

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI

Ağır sepsis hastalarının lenfositlerinde CBMN sitom yöntemi ile ve plazmalarında 8OHdG ölçümü ile kromozomal ve oksidatif DNA hasarının araştırılması

Proje No:
5837

Proje Türü

Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Proje Yürütücüsü: Prof.Dr. Aliye Esmaoğlu Çoruh
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD

Araştırmacının Adı Soyadı: **Uzm.Dr. İlhan BAHAR**, Erciyes Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dahiliye Yoğun Bakım Bilim Dalı

Ocak 2018

KAYSERİ

Ağır sepsis hastalarının lenfositlerinde CBMN sitom yöntemi ile ve plazmalarında 8OHdG ölçümü ile kromozomal ve oksidatif DNA hasarının araştırılması adlı araştırmama desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimine Teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET

ABSTRACT

1. GİRİŞ/AMAÇ VE KAPSAM	1
2.MATERYAL METOD	1
3. İSTATİSTİK	3
4.BULGULAR	
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	4
6.KAYNAKLAR	6
7. EKLER	9

ÖZET

AMAÇ: Şiddetli sepsis ve septik şokun patogenezi tam olarak net değildir. Reaktif oksijen spesiyallerinin (ROS) rol oynadığı bilinmektedir. Biz ROS ilişkili hasarı ve kromozomal DNA hasarını araştırmak istedik.

MATERYAL METOD:

Toplamda 51 hastayı çalışmaya aldık. 29 Hasta grubu 22 kontrol grubudur. Hastalar şiddetli sepsis septik şok olduğunda ve yine aynı hastalar hastalıktan çıktığında kan aldık. DNA'nın oksidatif hasarını 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) seviyesini ve kromozomal DNA hasarında

acytokinesis-block micronucleus cytome (CBMN cyt) ölçerek değerlendirdik.

BULGULAR:

Binucleated (BN) frekansı şiddetli sepsis ve septik şokta ve hastalıktan çıktıktan sonra arttı. 8-OHdG şiddetli sepsis septik şokta arttı. Şiddetli sepsis septik şokta apoptosis arttı. Hastalıktan çıktıktan sonra da devam etti. Nekrosis şiddetli sepsis septik şokta ortaya çıktı ancak hastalıktan çıktıktan sonra devam etti.

SONUÇ: Şiddetli sepsis septik şokta apoptosis ve nekrosis arttı. 8-OHdG ve Mikronukleus(MN) seviyesinde arttı.

ABSTRACT

PURPOSE:

Although the exact pathogenesis of severe sepsis and septic shock remains unclear, reactive oxygen species (ROS) are known to play a role. In our study, we investigated ROS-induced injury by analyzing oxidative and chromosomal DNA damage.

MATERIALS AND METHODS:

A total of 51 patients were included in the study, 29 in the patient group and 22 in the control group. Blood samples were taken from patients in the patient group during severe sepsis or septic shock, then again once they had recovered. Oxidative DNA damage was evaluated by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels, and chromosomal DNA damage was assessed using a cytokinesis-block micronucleus cytome (CBMN cyt) assay that measured

RESULTS

The frequency of BN decreased during severe sepsis or septic shock, and increased after recovery. The level of 8-OHdG, increased with severe sepsis or septic shock. Apoptosis was increased during severe sepsis and septic shock, and this increase also continued after recovery. Necrosis increased with severe sepsis and septic shock, and decreased following disease recovery.

CONCLUSIONS: In patients with severe sepsis or septic shock, apoptosis and necrosis were increased along with increased MN frequency and 8-OHdG level.

