

OX-LDL ile Nötrofil Aktivasyonu Sırasında Oluşan DNA Hasarının Kometa Assay ile Değerlendirilmesi

Evaluation of DNA Damage with Comet Assay During Neutrophil Activation with OX-LDL

Fatma Behice Serinkan-Cinemre^{1*}, Leyla Sevinc¹, Birsen Aydemir², Hakan Cinemre³

¹ Department of Biochemistry, Sakarya University School of Medicine

² Department of Biophysics, Sakarya University School of Medicine

³ Department of Internal Medicine, Sakarya University School of Medicine

Yazışma Adresi / Correspondence:

Fatma Behice Serinkan Cinemre

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya A.D., Sakarya, Türkiye

T: +90 537 891 99 96 E-mail: cinemreb@gmail.com

Öz

Amaç İnsan vücudunda normal metabolizma ürünü olarak ya da ekzojen kaynaklarla oluşturulan reaktif oksijen türleri (ROT) ve diğer serbest radikallerin, çok sayıda fizyolojik ve patolojik olayda yer aldığı bilinmektedir. Bu reaktif türler eşleşmemiş elektrona sahip oldukları için, hücrenin pek çok bileşeni, DNA, protein ve lipid içerikleriyle kolaylıkla reaksiyona girerek, normal hücre fonksiyonlarını bozabilme yeteneğindedir. Bu çalışmada, oksidan stres modeli olarak seçilen nötrofillerin okside olmuş düşük dansiteli lipoprotein (ox-LDL) ile aktive edilmesi sonucu oluşan hasarın Kometa Assay ile göstermeyi amaçladık.

Gereç ve yöntemler Bu çalışmada LDL, "short-run ultracentrifugation" yöntemiyle izole edildikten sonra CuCl₂ ile okside edildi. Ficoll-Hypaque gradient-centrifugation" yöntemi ile de tam kandan izole edilen nötrofiller ox-LDL ile sitümlü edildi. %1 LMP-agaroz içinde yatay elektroforezde yürütüldü ve propidyum iyodide boyanarak, floresan mikroskopu (Leica-DMLB) ile değerlendirildi. Sonuçlar, sayılan 100 hücreden kometa oluşturmuş hücrelerin yüzdesi olarak bildirildi.

Bulgular Kometa yöntemi ile Ox-LDL ile muamele edilen hücrelerde Kometa oluşumu %30,0 ± 4,6 olarak tespit edildi. Aynı oran kontrol hücre grubunda %5,2 ± 1,9 olarak bulundu. Bu sonuçlara göre ox-LDL ile indüklenen oksidatif stres durumunda Kometa oluşturan hücrelerin yüzdesinin belirgin olarak arttığı gözlemlendi (p<0.001). Aynı hücre gruplarında tripan mavisi ile tespit edilen hücre canlılığı %53,4 ± 3,9 (oksidan stres durumunda); %84,7 ± 3,2 (kontrol grubunda) olarak belirlendi (p<0.001).

Sonuç Nötrofillerin ox-LDL ile muameleyle aktivasyonla yanıt verdiği ve bunun sonucu DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme olduğu Kometa yöntemi ile göstermek mümkün olmuştur. Bu DNA hasarının nötrofillerin doğal immünitedeki koruyucu fonksiyonlarının aksine kronik inflamatuvar hastalıklar, kanser oluşumu gibi pek çok hastalığın etyopatogenezindeki rollerini açıklamada önemli olacaktır.

Anahtar Kelimeler ox-LDL; nötrofiller; DNA hasarı; Kometa Assay

Abstract

Aim As a product of normal metabolism in the human body or produced from exogenous sources, reactive oxygen species (ROS) and other free radicals involved in a large number of physiological and pathological events in human body. Because of their unmatched electrons, these reactive species can easily react with many components of the cell such as DNA, proteins and lipids, and disrupt normal cell functions. In this study, the neutrophils activated by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) were selected as the model of oxidant stress. We aimed to show the DNA damage after neutrophil activation by using Comet Assay

Material and Methods In this study, LDL was oxidized with CuCl₂ after isolation by short-run ultracentrifugation. Neutrophils were isolated from whole blood by "Ficoll-Hypaque gradient-centrifugation" method and activated with ox-LDL. After activation they applied into LMP-agarose (% 1) for electrophoresis. After staining with propidium iodide they evaluated for Comet formation under the fluorescence microscopy (Leica-DMLB). The results were reported as a percentage of cells in the form of comet.

Results Comet formation were %30,0 ± 4,6 and %5,2 ± 1,9 in cells treated with Ox-LDL and control, respectively. According to these results, the percentage of Comet-forming cells in the case of oxidative stress induced by ox-LDL was significantly increased (p<0.001). Cell viability detected by trypan blue in the same cell groups were %53,4 ± 3,9 (in the case of oxidant stress); %84,7 ± 3,2 (in the control group) (p<0.001).

