

## **Ispitivanje stepena oštećenja DNK leukocita periferne krvi pacijenata sa Alchajmerovom bolešću primenom Komet testa**

**Lada Živković\*<sup>1</sup>, Bosiljka Plećaš<sup>1</sup>, Vladan Bajić<sup>2</sup>,  
Ninoslav Đelić<sup>3</sup>, Biljana Spremo-Potparević<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za fiziologiju, Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Institut za istraživanje i razvoj Galenike a.d., Pasterova 2, 11000 Beograd, Srbija

<sup>3</sup>Univerzitet u Beogradu - Fakultet veterinarske medicine, Katedra za biologiju, Bulevar oslobođenja 18, 11000 Beograd, Srbija

\*Adresa za korespondenciju: lada@pharmacy.bg.ac.rs

---

### **Kratak sadržaj**

Oštećenja DNK su snažan okidač apoptoze neurona i prisutna su kod obolelih od Alchajmerove bolesti (AB). Ona se registruju i u ćelijama koje nisu neuroni, kao što su leukociti periferne krvi i fibroblasti. U ovom radu smo ispitivali i poredili uticaj AB i hronološkog starenja na oštećenje DNK leukocita periferne krvi. Koristili smo elektroforezu pojedinačnih ćelija na gelu (Komet test), kao savremenu i pouzdanu metodu za registrovanje oštećenja jedarne DNK čiji fragmenti formiraju rep komete, koji nije prisutan u neoštećenim ćelijama. Analizirani su leukociti: AB pacijenata sa sporadičnim oblikom bolesti, zdravih starih osoba odgovarajuće starosti i zdravih odraslih mlađih kontrolnih osoba. Dobijeni rezultati pokazuju da je kod AB ispitanika frekvencija leukocita sa oštećenjima DNK statistički značajno veća nego kod kontrola slične starosti; značajan porast učestalosti oštećenja DNK zapaža se i tokom hronološkog starenja. Na osnovu dobijenih podataka možemo da zaključimo da je genetička nestabilnost, inače prisutna i kod starih osoba, jače izražena kod pacijenata sa sporadičnom AB, što ukazuje na to da ona nije samo epifenomen starenja, već je karakteristika same bolesti.

**Ključne reči:** oštećenja DNK leukocita periferne krvi, Alchajmerova bolest, starenje, Komet test

---

## Uvod

Alchajmerova bolest (AB) je najčešći neurodegenerativni poremećaj u starosti, koji se klinički karakteriše progresivnim gubitkom pamćenja i drugim znacima slabljenja intelektualnih (kognitivnih) sposobnosti. Stoga je AB glavni uzrok demencije kod stare populacije (1). Neuropatološki znaci AB uključuju pojavu amiloidnih plaka i neurofibrilarnih klubadi u mozgu. Osnovna komponenta plaka su fibrilarni  $\beta$  amiloidni peptidi, dok neurofibrilarna klupčad nastaju akumulacijom abnormalnih  $\tau$  (tau) proteinskih filamenata (2). Povećana sinteza i akumulacija nerastvornog amiloida  $\beta$  u plakama inicira kaskadu biohemijskih događaja (zapaljenje, stvaranje slobodnih radikala, kompromitovanu sintezu neurotransmitera) koja na kraju dovodi do smrti ćelije (3). Intenzivna degeneracija neurona i reaktivna gliozna su neposredni uzroci teških neuroloških poremećaja kod AB.

AB se ispoljava u dve forme: nasledna (familijarna) i sporadična. Familijarna forma se javlja ranije, oko 50. godine života, ima daleko manju frekvenciju od sporadične forme i jasno izražen obrazac autonomno dominantnog nasleđivanja (4). Kod sporadične forme, koja čini oko 90% slučajeva AB, bolest počinje u kasnijim godinama života, najverovatnije kao posledica uticaja većeg broja genetičkih faktora rizika i spleta različitih epigenetičkih događaja (5). Mada specifična etiologija i patogeneza sporadične AB nisu poznate, starenje je glavni faktor rizika i koocidira sa razvojem bolesti (6). Oksidativna oštećenja DNK su zajednička karakteristika neurona i nekih perifernih ćelija, npr. leukocita i fibroblasta, i sporadičnih i naslednih AB pacijenata (7, 8). Ipak, ostaje otvoreno pitanje da li je oksidativni stres rana komponenta u patogenezi bolesti ili je on zajednički završni korak neurodegenerativnog procesa kod AB (9).