GİRİŞ

Sepsis de inflamasyon ve antiinflamasyon aynı anda başlasa bile inflamasyon daha öndedir ve bu durum organ hasarından sorumludur (1). inflamasyonun apoptosi/nekrosiz yapıcı etkisi mevcuttur(2). Sepsiste diğer bir organ hasarı yapan neden iskemik reperuzyon injury 'si sonucu olan oksijen ve reactive nitrogen species (ROS/RNS) önemli rol oynamaktadır. Yukarda belirtilen iki neden de organ yetmezliğini apoptosis/nekrosis yolu ile yapabilirler. Aslında apoptosis/nekrosis abartı inflamasyonun zararlı etkisini azlatabildiği gibi tam tersi etki ile immünsupresyona da sebep olabilir (3, 4). Vücutta oksidan/antioksidan dengesi mevcuttur. Bu durum sepsis hastalarında mitokondride ROS oluşması sonucu bozulur ve dokulara hasar veren oksidatif stress oluşur. ROS mitokondride ortaya çıkar ve bunun sonucunda oksidant/antioksidant dengesi bozulur ve bu durum oksidatif stresi ortaya çıkarır (5, 6). ROS hücrede hem pürin hemde pirimidin de hasar oluşturabilir. ROS hücrede DNA da ve baz DNA olmayan kısmında hasar oluşurduğu gösterilmiştir (7, 8).Bu hasarlardan önemli iki tanesi single strand break (SBD), doublestrand break(DBD) ortaya çıkar . Oluşan DNA hasarı sonucunda DNA tamir mekanizması devreye girer ve hücreyi tamir etmeye çalışır (9). Tamir mekanizması enzimleri oksidatif hasar ile oluşan 8-OHdG'ı DNA dan temizlemeye çalışır . Oksidatif hasarın iki biyobelirteci mevcuttur bunlar DNA hasarı ve8-OHdG'ıdır. Oksidatif hasar tamir edilemez ise hücre replike olmaya devam eder ve hasar devam etmiş olur (10). DNA hasarı sonucu oluşan ve tamir edilemeyen hücrelerdeki hasarlı DNA apoptosisi de tetikleyebilir(11). İskemik hasar hücrelerde apoptosis mi nekrosis mi olacağına hücrede ortaya çıkan oksidatif stresin boyutuna, ATP miktarına,oksidant/antioxidant durumuna bağlıdır(12). Lenfositlerde apoptosisi ortaya çıkaran birkaç yolak bilinmektedir. Ancak bu apoptosisi açıklamayaçalışan yolları tam olarak ortaya çıkarılamamıştır (13). Çalışmamıza ROS un etkisinden dolayı organ yetmezliği olabilecek ağır sepsis ve septik şok hastlarını almayı amaçladık. Ayrıca çalışmamızı daha kapsamlı test olan CBMN cyt assay yöntemi ile yapmayı planladık. Sepsiste CBMN cyt yöntemi ile yapılacak ilk çalışmadır.

MATERYAL METOD

Çalışmamız Erciyes üniversitesi Tıp Fakültesi 3.basamak medikal ve cerrahi yoğun bakımlarda prospektifolarak gerçekleştirildi. Etik kurul onamı 2016/298 karar no ile alındı. The study was conducted in accordance with the declaration of Helsinki and local laws, depending on which afforded greater protection to the patients. Etik kurul onamı alındıktan

sonra 01.01.2015 ile 01.01.2016 yılı arasında kliniğimizde Ağır sepsis/septik şok klavuzuna göre tanı almış hastaların birinci derece yakınlarından onam belgesi alındı (14). İlk kan ağır sepsis/septik şok olan hastalardan alındı. İkinci kan hasta düzeldikten sonra alındı. Burada düzelme hastalarda organ yetmezliği kalmaması olarak düşünüldü. Kontrol grubu da benzer cinsiyet ve yaşa dikkat ederek alındı.

Hastalar demografik bilgileri, yaş kilo, boy, cinsiyet, giriş apacheı değeri, vazopressör kullanıp kullanmadığı, ilk kan alırken ve ikinci kan alırken beyaz küre sayısı, prokalsitonin, C-reaktif protein, kanPh, ilk kan laktatı, ilka kan alırken sofa, yoğun bakımda yatış süresi, hastane yatış süresi, yoğun bakım mortalitesi, hastane mortalitesi, yoğun bakıma yatış yeri, ilk kan alış süresi bakıldı.