Conclusion By using Comet Assay, it was possible to demonstrate that neutrophils responded to activation by treatment with ox-LDL, which resulted in a statistically significant increase in DNA damage. This DNA damage will be important in explaining the role of neutrophils in the etiopathogenesis of many diseases, such as chronic inflammatory diseases, cancer formation, as opposed to their protective functions in natural immunity.

Keywords ox-LDL; neutrophils; DNA damage; Comet Assay



CİNEMRE ve Ark.

Ox-Ldl İle Nötrofil Aktivasyonu
Sırasında Oluşan DNA Hasarının
Komet Assay ile Değerlendirilmesi

Giriş

LDL, kolesterol esteri ve trigliserit ihtiva eden bir lipoproteindir. Biyolojik membranların major yapısını oluşturur. Bu lipoprotein etrafı kolesterol ve fosfolipit molekülü ile çevrilmiştir. Dış tabakasında gömülü halde 4536 aminoasit içeren apo B-100 bulunmaktadır. LDL molekülünde bulunan yağ asitlerinin yarısını poliinsatüre yağ asitleri oluşturmaktadır. Bu poliinsatüre yağ asitleri serbest radikal hasarı ve oksidasyona karşı çeşitli antioksidanlarla korunmaktadır. Ox-LDL oluşumunun en erken safhası içeriğindeki poliinsatüre yağ asitlerinin peroksidasyonudur^{1,2,3}. LDL oksidasyonu monositler, nötrofiller, endotel hücreleri, fibroblastlar ve düz kas hücrelerindeki etkileri ile ateroskleroz, kronik inflamasyon gibi durumlarla önemli rol oynar⁴.

Polimorf nüveli lökositler (PNL), sistemik dolaşımında önemli koruma hattı oluşturan hücre grubudur ve mikroorganizmalara, ekzojen ve endojen zararlı partiküllere karşı aktif, motil fagosit sisteminin önemli bir parçasıdır. Bu hücreler, özellikle dış sitümüslara aktive olarak yanıt verirler. Bu aktivasyon esnasında, fosfolipidlerden araşidonik asit metabolitleri oluştururlar; degranülasyon, lizozomal enzimlerin sekresyonu ve solunumsal patlama ile büyük miktarda Süperoksit (O₂), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve diğer ROT salınır^{5,6,7}. Fagositoz, vücutta serbest radikallerin yararlı bir amaç için kullanılmasının en iyi örneklerinden biridir. PNL'ler tarafından yabancı partikülün tanınması ve hücre içine alınması, fagositik vakuolun oluşumu ve bu materyalin öldürülmesi ya da parçalanması gibi basamakları içerir⁸. Fagositozun son basamağında, yani mikroorganizmaların öldürülmesi basamağında serbest radikallerin özellikle etkisi olduğu bilinmektedir. Lökosit aktivasyonunu karakterize eden olaylar, oksijen (O₂), kullanımının hızla artışı, glikojenoliz ve glukoz oksidasyonundaki artış, ROT'nin hızla oluşumudur. Oksijen metabolitlerinin oluşumu, lökosit NADPH oksidazının aktive olmasına bağlıdır. NADPH hızla okside olur ve bu proses O₂'i oluşturur. Dismutasyon reaksiyonlarıyla bu O₂, hızla H₂O₂'ye çevrilir. Ancak bu radikaller mikroorganizmayı öldürmek için yeterli değildir^{9,10,11}. Nötrofillerdeki azurofilik granüller myeloperoksidaz (MPO) enzimini içerir ve aktivasyon sırasında bu enzimler salınır⁸. Özellikle nötrofiller ve monositler H₂O₂-MPO-Halid sistemini kullanarak oldukça reaktif oksidanları oluşturur. Klorid, bromid, iyodid ve tiyosiyanat bu sistemde substrat olarak kullanılabilir ancak, in vivo konsantrasyonları gereği, klorür (Cl⁻) en çok tercih edilen halid olarak görünmektedir^{12,13}.

Bu sistemde hipokloroz asid (HOCl) oldukça reaktiftir ve hem proteinleri, porfirinler, tioller, aminler, gibi pek çok biyolojik moleküle hızla reaksiyona girer. Sonuç olarak halojenasyon, protein ve lipid peroksidasyonu gibi reaksiyonlarla mikroorganizmalar öldürülür. H₂O₂ - MPO - Cl sistemi, mikropların öldürülmesi dışında, inflamasyondaki doku hasarında ve tümör hücrelerine karşı sitotoksitede de oldukça önemli görünmektedir^{14,15}.

