



ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

УДК: 577.112.4:541.45

Код специальности ВАК: 14.03.09; 14.03.10; 03.01.04

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКА

Н.В. Вавилов¹, Ю.И. Шилов^{1,2}, А.П. Годовалов¹,

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера»,

²ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН

Годовалов Анатолий Петрович – e-mail: AGodovalov@gmail.com

Дата поступления
13.02.2018

Введение. К настоящему времени накоплено большое количество данных об оксидативном стрессе, его индукторах и о его влиянии на человеческий организм. В настоящей статье рассмотрены основные изменения белковых молекул под влиянием продуктов окислительного стресса и произведён краткий обзор основных методов обнаружения модифицированных белков. **Цель исследования:** подбор некоторых методических подходов к определению уровня окислительной модификации белка сыворотки крови. **Материал и методы.** Предложена модификация метода Reznick et al. для определения окислительной модификации белка в микроварианте, суть которой состоит в пропорциональном снижении объёмов реагентов-участников реакции и в замене некоторых реактивов на их аналоги по химической природе. **Результаты исследования.** Концентрация кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера (кДНФн) сыворотки периферической крови здоровых доноров составила $1,24 \pm 0,15$, кетон-динитрофенилгидразонов основного характера (кДНФо) – $0,74 \pm 0,11$, а альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера (аДНФн) – $0,37 \pm 0,07$ нмоль/мг белка. Общая суммарная концентрация окисленных белков сыворотки периферической крови здоровых доноров составила $2,35 \pm 0,11$ нмоль/мг белка. Выявлено, что на долю аДНФн приходится 16%, на долю кДНФо – 31,5%, на долю кДНФн – 52,5% окисленных белков. Таким образом, соотношение окисленных белков сыворотки крови здоровых доноров кДНФн : кДНФо : аДНФн составляет 1 : 2 : 3,3. **Заключение.** В ходе проведения исследований было установлено, что при определении уровня окисленного белка микрометодом уровень окисленных белков соответствует результатам, полученным как в классическом варианте реакции, так и данными литературы.

Ключевые слова: белок, окислительная модификация белка, свободные радикалы, микрометод, 2,4-динитрофенилгидразин, карбонильные группы.

Introduction. To date, a large amount of data has been accumulated on oxidative stress, its inducers and its effect on the human body. In this article, the main changes in protein molecules under the influence of products of oxidative stress are reviewed, and a brief review of the main methods for detecting protein's modification was made. Aim of investigation – selection of some methodical approaches to determination of level of oxidative modification of protein of blood serum. **Materials and methods.** A modification of the Reznick et al. method to determine the oxidative modification of the protein in a microversion, the essence of which is a proportional decrease in the volumes of reagents participating in the reaction and in the replacement of certain reagents with their analogues in chemical nature. **Results.** The concentration of serum ketone-dinitrophenylhydrazones of neutral type (kDNFn) of healthy peripheral blood serum was $1,24 \pm 0,15$, the ketone-dinitrophenylhydrazones of basic type (kDNFb) were $0,74 \pm 0,11$, and the aldehyde-dinitrophenylhydrazones of neutral type (aDNFn) $0,37 \pm 0,07$ nmol/mg protein. The total total concentration of oxidized proteins of peripheral blood serum of healthy donors was $2,35 \pm 0,11$ nmol/mg protein. It was revealed that aDNFn amount for 16%, for kDNFb – 31,5%, for kDNFn – 52,5% of oxidized proteins. Thus, the ratio of oxidized proteins of blood serum of healthy donors to aDNFn : kDNFb : kDNFn is 1 : 2 : 3.3. **Conclusion.** During the research it was found that when the level of oxidized protein is determined by a micromethod, the level of oxidized proteins corresponds to the results obtained both in the classical variant of the reaction and in the literature data.

Key words: protein, oxidative modification of protein, free radicals, micromethod, 2,4-dinitrophenylhydrazine, carbonyl groups.

Введение

Со второй половины XX века большое внимание стало уделяться изучению активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид-радикал ($O_2^{\cdot-}$), гидроксил-радикал (OH^{\cdot}), пероксил-радикал (RO_2^{\cdot}), алкоксил-радикал (RO^{\cdot}) и гидропероксил-радикал (HO_2^{\cdot}). Кроме этого проводится изучение и нерадикальных видов АФК – пероксид водорода (H_2O_2), гипохлорная кислота ($HOCl$), озон (O_3), синглетный кислород (1O_2). Показано участие реактивных форм азота (РФА), таких как пероксинитрит, $NO_2^{\cdot-}$ и NO^{\cdot} -радикалы, в физиологических и патологических процессах [1]. К настоящему моменту накоплено большое количество данных об «оксидативном» и «нитрозирующем» стрессах, работе антиоксидантных систем, перекисном окислении липидов (ПОЛ), окислительной модификации белка (ОМБ), а также установлено влияние АФК и РФА на нуклеиновые кислоты, углеводные молекулы и другие биологически активные вещества [2–5].