Kao i starenje, sporadična forma AB je udružena sa genetičkom nestabilnošću koja se manifestuje promenama u broju i/ili strukturi hromozoma (10). U našim dosadašnjim istraživanjima pokazali smo prisustvo prevremene centromerne deobe (PCD) u neuronima cerebralnog korteksa (11) i na hromozomima limfocita periferne krvi (12-14) pacijenata sa sporadičnom formom AB. Imajući u vidu sličnost i preklapanje određenih genetičkih abnormalnosti tokom normalnog hronološkog starenja i kod sporadične forme AB, u ovom radu smo ispitivali učestalost oštećenja DNK leukocita periferne krvi AB pacijenata i kontrolnih zdravih osoba slične prosečne starosti. U studiju smo uključili i kontrolne mlade osobe, da bismo mogli da poredimo uticaje starenja *per se* i AB na oštećenja DNK. Za procenu učestalosti i stepena oštećenja DNK koristili smo Komet test, koji ima široku primenu u

ispitivanjima genotoksičnosti i predstavlja neprocenjivu metodu za ispitivanja fundamentalnih aspekata oštećenja DNK i posledičnih odgovora ćelije (15).

## Materijal i metode

### Ispitanici

Etički komitet za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta u Beogradu odobrio je istraživanje na osnovu pisane saglasnosti zdravih ispitanika i rođaka AB pacijenata (odobrenje br. 2492/1). AB pacijenti su lečeni na Neurološkoj klinici Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Uzorci krvi kontrolnih mladih i starih ispitanika uzimani su u okviru sistematskih pregleda. Na osnovu kliničke slike, pojave bolesti oko 65. godine života i odsustva AB u porodičnoj istoriji obolelih, svi slučajevi su smatrani sporadičnim. Zdrave kontrolne osobe kao i pacijenti bili su nepušači i nisu uzimali antioksidanse ili lekove za koje se zna da utiču na oksidativno oštećenje ili oštećenja DNK. Demografske karakteristike ispitanika prikazane su u Tabeli I.

**Tabela I** Demografske karakteristike ispitanika

	<b>Mladi Kontrola</b>	<b>Stari Kontrola</b>	<b>AB</b>
Starost (godine)*	22,17±1,47	73,67±4,86	73,41±6,08
Raspon starosti	20-24	66-81	65-83
Trajanje demencije (godine)*	/	/	2.83±0.51
Broj ispitanika u grupi	12	12	12
Žene/muškarci	6/6	6/6	6/6

\*, Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna greška.

## Uzorci krvi

Ispitanicima je uzimano po 5 ml periferne krvi iz kubitalne vene u vakutajneru sa heparinom.