İnsan hastalıkları ve toksikolojide serbest radikallerle oluşan lipid peroksidasyonunun önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Lipid dışında DNA, protein gibi diğer biyomoleküllerin de hasarlanmasıyla birlikte, hücre fonksiyonlarında önemli bozukluklar oluşur. Membranlarda lipid peroksidasyonunun oluşumu, membran fonksiyonunun bozulmasına, akışkanlığının azalmasına, membran reseptör ve enzimlerinin inaktivasyonuna, kalsiyum (Ca⁺⁺) gibi iyonlara geçirgenliğinin artmasına neden olur^{16,17}.

Nedeni ya da sonucu olarak pek çok hastalıkta ox-LDL'nin yeri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir¹⁸. Bunların arasında özellikle ateroskleroz önemli bir yer tutar. Kompleks bir hastalık olan aterosk-

leroz kan damarlarının intima tabakalarında aterom plakları olarak bilinene birikimlere yol açar¹⁹. Lokal hemodinamik ve inflamatuvar mekanizmalarla subendotelial lipid birikimi endotelial disfonksiyon, monositlerin endotelde birikimi, intimaya düz kas hücrelerin göçü gibi olayların sonucunda aterom plağınının oluşumu ile karakterizedir¹⁸. Aterosklerozun, etyopatolojisinde lipid oksidasyonu önemli yer tutar²⁰. Tüm bu reaksiyonlar zincirinde önemli bir olay, makrofajların, oksidasyon başta olmak üzere değişik şekillerde modifiye olmuş LDL'yi negatif "feed-back" mekanizması olmaksızın hücre içine alması ve köpük hücrelerini oluşturmasıdır^{21,22}.

Organizmada değişik kaynaklarla oluşturulan reaktif türler, diğer hücre komponentleri gibi DNA'da da oksidatif hasar oluştururlar. DNA'da oksidanlar ve serbest radikallerle oluşturulan hasar, DNA'nın baz veya şeker yansında olabilir ya da DNA - protein veya iplikler arası çapraz bağlanmaları oluşturabilir^{23,24,25}. Son yıllara kadar, DNA oksidasyonunda kabul gören görüşün temelinde, Fenton Kimyası yatmaktaydı²⁶. Fenton reaksiyonları sonucunda oluşan hidroksil radikali, DNA oksidasyonundan sorumlu görülen nihai radikal olarak kabul edilmekteydi. Ancak, yeni bilgilerin ışığında, DNA oksidasyonundaki nüanslar çok daha karmaşık ve ilginç hale gelmiştir ve çok sayıda oksidan sınıfı ile ilişkili görünmektedir^{27,28,29}. DNA'nın oksidatif hasarının insan hastalıklarına katkısı, bütün genetik bilgiyi taşıyan molekül olması nedeniyle sürpriz değildir. DNA oksidasyonunun, insan hastalıklarında, yaşlanmada, gelişimsel anormalliklerdeki rolü üzerinde literatürde pek çok çalışma vardır ancak, henüz yeterince aydınlatılmamıştır.

Bir mikroelektroforez yöntemi olan Komet Assay, oksidatif DNA hasarlarının daha kolay, daha kısa sürede ve non-invaziv olarak incelenmesine olanak sağlar. Oluşan hasar nedeniyle küçük parçalara ayrılmış DNA kısımlarının elektrik alanında daha hızlı hareket ederek floresan boyamayla hücre çekirdeğinin çevresinde kuyruklu yıldız görünümü oluşturmalarına dayanır. Bu şekilde kalitatif bir değerlendirme sağlayabileceği gibi, görüntü analiz eden sistemlerle kuyruk kısmının floresan yoğunluğu ve uzunluğuna göre kantitatif analiz olanağı da sağlar. Bizim çalışmamızda sonuçlar, elektroforez ve boyama sonrasında floresan mikroskopunda sayılan hücrelerin komet oluşturmuş hücre yüzdeleri olarak ifade edildi.

Literatürde ox-LDL'nin insan endotel hücrelerinde proaterosklerotik NAD(P)H oksidaz ekspresyonunu ve süperoksit anyon oluşumunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır³⁰. Proaterojenik sitümlüslere yanıt olarak (Ox-LDL'e maruz kalmak gibi), endotel hücreleri, makrofaj, düz kas hücreleri gibi hücrelerde eksprese edilen esas Ox-LDL reseptörü olan "Lectin-like oxidized low-densitylipoprotein receptor-1 (LOX-1)" ekspresyonunun arttığı çalışmalarda gösterilmiştir^{31,32}. Bu çalışmada biz Ox-LDL ile indüklenen nötrofillerde ortaya çıkan oksidan stres ile ilişkili DNA hasarını Komet yöntemi ile göstermeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntemler

LDL izolasyonu

LDL "short-run ultracentrifugation" yöntemiyle izole edildi^{18,33}. Sağlıklı normolipidemik kişilerden bir gecelik açlığı takiben alınan EDTA'lı tam kan örnekleri 10 dak. 1000 x g'de çevrildikten sonra, ayrılan plazmaya LDL agregasyonunu engellemek için 10 mg/ml olmak üzere süroz eklendi. Plazmanın dansitesi 0,297 gr/ml KBr eklenerek 1,225 kg/L'e ayarlandı. 1 ml plazmanın üzerine 2,50 ml izotonik salin tabakalandırıldıktan sonra 120.000 x g de 15 0C de 4 saat santrifüj edildi. Tüpün ortasında toplanan LDL içeren fraksiyon aspire edildikten sonra, daha ileri saflaştırma için ikinci



Journal of Human Rhythm
2018;4(4):183-189

CİNEMRE ve Ark.