Под воздействием АФК на концах белковой цепи образуются карбонильные (СО) группы (альдегидные или кетонные), что в наибольшей степени касается остатков пролина, аргинина, лизина и треонина, так образуются 2-пирролидон, глутаминовый полуальдегид, α -аминоадипиновый полуальдегид и 2-амино-3-кетомасляная кислота, соответственно [6]. Эти фрагменты химически стабильны, что удобно при их определении. Кроме этого, карбонильные производные белка могут быть получены при окислительном расщеплении белковой цепочки либо путём α -амидирования или окислением глутамил-конца белковой цепи, ведущих к образованию пептида, где N-конец блокирован СО-производной [1]. Карбонильные группы могут быть введены в белковую цепочку при вторичном воздействии как продуктов ПОЛ (4-гидрокси-2-ноненаль, малоновый диальдегид, 2-пропеналь или акролеин), так и реактивными карбонильными соединениями (кетонами, кетоальдегидами), образующимися при метаболизировании углеводов или их окисленных продуктов, которые тропны к остаткам лизина (реакции гликозилирования и гликозилирования). В ходе реакций гликозилирования образуются карбоксиметиллизин и пентозидин. При ПОЛ-индуцированной ОМБ образуются малондиальдегид-лизин и 4-гидроксиноненаль-пептидные продукты [1, 7].

В 70-е годы появились первые методы оценки влияния АФК и РФА на белковые молекулы [8]. В настоящее время все методы оценки ОМБ можно разделить на две группы. Во-первых, методы, которые регистрируют изменения аминокислот внутри белка. Эти методы могут быть использованы для оценки перехода некоторых аминокислот в их окисленные формы, например триптофана [9], тирозина [10], лизина [11], аргинина [12], метионина, [13] цистеина [14]. Регистрация результата при использовании этой группы методов основана на феномене флуоресценции. С другой стороны, можно оценить количество специфических продуктов окислительных реакций путём присоединения специфических соединений к окисленным группам белка. В частности, разработан метод, основанный на присоединении к карбонильным группам окисленного белка солей тритированного боргидрида (NaB^3H_4) и последующей регистрации тритиевого излучения стандартными методами [15]. Этот метод весьма чувствителен, но боргидрид также

высокоаффинен к шиффовым основаниям, что требует высокого уровня очистки материала.

Следующий метод основан на применении 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ), который при взаимодействии с окисленными СО-группами аминокислотных остатков образует производные 2,4-динитрофенилгидразона (ДНФ), концентрации которых можно оценить спектрофотометрически. Реакция карбонильных остатков с ДНФГ считается весьма специфичной и наиболее чувствительной [16]. В настоящее время существует множество вариаций метода и разных трактовок полученных результатов [17–19]. Разработаны следующие варианты реакции:

а) сепарация подтипов белка гель-фильтрацией с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии [20]. Этот метод высокочувствителен, но подходит только для высокоочищенного материала, так как чувствителен к наличию различных органических примесей;

б) разделение фракций общего белка при помощи одно- и двумерного электрофореза [21];

в) использование антител к ДНФ для иммуноферментного определения степени ОМБ [22].

Цель исследования: подбор некоторых методических подходов к определению уровня окислительной модификации белка сыворотки крови.

Материал и методы

Исследована сыворотка периферической крови 33 практически здоровых мужчин добровольцев в возрасте от 19 до 24 лет (средний возраст – $21,09 \pm 0,26$ года). Оценку ОМБ проводили по методу Reznick et al. [19] в нашей модификации [23], сущность которой заключалась в пропорциональном уменьшении объемов реагентов – участников реакции, замене некоторых реагентов на сходные по физико-химическим свойствам. Так, этилацетат как растворитель гидрофобных соединений был заменён на ацетон, 6М раствор гуанидина гидрохлорида как растворитель денатурированного белка на 8М раствор мочевины. Концентрация соляной кислоты для растворения ДНФГ была снижена с 2,5М на 1М раствор, так как ДНФГ хорошо растворялся в 1М растворе соляной кислоты. Не проводили второе отмывание осадка 10% раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ), так как уже после первого осаждения 20% раствором ТХУ осадок приобретал нужную консистенцию. Измерение оптической плотности проводили с помощью планшетного спектрофотометра (PowerWave Bio-TEK Instruments, Inc.) с кварцевым 96-луночным планшетом (black quartz microplate with 96 wells, Hellma, USA), в то время как оригинальная методика предполагает использование кюветного спектрофотометра с использованием кварцевой кюветы.