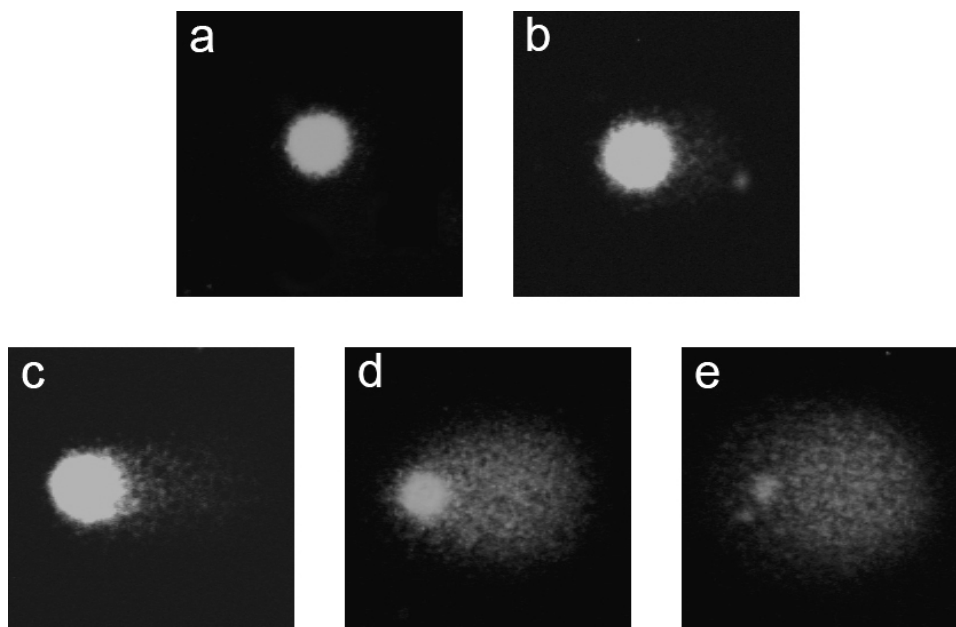
## Komet test

Oštećenja DNK leukocita periferne krvi praćena su elektroforezom pojedinačnih ćelija na gelu (Komet test). Prilikom izrade preparata korišćen je alkalni metod prema Singh i sar., (1988) (16). Postupak je podrazumevao nanošenje 1% agaroze (Sigma) normalne tačke topljenja (NMP) na brušena predmetna stakla (Menzel-Glaser). Pločice su ostavljane da se suše na sobnoj temperaturi najmanje tri dana. Na takvo predmetno staklo nanosena je suspenzija uzorka krvi u agarozu (Sigma) (finalna koncentracija agaroze 0,6%) niske tačke topljenja (LMP), pa je potom pločica sa pokrovnom ljušpicom stavljana na led u trajanju od 5 minuta. Tako pripremljeni preparati potapani su u ohlađen (4°C) pufer za liziranje 1% natrijum sarkozinata (Sigma), 2,5 M NaCl (Zorka), 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma), 10 mM Tris-HCL (Sigma), 1% Triton X-100 (Sigma) i 10% dimetil sulfoksid (Sigma) pH 10 i držani tokom noći na 4°C.

Nakon lize ćelija preparati su stavljeni u pufer za denaturaciju 0,3 M NaOH (Zorka, Šabac), 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma), pH=13 i držani na 4°C tokom 30 minuta. Elektroforeza je puštena u kadici, u puferu za denaturaciju, u jednosmernom strujnom polju jačine 300 mA i napona 19 V u trajanju od 30 minuta. Neutralizacija je izvršena ispiranjem u 0,4 M Tris-HCl puferu pH 7,5 u trajanju od pet minuta. Nakon tri ciklusa ispiranja preparati su obojeni rastvorom etidijum bromida (Sigma), koncentracije 20 µg ml, u trajanju od 10 minuta i do analize držani u vlažnoj komori na 4°C.

Preparati su analizirani Olympus BX 50 mikroskopom, uz korišćenje fluorescentne svetlosti talasne dužine 510-560 nm.

Za svaki uzorak analizirano je 100 ćelija (po 50 ćelija sa pločice po osobi). Pod fluorescentnom svetlošću ćelije sa oštećenjima DNK se vide kao komete sa jasnom fluorescentnom glavom i repom čija dužina i gustina zavise od stepena oštećenja DNK (Slika 1b,c,d,e); ćelije bez oštećenja ili sa minimalnim oštećenjima DNK imaju intaktno, ovalno jedro bez repa (Slika 1a). Na osnovu dva kriterijuma: prisustva i stepena oštećenja DNK, ćelije su vizuelnom procenom klasifikovane u pet kategorija (17): **a.** neoštećene ćelije, stepen oštećenja manji od 5%; **b.** stepen oštećenja >5% do 20%; **c.** srednji stepen oštećenja >20% do 40%; **d.** visok stepen oštećenja >40% do 95% i **e.** totalno oštećenje >95%.