Ox-Ldl ile Nötrofil Aktivasyonu
Sırasında Oluşan DNA Hasarının
Komet Assay ile Değerlendirilmesi



CİNEMRE ve Ark.

Ox-Ldl İle Nötrofil Aktivasyonu
Sırasında Oluşan DNA Hasarının
Komet Assay ile Değerlendirilmesi

ultrasantrifüj basamağında LDL içeren fraksiyon dansitesi 0,134 gr/ml potasyum bromür (KBr) eklenerek 1.100 kg/L'e ayarlandıktan sonra izotonik salin tabakalandırıldı ve 120.000 x g. 15 0C de 18 saat santrifüj edildi ve en üstte toplanan LDL fraksiyonu aspire edilip azot geçirilerek oksijensiz hale getirilen fosfatla tamponlanmış saline (PBS) karşı 24 saat, karanlıkta 4°C de diyaliz edildi. Diyaliz işleminden sonra 0,45 µm filtreden geçirildi.

İzole edilen LDL protein içeriği, membran ve lipoproteinlere uyarlanmış Lowry yöntemiyle tayin edildi³⁴. LDL protein içeriği 1 mg/ml'e ayarlandı.

LDL oksidasyonu

Protein içeriği 1 mg/ml'e ayarlanmış olan LDL solüsyonu phosphate buffered saline (PBS) ile 1:5 seyreltilip CuC12 (15 µM final konsantrasyonu) ile 30°C su banyosunda 10 saat boyunca okside edildi^{18,19}.

LDL oksidasyon ürünlerinin tayini

Oksidasyon süresince belirli aralıklarla alınan numunede, EDTA ile (4 mM/L final konsantrasyonunda) ve buz banyosuna konularak oksidasyon durduruldu. Bu numunelerde TBARS, konjuge dien ve protein karbonil içeriği tayinleri yapıldı^{29,30,31,35}.

Hücre izolasyonu

Nötrofiller heparinize tam kandan "Ficoll-Hypaque" yöntemiyle izole edildi^{36,37}. Sağlıklı gönüllülerden alınan heparinli kan 30 dakika sedimantasyona bırakıldıktan sonra ayrılan plazma Histopaque-1077'nin üzerine yayıldı ve 30 dk 700 x g de çevrildi. Dipteki nötrofil ve eritrosit içeren fraksiyon 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra eritrositler hipotonik salinle parçalandı. PBS ile yıkanan hücrelerin, yine PBS ile süspansiyonu yapıldı.

İnkübasyon koşulları

İzole edilen nötrofiller 106 konsantrasyonunda 2 tüpe ayrıldıktan sonra tüplerden birine 50 mg/ml protein final konsantrasyonunda ox-LDL eklenerek 2 sa. 37 °C de inkübe edildi.

Komet yöntemi ile DNA hasarının incelenmesi

Yukarıda sözü edilen inkübasyonlardan sonra her iki tüp 400 x g de 10 dk santrifüj edildikten sonra hücreler süpernatandan ayrıldı, PBS ile süspansiyonu yapıp, %1 NMP-agaraz içinde lam üzerine yayılarak +4 0C de 2 dk donduruldu ve yatay elektroforez cihazında 25 dk 0.6 V/ cm ile yürütüldü. Bu işlemin ardından propidyum iyodidle boyanan preparatlar, floresan mikroskopu (Leica-DMLB) ile değerlendirildi. Sonuçlar, sayılan 100 hücreden komet oluşturmuş hücrelerin yüzdesi olarak bildirildi.