Lenfosit kültürü

After informed consent had been obtained, heparinized blood samples (3-4 ml) were obtained from patients at pre-treatment and after treatment and control subjects. Approximately 0.4 ml of each sample was immediately cultured for 72 h at 37 °C in 5 ml of peripheral blood karyotyping medium, with 2% phytohaemagglutinin-M (all from Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel). Two parallel cultures of blood from each subject were made to determine intra-individual differences.

Cytokinesis-block micronucleus cytome yöntemi ile çalışma

The cytokinesis-block micronucleus cytome(CBMN-Cyt) assay was performed as described by Fenech(15) with some modifications. At 44. hour of incubation, cytochalasin-B (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) was added to cultures to give a final concentration of 3 µg/ml to block cytokinesis. The cultures were stopped at 72. hour, treated with hypotonic solution (0.1 M KCl) for 4 minutes and fixed in two changes of methanol-acetic acid (3:1) (16) . The fixed cells were spread onto glass slides and stained with 5% Giemsa for 10 minutes. All the slides were coded and blind read. In order to determine intra-individual differences, different slides of two parallel cultures of one person were also prepared and evaluated.

Published criteria for the selection of binucleated (BN) cells and identificationof CBMN-cyt assay parameters were followed (16). To determine genomic damage, each subject was analysed for the total number of MN, NBPs and NBUDs, while BN cells with two

macronuclei surrounded by cytoplasm and a cell membrane obtained from whole-blood cultures were scored. The number of MN, NPBs and NBUDs was counted in 1000 BN cells per subject. The frequency of BN cells containing one or more MN was also determined. The number of necrotic and apoptotic cells was scored in 1000 mononucleated cells per subject in order to determine cytotoxicity in accordance with published CBMN-cyt scoring criteria (16). In addition, the number of mono-, bi-, tri- and tetra- nucleated cells per 1000 viable mononucleated cells was scored to determine cytostatic effects and the rate of mitotic division in the peripheral blood lymphocytes of all subjects. The nuclear division index (NDI) was calculated as $NDI = [(M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4)/N]$, where M1–M4 represent the numbers of cells with 1–4 nuclei and N is the total number of viable cells scored (excluding necrotic and apoptotic cells) (15-17)

Oksidatif DNA hasarını ölçme

Heparinised blood samples (2-3 ml) for analysis of 8-OHdG were immediately centrifuged at 3000 rpm [1512 g] for 15 min at room temperature. The plasma was then stored in microtubes at -80°C until it was analysed. The 8-OHdG concentrations in plasma were measured by use of an ELISA kit (Catalogue: NWK-8-OHdG02; Northwest Life Science Specialties, LLC, WA, USA) and the intra-assay coefficient of variation of the 8-OHdG assays was calculated to be 5.9%. Plasma 8-OHdG concentrations were expressed in ng/ml. Calibration, curve fitting and data analysis were done according to the instructions of the manufacturer.

İstatistik

The Wilcoxon test from nonparametric tests was used to assess the differences in CBMN-cyt assay parameters, plasma 8-OHdG concentrations and some clinical parameters among pre-treatment and after treatment patients. The same parameters were also tested with the Mann–Whitney U-test between patients and control subjects in both pre-treatment and after treatment. The relationship between CBMN-cyt assay parameters, plasma 8-OHdG concentrations, some clinical parameters and age was evaluated with Spearman correlation analysis. A p value of <0.05 was considered to correspond with statistical significance. All statistical analyses were performed by use of the SPSS for Windows statistical package, version 15.0.

Bulgular: Hasta yaş ortalaması 66.21 ± 16.82 (15 kadın ve 14 erkek) ve kontrol yaş ortalaması 58.09 ± 12.87 (13 kadın ve 9 erkek). Hasta grubunun giriş apache ortalaması 30.86 ± 18.60 idi.