**Slika 1. Klasifikacija oštećenja DNK leukocita periferne krvi na osnovu količine DNK u repu komete: (a) neoštećene ćelije, stepen oštećenje manji od 5%; (b) stepen oštećenja >5% do 20%; (c) srednji stepen oštećenja >20% do 40%; (d) visok stepen oštećenja >40% do 95% i (e) totalno oštećenje >95%.**

## **Analiza podataka i statistička obrada rezultata**

Na osnovu dobijenih rezultata izračunata su tri parametra oštećenja DNK: 1) frekvencija svih ćelija sa oštećenjima DNK (kometa), bez obzira na stepen oštećenja, 2) indeks oštećenja, kao odnos ukupnog broja oštećenih ćelija i neoštećenih ćelija i 3) stepen oštećenja ćelija (18). U cilju procene učestalosti ćelija sa različitim stepenima oštećenja DNK, komete kategorija „b” i „c” su kombinovane i smatrane ćelijama sa malim stepenom oštećenja jedara, a kombinovane kategorije „d” i „e” su smatrane ćelijama sa velikim stepenom oštećenja jedara.

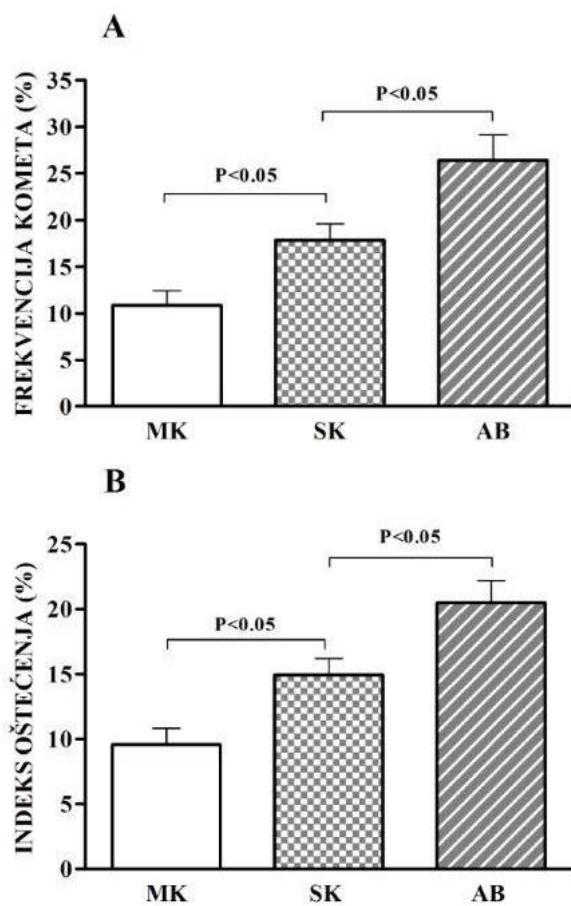
Statistička obrada je urađena jednofaktorskom analizom varijanse praćenom Bonferonijevim testom za poređenje odabranih grupa i  $\chi^2$  testom za poređenje broja ispitanika sa velikim stepenom oštećenja DNK između grupa. Korišćen je statistički softver GraphPed Prism 5.0.  $P < 0.05$  je smatrano statistički značajnom razlikom.

## Rezultati

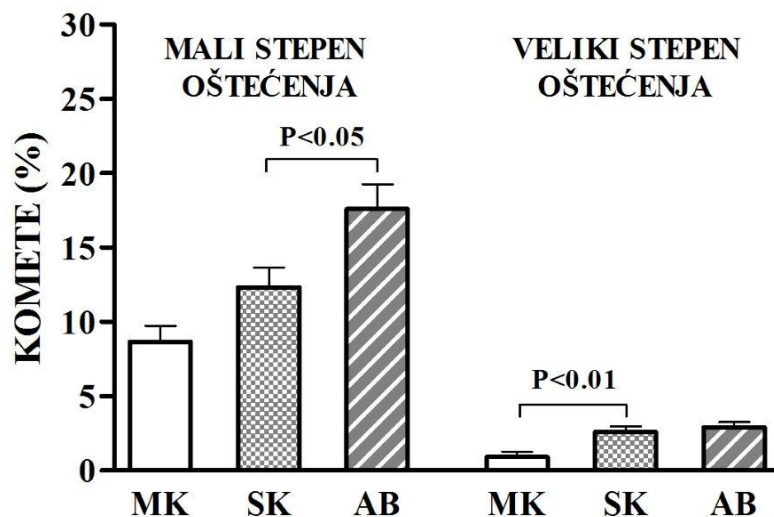
Ispitivanje oštećenja DNK leukocita periferne krvi u ovom radu sprovedena su na tri grupe ispitanika: obolelim od AB i starim i odraslim mladim zdravim osobama kao kontrolama (Tabela I). Budući da multifaktorska analiza varijanse nije pokazala statistički značajan uticaj pola na oštećenja DNK ispitivanih grupa, osobe oba pola odgovarajuće starosti i zdravstvenog stanja su dalje razmatrane kao jedna grupa.