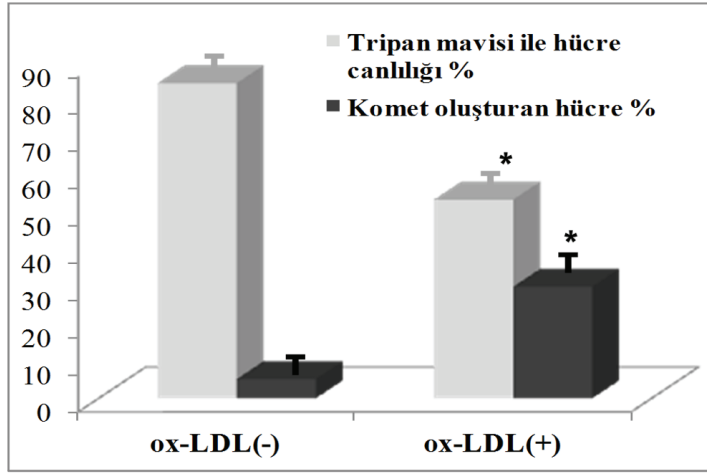
Sitotoksosite tayini

Ox-LDL ile inkübasyon sonrasında hücrelerin canlılıkları tripan mavisi kullanılarak tayin edildi. Bir volüm hücre süspansiyonu eşit volüm tripan mavisile karıştırıldıktan sonra 3 dk bekletildi ve "Thoma" lamına birer damla konularak tüm alanlardaki boyanmış ve boyanmamış hücreler ayrı ayrı sayıldı.

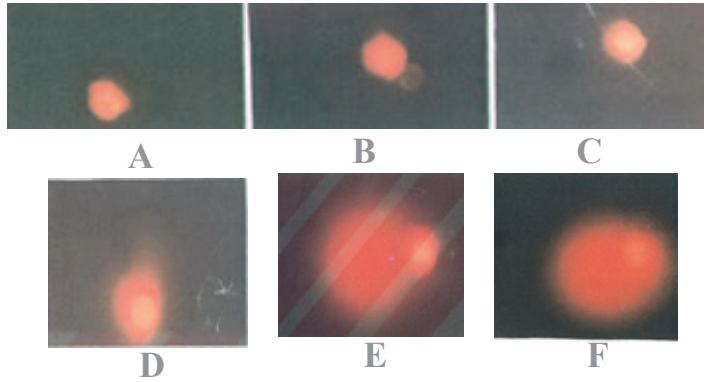
Sonuç

50 mg/ml protein final konsantrasyonunda ox-LDL eklenerek 2 sa. 37°C de inkübe edilen nötro-

fillerde öncelikle bu deneysel koşullarda hücre canlılığı test edildi. Tripan mavisi kullanılarak hücre canlılığı ox-LDL muamelesi ile oluşturulan oksidan stres durumunda $53,4 \pm 3,9$; kontrol grubunda ise $84,7 \pm 3,2$ olarak belirlendi ($P < 0.001$) (Figür 1). ox-LDL ile aktive edilen nötrofillerde oluşan DNA oksidatif hasarı, Komet yöntemi ile her grupta sayılan 100 hücrede komet oluşturmuş hücre yüzdesi ile değerlendirildi (Resim1). Ox-LDL ile muamele edilen nötrofillerde, komet oluşumu 30.0 ± 4.6 olarak tespit edildi (Figür 1). Komet oluşumu sadece PBS ile muamele edilen kontrol hücre grubunda 5.2 ± 1.9 olarak bulundu. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak oldukça anlamlıydı ($P < 0.001$).



Grafik 1. Ox-LDL'ye maruz kalan nötrofillerde hücre canlılığı ve komet oluşturan hücre yüzdeleri. (* : $P < 0.001$, ox-LDL(+) vs. ox-LDL (-) nötrofiller)



RESİM 1: Mikroelektroforezde kometlerin flüoresan mikroskopuyla görünümü
A,B,C: Normal hücre çekirdekleri; D,E,F: Oksidan stres durumunda komet oluşturmuş hücre çekirdekleri (Leica-DMLB flüoresan mikroskopuyla x 40 büyültmede)

Tartışma

Lökositler, değişik uyaranlarla aktive olabilirler ve bu aktivasyon solunumsal patlamayla karakterizedir. Sonuçta oluşan reaktif türler nedeniyle oksidatif stres artar. Araujo ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada lökositlerde ROT 'nin oluşumunun hiperlipidemiyeye pozitif bir kolerasyon gösterdiğini bildirmişlerdir³⁸. Bizim çalışmamızda da izole nötrofillerin ox-LDL ile muameleye aktivasyonla yanıt verdiği ve ortaya çıkan oksidan strese maruz bırakılan hücrelerde, DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme olduğu Komet assay ile gösterilmiştir.





CİNEMRE ve Ark.