Hasta grubunda tedavi öncesi ile tedavi sonrası kan Ph değeri hariç (7.34 ± 0.11 vs 7.38 ± 0.08 , $P > 0.05$) fark yoktu

MN frekansı (%) tedavi öncesi ve tedavi sonrası arasında fark vardı (2.25 ± 0.79 vs 1.67 ± 0.67 , $P < 0.001$). MN frekansı (%) tedavi öncesi ile kontrol grubu arasında (2.25 ± 0.79 vs 1.08 ± 0.57 , $P < 0.001$, MN frekansı (%) tedavi sonrası ile kontrol grubu arasında fark vardı. (1.67 ± 0.67 vs 1.08 ± 0.57 , $P < 0.01$). NPB frekansı (%) tedavi öncesi ile sonrası arasında fark vardı (1.45 ± 1.02 vs 1.07 ± 0.79 , $P < 0.01$). NBUD frekansı (%) tedavi öncesi ve sonrası arasında (0.46 ± 0.15 vs 0.40 ± 0.12 , $P < 0.05$). NBUD frekansı (%) tedavi öncesi ve kontrol grubu arasında (0.46 ± 0.15 vs 0.27 ± 0.12 , $P < 0.05$) fark vardı. Apoptotik hücre frekansı (%) tedavi öncesi ve sonrası arasında (4.21 ± 3.15 vs 3.82 ± 3.07 , $P < 0.05$) fark vardı. Apoptotik hücre frekansı (%) tedavi öncesi ve kontrol grubu arasında (4.21 ± 3.15 vs 1.35 ± 0.78 , $P < 0.001$) fark vardı. Apoptotik hücre frekansı (%) tedavi sonrası ve kontrol grubu arasında (3.82 ± 3.07 vs 1.35 ± 0.78 , $P < 0.001$) fark vardı. Nekrotik hücre frekansı (%) tedavi öncesi ve sonrası arasında (4.75 ± 3.61 vs 4.09 ± 3.37 , $P < 0.05$) fark vardı. Nekrotik hücre frekansı (%) tedavi öncesi ve kontrol grubu arasında (4.75 ± 3.61 vs 2.40 ± 0.84 , $P < 0.01$) fark vardı. BN hücre frekansı (%) ında tedavi öncesi ve tedavi sonrası (25.98 ± 11.04 vs 32.67 ± 13.11 , $P < 0.001$) fark vardı. BN hücre frekansı (%) ında tedavi öncesi ile kontrol grubu arasında (25.98 ± 11.04 vs 31.14 ± 6.25 , $P < 0.01$) fark vardı. BNI açısından kontrol grubu hem tedavi öncesine hastalarına göre hemde tedavi sonrası gruba göre yüksekti. BNI tedavi öncesi ve sonrası arasında (1.22 ± 0.08 vs 1.26 ± 0.09 , $P < 0.001$) fark vardı. BNI tedavi öncesi ve kontrol grubu arasında (1.22 ± 0.08 vs 1.26 ± 0.04 , $P < 0.01$) fark vardı. Plazma 8-OHdG Seviyeleri (ng/ml) tedavi öncesi ve kontrol grubuna göre (3.71 ± 2.52 vs 1.48 ± 1.40 , $P < 0.001$) fark vardı. Yine v Plazma 8-OHdG Seviyeleri (ng/ml) tedavi sonrası ve kontrol grubuna göre (3.38 ± 1.38 vs 1.48 ± 1.40 , $P < 0.001$) fark vardı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda oksidatif hasarın belirteçlerinden biri olan 8-OHdG sağlıklı kişilere göre yüksek seyretmiş. Ancak ağır sepsis/ septic şokta ki değeri ağır sepsis/septic şoktan hasta çıktığında ki değeri ile farkı çıkmamıştır. Bu durum bize oksidatif hasarın ağır sepsis/septic şokta arttığını gösterir ancak hastalar ağır sepsis/septic şoktan çıktığında bile azalmaması