Rezultati koji se odnose na frekvenciju ukupnog broja ćelija sa oštećenom DNK (Graf. 1A) pokazuju da je prosečna učestalost kometa kod AB statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće starosti ( $26.42 \pm 2.71\%$  vs  $17.83 \pm 1.79\%$ ;  $P < 0.05$ ). Taj parametar je značajno ( $P < 0.05$ ) veći kod starih ( $17.83 \pm 1.79\%$ ) nego kod mladih ( $10.84 \pm 1.60\%$ ) kontrolnih ispitanika. Promene u istom smislu registruju se i sa indeksom oštećenja, kao odnosom između ukupnog broja oštećenih i neoštećenih ćelija (Graf. 1B). Kod AB subjekata indeks oštećenja ( $20.50 \pm 1.69$ ) je značajno ( $P < 0.05$ ) veći u odnosu na vrednost ( $14.92 \pm 1.30$ ) kod zdravih osoba slične starosti; kod mladih kontrolnih ispitanika indeks oštećenja ( $9.58 \pm 1.25$ ) je značajno manji ( $P < 0.05$ ) nego kod starih kontrola.

Praćenje stepena oštećenja DNK (Graf. 2), kao frekvencije kometa sa malim i velikim stepenom oštećenja DNK, pokazalo je da je u AB grupi značajno ( $P < 0.05$ ) povećan broj ćelija sa malim stepenom oštećenja DNK ( $17.58 \pm 1.68\%$ ) u odnosu na kontrolnu grupu odgovarajuće starosti ( $12.33 \pm 1.33\%$ ). S druge strane, kada se uporede stepeni oštećenja kontrola različite starosti, zapaža se da su ćelije sa velikim stepenom oštećenja DNK učestalije kod starih nego kod mladih kontrolnih osoba ( $2.58 \pm 0.38\%$  vs  $0.92 \pm 0.34$ ;  $P < 0.01$ ). Povećanje frekvencije manje oštećenih ćelija kod starih kontrola, međutim, nije statistički značajno.



**Grafikon 1.** Frekvencija kometa leukocita periferne krvi (A) i indeks oštećenja ćelija (B) osoba sa Alchajmerovom bolešću (AB) i starih (SK) i odraslih mladih (MK) zdravih osoba. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=12 po grupi). Statistički značajne razlike između grupa označene su na grafikonima.



**Grafikon 2. Frekvencija kometa sa malim i velikim stepenom oštećenja DNK kod osoba sa Alchajmerovom bolešću (AB) i starih (SK) i odraslih mladih (MK) zdravih osoba. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna greška (n=12 po grupi). Statistički značajne razlike između grupa označene su na grafikonima.**

Da bismo potvrdili nalaze o uticaju AB, odnosno hronološkog starenja na stepen oštećenja DNK leukocita periferne krvi, binarnim testom smo proverili da li između grupa postoje statistički značajne razlike u broju osoba kod kojih su prisutni leukociti sa velikim stepenom oštećenja DNK. Tako je ovaj stepen oštećenja nađen kod svih (12 od 12) AB pacijenata, 11 od 12 starih kontrolnih ispitanika i 6 od 12 mladih odraslih ispitanika; statistički značajno se razlikuju samo kontrolne grupe različite starosti ( $P<0.05$ ).