В две микропробирки типа эппендорф вносили по 200 мкл сыворотки крови. Далее в пробирку с опытной пробой добавляли 400 мкл 0,1М раствора ДНФГ, а в контрольную – 400 мкл растворителя ДНФГ, который представляет собой 1М раствор HCl. Пробирки оставляли на 1 ч при комнатной температуре в тёмном месте, перемешивая каждые 15 минут. Затем в каждую пробирку добавляли 600 мкл 20% раствора ТХУ (м/л), доводя тем самым до 10% (конечной) концентрации ТХУ. Пробу инкубировали в течение 10 минут на льду и центрифугировали в течение 10 минут для осаждения белковых преципитатов. Надосадочную жидкость

удаляли. После этого пробы трижды промывали 400 мкл раствора этанол/ацетон (1:1) (V/V) для удаления несвязавшегося ДНФГ и примеси липидов. Осадок высушивали в течение 12–18 ч. Далее сухой осадок растворяли в 400 мкл 8М раствора мочевины при периодическом перемешивании до полного растворения.

При использовании следующей методики были использованы те же реактивы, но добавление 600 мкл раствора ДНФГ и последующая инкубация в течение 1 ч в темном месте, при перемешивании каждые 15 минут, производились после осаждения белков 200 мкл сыворотки крови – 400 мкл 20% раствора ТХУ. Затем так же удаляли надосадочную жидкость. После этого пробы трижды промывали 400 мкл раствора этанол/ацетон (1:1) (V/V) для удаления не связавшегося ДНФГ и примеси липидов. Осадок высушивали в течение 12–18 ч. Далее сухой осадок растворяли в 400 мкл 8М раствора мочевины при периодическом перемешивании до полного растворения.

Известно, что для альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера (аДНФн) спектр поглощения зарегистрирован в диапазоне 260–558 нм, для альдегид-динитрофенилгидразонов основного характера (аДНФо) – в диапазонах 258–264 нм и 428–520 нм, для кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера (кДНФн) – 360–370 нм, для кетон-динитрофенилгидразонов основного характера (кДНФо) – 430–434 и 524–535 нм [24]. В связи с этим образовавшиеся 2,4-ДНФ регистрировали при следующих длинах волн: при 370 нм для оценки кДНФн, при 430 нм – кДНФо и при 530 нм – аДНФн. При определении содержания карбониллов использовали молярный коэффициент поглощения (ϵ), равный $22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [19]. Коэффициент молярной экстинкции ДНФ использовали для расчета концентрации карбонильных производных ОМБ, где С – это концентрация ДНФ в нмоль/мл, А – показатель абсорбции:

$$\epsilon = 22,000/\text{M} = 22,000/10^6 \text{ нмоль/мл},$$

$$C = A/\epsilon = A_{(370,430,530)}/2,2 * 10^4/10^6.$$

$$C = A_{(370,430,530)} \times 45,45 \text{ нмоль/мл}.$$

Концентрацию окисленных белков выражали в нмоль/мл общего белка сыворотки. Для определения концентрации белка использовали биуретовый метод (Вектор-Бест, Новосибирск). Концентрацию белка измеряли в каждой пробе после полного растворения осадка белка в растворе мочевины.

Суммарную концентрацию окисленных белков рассчитывали путем суммирования всех окисленных производных [24].

Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики и t-критерия Стьюдента для парных данных.

ТАБЛИЦА.

Предоперационные характеристики пациентов

	кДНФн (370 нм)	кДНФо (430 нм)	аДНФн (530 нм)
Осаждение после реакции с ДНФГ	1,24±0,15*	0,74±0,11*	0,37±0,07
Осаждение до реакции с ДНФГ	0,86±0,10	0,51±0,05	0,34±0,04

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении разных вариантов осаждения белка.

Результаты исследования

На данный момент в лабораторной диагностике используется несколько методов для определения белка в биологических жидкостях: метод Лоури [25], метод Бредфорда [26] и микробиуретовый метод [27]. В настоящей работе был использован микробиуретовый метод оценки концентрации белка, так как он менее чувствителен к наличию восстановителей в растворе (мочевины) по сравнению с методом Лоури. Метод Бредфорда, как правило, используется для измерения концентрации белка в пределах от 2 до 120 мкг/мл, в то время как концентрация белка в исследуемых нами пробах колебалась от 55 до 80 мкг/мл.