hasar devam ettiğini gösterir. 8-OHdG oksidatif hasarı gösteren oldukça sensitive testlerden biridir. Daha önce yapılan bir çalışmada üriner 8-OHdG nin oksidatif hasarın belirteci olduğu çalışılmıştır. Çalışmaya aldığımız ağır sepsis/septic şok hastalarında oksidatif hasar ile beraber apoptosis ve nekrosis arttı. Ağır sepsis/septic şok hastalığından çıkan hastalarda apoptosis hala devam etmiş ancak nekrosis devam etmemiştir. DNA hasarı bir kaç farklı yoldan üzerinden apoptosis yaptığı gösterilmiştir (18, 19). Sepsisli hastalarda absolut lenfosit sayımı ile ilgili çalışmalarda sepside lenfosit sayımı düşük çıkmıştır (20, 21). Le Tulzo ve ark.larının yaptığı çalışmada ise septic şok hastalarında sepsis göre absolut lenfosit sayımı daha düşük çıkmıştır (22). Lenfositlerin apoptosisi adaptif bir cevap olabilir ve counter-regulatory mechanism yı ortaya çıkarabilirken tam tersi immunsupresyon yaparak ölüme sebep olabilir (23). DNA hasarı olarak ise MN frekansı hariç tüm DNA hasar belirteçleri normale gelmiştir. Ağır sepsi/septic şoktaki tüm hastalarda tedavi olduktan sonraki duruma göre tüm DNA hasar belirteçleri yüksek seyretmiştir. Sadece NBP frekansı hasta grubu control grubuna göre farklı çıkmamış. Ağır sepsis/septik şokun mortalitesi yüksektir ve patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Sepsisin patogenezinin tam olarak ortaya çıkarılırsa tedavisi de mümkün olabilir. Sepsis de immünsüpresyonun tedavisi ile ilgili çalışmalar mevcuttur (1). Çalışmamızın kısıtlılıkları ise hasta sayı az olmuştur ve ölen hastaların da lenfositlerinde çalışma yapamadık.

Kaynaklar

1. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *The Lancet infectious diseases*. 2013;13(3):260-8.
2. Huebener P, Pradere JP, Hernandez C, Gwak GY, Caviglia JM, Mu X, et al. The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(2):539-50.
3. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Critical Care Medicine*. 2007;35(10):2408-16.
4. Anne Morrison C, Moran A, Patel S, Vidaurre MdPH, Carrick MM, Tweardy DJ. Increased apoptosis of peripheral blood neutrophils is associated with reduced incidence of infection in trauma patients with hemorrhagic shock. *Journal of Infection*. 66(1):87-94.
5. Galley H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *British journal of anaesthesia*. 2011;107(1):57-64.
6. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:143-83.
7. Bayr H. Reactive oxygen species. *Critical care medicine*. 2005;33(12):S498-S501.
8. Suliman HB, Carraway MS, Piantadosi CA. Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;167(4):570-9.

9. Caldecott KW. Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(8):619-31.
10. Li P, Gu Y, Yu S, Li Y, Yang J, Jia G. Assessing the suitability of 8-OHdG and micronuclei as genotoxic biomarkers in chromate-exposed workers: a cross-sectional study. *BMJ Open*. 2014;4(10).
11. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine*. 2006;12(9):440-50.
12. Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*. 1999;14(6):605-12.
13. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(5):455-65.
14. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive care medicine*. 2013;39(2):165-228.
15. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation research*. 2000;455(1-2):81-95.
16. Donmez-Altuntas H, Bitgen N. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity in the general population in Turkey by use of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutation research*. 2012;748(1-2):1-7.
17. Eastmond DA, Tucker JD. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and molecular mutagenesis*. 1989;13(1):34-43.
18. Hollins DL, Suliman HB, Piantadosi CA, Carraway MS. Glutathione regulates susceptibility to oxidant-induced mitochondrial DNA damage in human lymphocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006;40(7):1220-6.
19. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine*. 2006;12(9):440-50.
20. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*. 1999;27(7):1230-51.