Ox-Ldl İle Nötrofil Aktivasyonu
Sırasında Oluşan DNA Hasarının
Komet Assay ile Değerlendirilmesi

Nötrofillerin aktivasyonu ile oluşan reaktif türlerin bazı hastalıkların etyopatolojisinde yer alan lipid oksidasyonuna neden olabildiği bilinmektedir³⁹. Ancak artmış lipid içeriğinin de özellikle oksidasyon gibi modifikasyonlarla nötrofil aktivasyonuna neden olabilmesi farklı bir bakış açısı sağlayacaktır. Kelley ve ark. ox-LDL'nin mast hücrelerini aktive ettiğini ve inflamatuvar bir sitokin olan interlökin (IL)-8 ekspresyonunu ve protein düzeylerini arttırdığını göstermiştir⁴⁰. Nötrofiller ve monositler için güçlü bir kemoatraktan olan IL-8 kronik inflamatuvar yanıt oluşturacaktır. Kopprasch ve ark. yaptıkları çalışmada hipoklorit ile modifiye olmuş-okside LDL'nin polimorf nüveli lökositlerde solunumsal patlamayı aktive ederek belirgin bir proinflamatuvar potansiyele sahip olduklarını göstermişlerdir⁴¹. Aynı zamanda "high-density lipoprotein" HDL'nin bu aktivasyon esnasında hem lipid ve protein bileşenleri hem de nötrofilleri bu aktivasyona karşı koruduğunu da ortaya koymuşlardır. Aynı etkiyi ox-LDL dışındaki aktive edici "zymosan" gibi ajanlarla aktivasyonda elde edememişlerdir. Ox-LDL ve fosfolipid bileşenlerinin lökositlerde lipid cisimcik oluşumunu indüklemedeki rolünü araştıran başka bir çalışmada sıçan peritoneal makrofajlarının ox-LDL (fakat natif-LDL değil) inkübasyonu ile kısa bir süre sonra lipid cisimciklerinin oluşumu gösterilmiştir⁴². Lipid cisimcik oluşumu ox-LDL'nin ateroskleroz gibi patolojilerdeki rolü ile uyumlu, önemli bir proinflamatuvar etkisidir. Bunların dışında ox-LDL'nin granülositlerin migrasyon ve degranülasyonunu aktive ettiğini gösteren çalışmalar vardır⁴³. Bunlar ve benzeri çalışmalar, bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumlu olarak ox-LDL'nin nötrofillerde solunumsal patlamayı uyardığını; bunun sonucu oksidatif stresi arttırdığı ve gerek hücresel bileşenlerde oksidatif hasar gerekse proinflamatuvar mekanizmalarla yaygınlaşan bir hasar potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. van Tits ve ark ox-LDL (natif-LDL değil), nötrofillerde erken dönemde hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu arttırdığını ve bunu gecikmiş bir süperoksit oluşumunun takip ettiğini göstermişlerdir. Fosfolipaz C'ye bağlı hücre içi Ca²⁺ akışı ox-LDL ile nötrofil aktivasyonunda hücre içi sinyal ileti yollarını oluşturuyor olabilir⁴⁴.

Lipidlerden başka, oksidan moleküllerin önemli hedefleri proteinler ve DNA'dır^{45,46}. Nötrofiller, aktivasyon esnasında oluşturdukları reaktif oksijen türlerinin yanı sıra azurofilik granüllerden salınan MPO-MPO-H2O2 halid sistemiyle çok güçlü bir reaktif olan HOCl'i oluşturur^{47,48}. Lökositik orijinli proteazlar değişik patolojik durumlarda doku hasarını artırıcı aktiviteleri, antiproteazlarla dengelenir. Lökositlerin oluşturduğu oksidanlar, özellikle HOCl hem kendi reaktiviteleriyle hem de bu antiproteazları inaktive ettiklerinden dolayı proteolitik yıkımı artırarak önemli bir hasar mekanizması oluşturur. Bizim çalışmamızda DNA oksidasyonu üzerindeki etkilerinin incelenmesi için yapılan Komet testinde, ox-LDL ile nötrofillerin inkübasyonunun komet oluşturan hücre yüzdesini belirgin olarak arttığı görülmüştür. Ancak bu sonuçlar kalitatif değerlendirmeye dayanan sonuçlardır. Kantitatif değerlendirme görüntü analiz eden sistemlerde, fragmente olmuş DNA'nın elektroforetik alanda daha hızlı hareket etmesiyle oluşan kuyruk kısmının boyanma yoğunluğu ve uzunluğunun (tail moment) ölçümü ile belirlenebilir. Literatürde, periferik kanda nötrofil aktivasyonu ve nötrofil DNA hasarı ile hastalık aktivitesi arasında ilişkiyi gösteren yayınlar vardır^{49,50}. Doğal immünitede çok önemli koruyucu fonksiyonlarının aksine nötrofillerin kronik inflamatuvar hastalıklardan kanser oluşumuna kadar pek çok hastalığın etyopatogeneziyle ilişkileri bilinmektedir. Nötrofil aktivasyonu, oluşan oksidanların ve proteolitik bileşiklerin hasarlayıcı etkileri, pro-antiinflamatuvar sitokin etkileşimlerinin sonuçları gibi pek çok kompleks moleküler mekanizma ile bu hastalıkların etyopatogeneziinde yer alabilirler. Biz bu çalışmada nötrofillerin ox-LDL gibi ajanlarla aktive olduklarında kendi DNA'larının da zarar gördüğünü gösterdik. Hem ox-LDL hem de nötrofillerin ateroskleroz gibi toplumu yaygın olarak etkileyen sağlık problemlerindeki rolleri göz önüne alındığında ox-LDL ile nötrofil DNA hasarının bu ve buna benzer hastalıkların etyopatogeneziinde rol oynaması kuvvetle muhtemeldir.