Общий белок определяли отдельно, как в опытной, так и в контрольной пробе, после растворения в мочевины, так как по ходу эксперимента возможны потери белка. В настоящей работе разница концентраций белка между опытными и контрольными пробами составила в среднем 5%.

При сравнении классического варианта реакции [19] с нашим микрометодом, с использованием сходных реактивов, на сыворотке крови от 10 доноров, результаты статистически значимо не различались ($p=0,87$).

При определении отдельных форм окисленных белков методом, при котором осаждение белков сыворотки крови производилось после инкубации с ДНФГ, концентрация кДНФн сыворотки периферической крови здоровых доноров составляет $1,24 \pm 0,15$, кДНФо – $0,74 \pm 0,11$, аДНФн – $0,37 \pm 0,07$ нмоль/мг белка. Полученные данные при использовании метода с предварительным осаждением белков представлены в таблице.

При оценке воспроизводимости метода осуществляли по пять измерений ОМБ в каждом из образцов сыворотки крови от четырёх доноров. При этом погрешность метода для определения кДНФн сыворотки периферической крови здоровых доноров составляет 4%, кДНФо – 4%, аДНФн – 7%.

Общая суммарная концентрация окисленных белков сыворотки периферической крови здоровых добровольцев равна $2,35 \pm 0,11$ нмоль/мг белка. Выявлено что на долю аДНФн приходится 16%, на долю кДНФо – 31,5%, на долю кДНФн – 52,5% окисленных белков. Можно предположить, что соотношение окисленных белков сыворотки крови здоровых доноров аДНФн : кДНФо : кДНФн составляет 1 : 2 : 3,3.

Обсуждение

При изучении литературных данных выявлено, что разные авторы по-разному проводят осаждение белка ТХУ, как до [17, 18], так и после реакции с ДНФГ [19]. В проведенных нами исследованиях установлено, что осаждение белка ТХУ до реакции с ДНФГ даёт более низкие значения концентрации ОМБ (таблица). Мы связываем данные различия с тем, что при осаждении белка до взаимодействия с ДНФГ формируются конгломераты из денатурированного белка, что затрудняет проникновение реагента внутрь сгустка. Таким образом, с ДНФГ реагируют карбонильные группы белка, расположенные на поверхности белковых преципитатов. Именно поэтому мы рекомендуем использовать методику с осаждением белка после инкубации проб с ДНФГ.

Преобладание в сыворотке крови кетонных производных можно объяснить их менее выраженной реакционной способностью с нуклеофильными соединениями (группировками) по сравнению с альдегидными. Более выраженный вклад гидразоновых производных нейтрального характера,

вероятно, связан с рН крови и условиями проведения исследования [16]. Именно поэтому наиболее интенсивно происходит накопление кДНФн, затем кДНФо и адНФн, соответственно.

Заключение

Установлено, что при определении уровня ОМБ планшетным микрометодом уровень окисленных белков соответствует результатам, полученным как в классическом варианте реакции, так и данными литературы [6, 19, 28], а также имеет хорошую воспроизводимость.

Показаны такие преимущества использования микроварианта реакции окисленных белков с ДНФГ, как снижение объема реагентов и биологических образцов, уменьшение временных затрат, что не отражается на конечном результате исследования. Кроме этого, использование планшетного спектрофотометра позволяет одновременно исследовать большое количество проб, а также хранить и анализировать данные с помощью компьютерных программ.

Доказано, что вариант методики с осаждением белка после инкубации с ДНФГ позволяет выявить большее количество участков белковой цепи, подвергшихся воздействию АФК и РФА, чем метод, основанный на взаимодействии ДНФГ с белком после осаждения ТХУ.

Было предложено определять уровень общего белка после растворения в мочеvine как в опытной, так и в контрольной пробе, так как по ходу эксперимента возможны потери белка.