21. Schroeder S, Lindemann C, Decker D, Klaschik S, Hering R, Putensen C, et al. Increased susceptibility to apoptosis in circulating lymphocytes of critically ill patients. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie*. 2001;386(1):42-6.
22. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* (Augusta, Ga). 2002;18(6):487-94.
23. Cobb JP, Buchman TG, Karl IE, Hotchkiss RS. Molecular biology of multiple organ dysfunction syndrome: injury, adaptation, and apoptosis. *Surgical infections*. 2000;1(3):207-13; discussion 14-5.

2.2 Figure 1

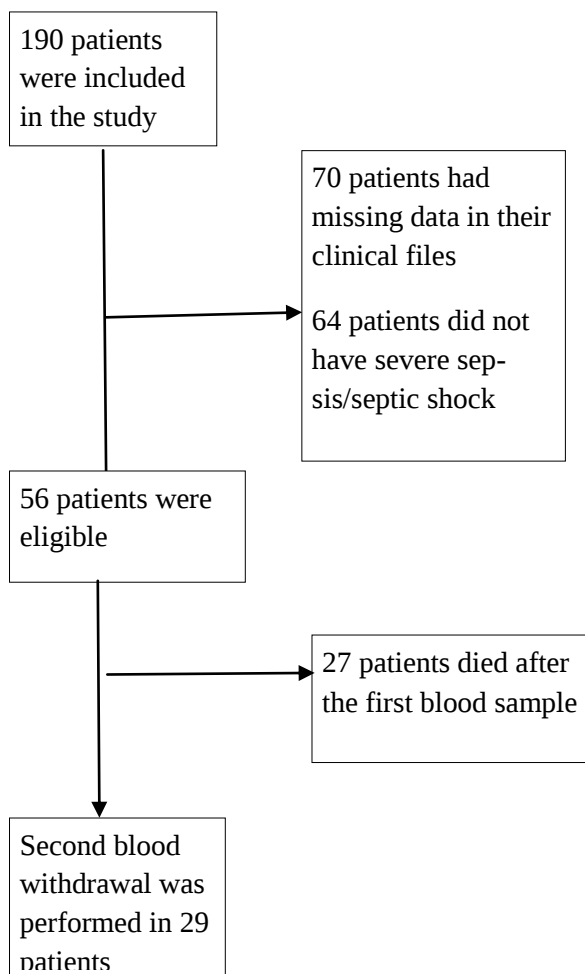


Table 1. Pre- and post-treatment values for blood parameters (mean $\pm$ SD).

	Pre-treatment	Post-treatment	P-value ^a (Wilcoxon test)
Blood pH	7.34 $\pm$ 0.11	7.38 $\pm$ 0.08	P > 0.05
Blood lactate (mmol/L)	5.90 $\pm$ 6.91	1.37 $\pm$ 0.34	P < 0.001
Blood CRP(mg/L)	188.09 $\pm$ 102.36	2.90 $\pm$ 1.37	P < 0.001
Blood WBC (microL ⁻¹)	17309.15 $\pm$ 11688.65	8755.62 $\pm$ 2381.476	P < 0.001
Blood PCT (ng/L)	24.58 $\pm$ 40.57	0.06 $\pm$ 0.05	P < 0.001
Blood SOFA score	8.45 $\pm$ 2.81	0.79 $\pm$ 1.30	P < 0.001

CRP, C-reactive protein; WBC, white blood cell; PCT, procalcitonin; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment score.

^aP-values for comparison between the pre- and post-treatment values.