1. Jialal I, Deveraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clinical Chemistry*. 1996;42(4):498-506. PMID: 8605665
2. Weinbrenner T, Cladellas M, Covas MI, Fito M, Tomas M, Senti M et al. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease, Atherosclerosis. 2003;168(1):99-106. PMID: 12732392
3. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J*. 2001;15(12):2073-84. PMID: 11641234
4. Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;947:199-205; discussion 205-6. PMID: 11795267
5. Hari K, Katayama M, Sata N, Ishii K, Waga S, Yadai J. Neuroprotection by glial cells through adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin (ADF/TRX). *Brain Res*. 1994;652(2):304-10. PMID: 7953744
6. Borregaard N, Herlin T. Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *J Clin Invest*. 1982;70(3):550-7. PMID: 7107894
7. Roos D, Weeig RS, Voetman AA, Schaik JV, Bot AAM, Meerhoff LJ, Loos JA. Protection of phagocytic leukocytes by endogenous glutathione: studies in a family with glutathione reductase deficiency. *Blood*. 1979;53(5):851-66. PMID: 435643
8. Vicentini FC, Gomes CM, Danilovic A., Chedid Neto EA, Mazzucchi E, Srougi M. Percutaneous nephrolithotomy: Current concepts. *Indian J Urol*. 2009; 25(1): 4-10. PMID: 19468422
9. Abdalla DSP, Compa A, Monteiro HP. Low density lipoprotein oxidation by stimulated neutrophils and ferritin. *Atherosclerosis*. 1992; 47:149-159. PMID: 1334654
10. Weiss SJ, Slivka A. Monocyte and granulocyte-mediated tumor cell destruction. A role for the hydrogen peroxide-myeloperoxidase-chloride system. *J Clin Invest*. 1982;69(2): 255-262. PMID: 6276438
11. Andrews PC, Krinsky M. The reductive cleavage of myeloperoxidase in half, producing enzymatically active hemi myeloperoxidase. *J Biol Chem*. 1981;256: 4211-4218. PMID: 6276438
12. Weiss SJ, Klein R, Slivka A, Wei M. Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *J Clin Invest*. 1982;70(3):598-607. PMID: 6286728
13. Clark RA, Stone PJ, Hag AE, Calore JD, Franzblau C. Myeloperoxidase-catalyzed inactivation of 1-protease inhibitor by human neutrophils. *J Biol Chem*. 1981;256:3348-3353. PMID: 6162845
14. Marion R, Stumpf DA, Michals K, Hart RD, Parks JK, Goodman SI. Lipoamide dehydrogenase deficiency with primary lactic acidosis: Favorable response to treatment with oral lipoic acid. *J Pediatrics*. 1984;104:65-69. PMID: 6418873
15. Yan LJ, Traber MG, Kobuchi H, Matsugo S, Tritschler HJ, Packer L. Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the prevention of protein carbonyl formation. *Arch Biochem Biophys*. 1996;327(2):330-4. PMID: 8619623
16. Siminiak T, Flores Na, Sheridan DJ. Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury. *Eur Heart J*. 1995;16:160-70. PMID: 7744086
17. McCarron RM, Wang L, Siren AL, Spatz M, Hallenbeck M. Adhesion Molecules on Normotensive and Hypertensive Rat Brain Endothelial Cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1994;205(3):257-62. PMID: 7909612
18. Kleinveld HA, Hak-Lemmers HL, Stalenhoef AF, Demacker PN. Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. *Clin Chem*. 1992;38(10):2066-72. PMID: 1394991
19. Scheek LM1, Wiseman SA, Tijburg LB, van Tol A. Dialysis of isolated low density lipoprotein induces a loss of lipophilic antioxidants and increases the susceptibility to oxidation in vitro. *Atherosclerosis*. 1995;117(1):139-44. PMID: 8546750
20. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 1990;186:1-85. PMID: 2172697
21. Graham A, Hogg N, Kalyanaraman B, O'Leary V, Darley-Usmar V, Moncada S. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett*. 1993;330(2):181-5. PMID: 8365489
22. Leake DS, Rankin SM, Collard S. Macrophage proteases can modify low density lipoproteins to increase their uptake by macrophages. *FEBS Lett*. 1990;269:209-212. PMID: 2201569
23. Henle ES, Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 1997;272(31):19095-8. PMID: 9235895
24. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010 Jul-Dec; 4(8): 118-126. PMID: 22228951
25. Paap B, Wilson DM, Sutherland BM. Human abasic endonuclease action on multifunctional abasic clusters: implications for radiation-induced biological damage. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(8): 2717-2727. PMID: 18353858
26. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*. 1988;240(4852):640-2. PMID: 2834821
27. Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*. 1997;272(32):19633-6. PMID: 9289489
28. Guidarelli A, Cattabeni F, Cantoni O. Alternative mechanisms for hydroperoxide-induced DNA single strand breakage. *Free Radic Res*. 1997;26(6):537-47. PMID: 9212348
29. Cooper PK, Nounsipikel T, Clarkson SG, Leadon SA. Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne syndrome patients from XP group G. *Science*. 1997;275(5302):990-3. PMID: 9020084
30. Hazell LT, Berg JJM, Stocker R. Oxidation of low-density lipoprotein by hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than lipid oxidation. *Biochem J*. 1994; 302(Pt 1): 297-304. PMID: 8068018
31. Jacob S, Streeter RS, Fogt DL, Hokoma JY, Tritschler HJ, Dietze GJ, Henriksen EJ. The antioxidant alpha-lipoic acid enhances insulin-stimulated glucose metabolism in insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes*. 1996;45(8):1024-9. PMID: 8690147
32. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem*. 1987;262(20):9895-901. PMID: 3036875
33. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol*. 2001; 54(5): 356-361. PMID: 11328833
34. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*. 1978;87(1):206-10. PMID: 98070
35. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*. 1992;13(4):341-90. PMID: 1398217
36. Arauz J, Ramos-Tovar E, Muriel P. Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Annals of Hepatology*. 2016;15(2):160-173. PMID: 26845593
37. J Renzi P, Ginns LC. Analysis of T cell subsets in normal adults. Comparison of whole blood lysis technique to Ficoll-Hypaque separation by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1987;98(1):53-6. PMID: 2951443
38. Araujo FB, Barbosa DS, Hsin CY, Maranhao RC, Abdalla DS. Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 1995;117(1):61-71. PMID: 8546756
39. Carr AC, Frei B. Human neutrophils oxidize low-density lipoprotein by a hypochlorous acid-dependent mechanism: the role of vitamin C. *Biol Chem*. 2002;383(3-4):627-36. PMID: 12033452
40. Kelley J, Hemontolor G, Younis W, Li C, Krishnaswamy G, Chi DS. Mast cell activation by lipoproteins. *Methods Mol Biol*. 2006;315:341-8. PMID: 16110168
41. Kopprasch S, Pietzsch J, Graessler J. The protective effects of HDL and its constituents against neutrophil respiratory burst activation by hypochlorite-oxidized LDL. *Mol Cell Biochem*. 2004 Mar;258(1-2):121-7. PMID: 15030176
42. de Assis EF, Silva AR, Caiado LF, Marathe GK, Zimmerman GA, Prescott SM et al. Synergism between platelet-activating factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *J Immunol*. 2003 Aug 15;171(4):2090-8. PMID: 12902515
43. Sedgwick JB, Hwang YS, Gerbyshak HA, Kita H, Busse WW. Oxidized low-density lipoprotein activates migration and degranulation of human granulocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29(6):702-9. PMID: 12777245
44. van Tits LJ, Hak-Lemmers HL, Demacker PN, Stalenhoef AF, Willems PH. Oxidized low-density lipoprotein induces calcium influx in polymorphonuclear leukocytes. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(8):747-55. PMID: 11053776
45. Djordjevic VB. Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol*. 2004;237:57-89. PMID: 15380666
46. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem*. 1987;262(20):9895-901. PMID: 3036875
47. Weiss SJ, Klein R, Slivka A, Wei M. Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *J Clin Invest*. 1982;70(3):598-607. PMID: 6286728
48. Lambert BM, Weiss SJ. The chlorinating potential of the human monocyte. *Blood* 1983;62:645-651. PMID:6882917
49. Martelli-Palomino G, Paoliello-Paschoalato AB, Crispim JC, Rassi DM, Oliveira RD, Louzada P, Lucisano-Valim YM, Donadi EA. DNA damage increase in peripheral neutrophils from patients with rheumatoid arthritis is associated with the disease activity and the presence of shared epitope. *Clin Exp Rheumatol*. 2017;35(2):247-254. PMID: 27908303
50. Barrett CD, Hsu AT, Ellson CD, Y Miyazawa B, Kong YW, Greenwood JD. Blood clotting and traumatic injury with shock mediates complement-dependent neutrophil priming for extracellular ROS, ROS-dependent organ injury and coagulopathy. *Clin Exp Immunol*. 2018;194(1):103-117. PMID: 30260475



ÇİNEMRE ve Ark.
Ox-Ldl ile Nötrofil Aktivasyonu
Sırasında Oluşan DNA Hasarının
Komet Assay ile Değerlendirilmesi