MEDICINE/343/publications/Amr%20Mustafa%20Abdelhamid%20Alhammady_telomerase%20activity%20in%20diabetic%20patients%20with%20angiopathy.docx. (dostopno: 30.1.1016).
- 84.** De Meyer T, Rietzschel ER, De Buyzere ML, De Bacquer D, Van Criekinge W, De Backer GG, et al. Paternal age at birth is an important determinant of offspring telomere length. *Hum. Mol. Genet.* 2007; 16: 3097–102.
- 85.** Zhu H, Belcher M, van der HARST P. Healthy aging and disease: role for telomere biology. *Clin. Sci.* 2011; 120: 427–40.
- 86.** Shalev I, Moffitt TE, Sugden K, Williams B, Houts RM, Danese A, et al. Exposure to violence during childhood is associated with telomere erosion from 5 to 10 years of age: a longitudinal study. *Mol. Psychiatry.* 2013; 18: 576–81.
- 87.** Næss AB, Kirkengen AL. Is childhood stress associated with shorter telomeres. *Tidsskr. Den Nor. Laegeforening Tidsskr. Prakt. Med. Ny Raekke.* 2015; 135: 1356–60.

- 88.** Plunkett FJ. The flow cytometric analysis of telomere length in antigen-specific CD8+ T cells during acute Epstein-Barr virus infection. *Blood*. 2001; 97: 700–7.
- 89.** Van de Berg PJ, Griffiths SJ, Yong S-L, Macaulay R, Bemelman FJ, Jackson S, et al. Cytomegalovirus infection reduces telomere length of the circulating T cell pool. *J. Immunol*. 2010; 184: 3417–23.
- 90.** Casqueiro J, Casqueiro J, Alves C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian J. Endocrinol. Metab*. 2012; 16 Suppl 1:S27–36.
- 91.** Simonsen JR, Harjutsalo V, Järvinen A, Kirveskari J, Forsblom C, Groop P-H, et al. Bacterial infections in patients with type 1 diabetes: a 14-year follow-up study. *BMJ Open Diabetes Res. Care*. 2015; 3: e000067.
- 92.** Shalev I, Entringer S, Wadhwa PD, Wolkowitz OM, Puterman E, Lin J, et al. Stress and telomere biology: a lifespan perspective. *Psychoneuroendocrinology*. 2013; 38: 1835–42.
- 93.** Frenck RW, Blackburn EH, Shannon KM. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1998; 95: 5607–10.
- 94.** Zannolli R, Mohn A, Buoni S, Pietrobelli A, Messina M, Chiarelli F, et al. Telomere length and obesity. *Acta Paediatr*. 2008; 97: 952–4.
- 95.** Al-Attas OS, Al-Daghri N, Bamakhramah A, Shaun Sabico S, McTernan P, Huang T-K. Telomere length in relation to insulin resistance, inflammation and obesity among Arab youth. *Acta Paediatr*. 2010; 99: 896–9.
- 96.** Buxton JL, Walters RG, Visvikis-Siest S, Meyre D, Froguel P, Blakemore AIF. Childhood Obesity Is Associated with Shorter Leukocyte Telomere Length. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2011; 96: 1500–5.
- 97.** Hirokawa K, Utsuyama M, Kasai M, Kurashima C. Aging and immunity. *Acta Pathol. Jpn*. 1992; 42: 537–48.

98. Jaspan HB, Lawn SD, Safrit JT, Bekker L-G. The maturing immune system: implications for development and testing HIV-1 vaccines for children and adolescents. *AIDS Lond. Engl.* 2006; 20: 483–94.

99. Balasubramanyam M, Adaikalakoteswari A, Monickaraj SF, Mohan V. Telomere shortening & metabolic/vascular diseases. *Indian J. Med. Res.* 2007; 125: 441–50.

100. Lee D-C, Im J-A, Kim J-H, Lee H-R, Shim J-Y. Effect of Long-Term Hormone Therapy on Telomere Length in Postmenopausal Women. *Yonsei Med. J.* 2005; 46: 471–9.