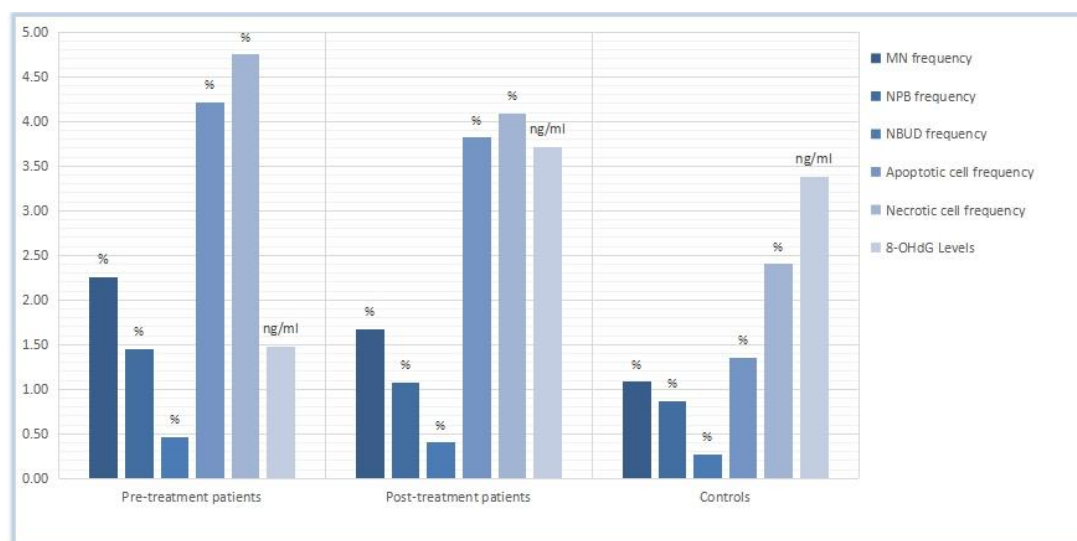


Figure 2. Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay parameters (MN, NPB, NBUD, apoptotic and necrotic cell frequencies) and 8-OHdG levels in pre- and post-treatment patients and control subjects.

	Controls (n = 22)	Pre- treatment patients (n = 29)	Post- treatment patients (n = 29)	P-value ^a (Wil- coxon test)	P-value ^b (Mann- Whit- ney U test)	P-value ^c (Mann- Whit- ney U test)
--	----------------------	---	--	---	---	---

MN frequency (%)	1.08 ± 0.57	2.25 ± 0.79	1.67 ± 0.67	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.01
NPB frequency (%)	0.87 ± 0.43	1.45 ± 1.02	1.07 ± 0.79	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05
NBUD frequency (%)	0.27 ± 0.12	0.46 ± 0.15	0.40 ± 0.12	P < 0.05	P < 0.05	P > 0.05
Apoptotic cell frequency (%)	1.35 ± 0.78	4.21 ± 3.15	3.82 ± 3.07	P < 0.05	P < 0.001	P < 0.001
Necrotic cell frequency (%)	2.40 ± 0.84	4.75 ± 3.61	4.09 ± 3.37	P < 0.05	P < 0.01	P > 0.05
BN cell frequency (%)	31.14 ± 6.25	25.98 ± 11.04	32.67 ± 13.11	P < 0.001	P < 0.01	P > 0.05
NDI	1.26 ± 0.04	1.22 ± 0.08	1.26 ± 0.09	P < 0.001	P < 0.01	P > 0.05
Plasma 8-OHdG levels (ng/ml)	1.48 ± 1.40	3.71 ± 2.52	3.38 ± 1.38	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001

Table 2. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay parameters and 8-OHdG levels in pre- and post-treatment patients and control subjects (mean ± SD).

MN, micronucleus; NPB, nucleoplasmic bridge; NBUD, nuclear budding; BN, binucleated; NDI, nuclear division index.

^a P-value for comparison between the pre- and post-treatment values.

^b P-value for comparison between the pre-treatment and control values.

^c P-value for comparison between the post-treatment and control values.