ЛИТЕРАТУРА

- Berlett B.S., Stadtman E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 20313-20316.
- Davies K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 1995. Vol. 61. P. 1-31.
- Floyd R.A., Carney J.M. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann. Neurol.* 1992. Vol. 32. P. 22-27.
- Valko M., Morris H., Cronin M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 2005. Vol. 12. P. 1161-1208.
- Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskix membranax. M.: Nauka, 1972. 252 s.
- Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta.* 2003. Vol. 329. P. 23-38.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine* Oxford, UK: Oxford University Press. 1999. 452 p.
- Wolff S.P., Dean R.T. Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *J. Biochem.* 1986. Vol. 234(2). P. 399-403.
- Eftink M.R. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biochem.* 1998. Vol. 63. P. 276-284.
- Davies K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262 (20). P. 9895-9901.
- Weigele M., De Barnardo S.L., Tengi J.P., Leimgruber W. A novel reagent for the fluorometric assay of primary amines. *J. Am. Chem. Soc.* 1972. Vol. 94. P. 5927-5928.
- Smith R. E., Mac Quarrie R. A. Sensitive fluorometric method for the determination of arginine using 9,10-phenanthrenequinone. *Anal. Biochem.* 1978. Vol. 90. P. 246-255.
- Pankhurst G., Wang X.L., Wilcken D.E. et al. Characterization of specifically oxidized apolipoproteins in mildly oxidized high density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 2003. Vol. 44. P. 349-355.
- Sharov V.S., Dremina E.S., Galeva N.A. et al. Quantitative mapping of oxidation-sensitive cysteine residues in SERCA in vivo and in vitro by HPLC-electrospray-tandem MS: selective protein oxidation during biological aging. *J. Biochem.* 2006. Vol. 394. P. 605-615.
- Lenz A., Costabel U., Shaltiel S., Levine L. Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. *Anal. Biochem.* 1989. Vol. 177. P. 419-425.
- Боев К.В., Василенко Д.В., Маслов А.И. Свободно-радикальное окисление белков: методологические аспекты количественной оценки окислительной модификации по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. *Universum: Химия и биология: электрон. научн. журн.* 2014. Т. 1 (2). С. 4-6.
Boev K.V., Vasilenko D.V., Maslov A.I. Svobodno-radikal'noe okislenie belkov: metodologicheskie aspekty kolichestvennoj ocenki okislitel'noj modifikacii po reakcii s 2,4-dinitrofenilgidrazinom. Universum: Ximiya i biologiya: elektron. nauchn. zhurn. 2014. T. 1 (2). S. 4-6.
- Levine R.L., Carland D., Oliver C.N., Amici A. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymology.* 1990. Vol. 186. P. 464-78.
- Дубинина Е.Е., Гавровская С.В., Кузьмич Е.В. и др. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование в очищенных белках с использованием системы Фентона. *Биохимия.* 2002. Т. 67. С. 413-421.
Dubinina E.E., Gavrovskaya S.V., Kuz'mich E.V. i dr. Okislitel'naya modifikaciya belkov: okislenie triptofana i obrazovanie v ochishhennyx belkax s ispol'zovaniem sistemy Fentona. Bioximiya. 2002. Vol. 67. S. 413-421.
- Reznick A.Z., Packer L. Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay. *Methods in enzymology.* 1994. Vol. 233. P. 357-363.
- Gladstone Jr.I.M., Levine R.L. Oxidation of proteins in neonatal lungs. *Pediatrics.* 1994. Vol. 93 (5). P. 764 -768.
- Conrad C.C., Choi J., Malakowsky C.A. et al. Identification of protein carbonyls after twodimensional electrophoresis. *Proteomics.* 2001. Vol. 1. P. 829-834.
- Buss I.H., Chan T.P., Sluis K.B. et al. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic. Biol. Med.* 1997. Vol. 23 (3). P. 361-367.
- Вавилов Н.В., Шилов Ю.И. Модификация метода оценки окислительной модификации белков. *Медицинская иммунология.* 2017. Т. 19 (V). С. 254.
Vavilov N.V., Shilov Yu.I. Modifikaciya metoda ocenki okislitel'noj modifikacii belkov. Medicinskaya immunologiya. 2017. Vol. 19 (V). S. 254.
- Копытова Т.В., Пантелеева Г.А., Дмитриева О.Н., Коткова Е.В. Оценка окислительной модификации белков у больных хроническими распространенными дерматозами. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2014. Т. 2. С. 41-44.
Kopytova T.V., Panteleeva G.A., Dmitrieva O.N., Kotkova E.V. Ocenka okislitel'noj modifikacii belkov u bol'nyx xronicheskimi rasprostranyonnymi dermatozami. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2014. Vol. 2. S. 41-44.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. P. 265-275.
- Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248-254.
- Ruth F., Itzhaki D.M. A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.* 1964. Vol. 9. P. 401-410.
- Sheth J.J., Shah U.J., Sheth F.J. et al. Genoprotective Effect of Indian Gentian in Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM): Comet Assay, Sister Chromatid Exchange and Protein Oxidation Studies. *Kamla-Raj Enterprises.* 2011. Vol. 11. P. 83-88.