## Diskusija

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je kod AD ispitanika frekvencija leukocita sa oštećenjima DNK, registrovanih Komet testom, statistički značajno veća nego kod kontrolnih osoba slične starosti; značajan porast učestalosti oštećenja DNK zapaža se i tokom hronološkog starenja. Pored toga, kod AB pacijenata značajno je povećana frekvencija ćelija sa malim stepenom oštećenja DNK u poređenju sa vrednostima dobijenim iz kontrolnih uzoraka. Međutim, broj ispitanika kod kojih je prisutan veći stepen oštećenja DNK ne razlikuje se



značajno između AB grupe i kontrolne grupe odgovarajuće starosti, ali je značajno veći nego kod mladih zdravih osoba.

Preovladava mišljenje da u osnovi bolesti koje prate starost, kao što su maligne i neurodegenerativne, leži akumulacija oštećenja DNK odnosno poremećaji ćelijskog ciklusa (19-22). Dva najviše ispitivana i verovatno glavna uticaja koja uvode ćeliju u aberantni ćelijski ciklus su endogeni oksidativni stres i gubitak genetičke stabilnosti (23). Usmeravanje ćelije u ponovni ciklus pod uticajem pomenutih faktora u somatskim ćelijama može da rezultuje proliferacijom i malignom transformacijom, dok u neuronima kao visokodiferenciranim ćelijama koje se ne dele dovodi do ćelijske smrti apoptozom (24, 25 i 21). I zaista, propadanje neurona u specifičnim regionima mozga karakteristično je za AB i druge neurodegenerativne bolesti i glavni uzrok teške kliničke slike. Rezultati brojnih ispitivanja nesumnjivo pokazuju da u neurodegenerativnim poremećajima ponovni ulazak neurona u ćelijski ciklus prethodi apoptozi (26). U našem prethodnom radu (11) pokazali smo primenom metode fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) da su u cerebralnom korteksu postmortem moždanog tkiva kod AB ispitanika prisutni neuroni u G2 fazi ćelijskog ciklusa. Budući da neuroni ne ulaze u mitozu, dolazi do poremećaja funkcije i prevremene ćelijske smrti (21).

Rezultati ovog rada ukazuju na prisustvo genetičke nestabilnosti u ćelijama koje nisu neuroni, tj. u leukocitima periferne krvi, kako kod AB pacijenata tako i kod zdravih ispitanika slične starosti. Sudeći prema broju leukocita sa oštećenjima DNK, ekspresija genetičke nestabilnosti je izraženija kod AB nego kod odgovarajuće kontrole. Slične nalaze smo dobili ispitujući fenomen prevremene centromerne deobe (PCD) na određenim hromozomima limfocita periferne krvi sporadičnih AB pacijenata i odgovarajućih kontrola (12-14), što je u saglasnosti sa radovima drugih autora (27, 28). PCD na hromozomima neurona smatra se dokazom ponovnog ulaska u ćelijski ciklus (11, 29).

Ako se zna da je AB neurodegenerativni poremećaj, nameće se pitanje značaja ekspresije genetičke nestabilnosti u ćelijama koje nisu neuroni, kako za rasvetljavanje etiologije i patogeneze bolesti, tako i za eventualnu dijagnostiku i praćenje progresije bolesti. Genetička nestabilnost u perifernim ćelijama AB i drugih neurodegenerativnih bolesti ukazuje na generalizovanu osetljivost ćelija na faktore koji dovode do ireverzibilnih oštećenja DNK, pa se AB može smatrati i sistemskom bolešću (30). S druge strane, kako oštećenja DNK, hromozomska nestabilnost i ponovni ulazak u ćelijski ciklus nisu parametri specifični za AB, već se javljaju i tokom hronološkog starenja, kao i kod drugih neurodegenerativnih stanja, njihova vrednost kao biomarkera AB je ograničena. Ipak, treba naglasiti da naši sadašnji i prethodni (12-14) rezultati, kao i rezultati

drugih istraživača (31, 32) jasno pokazuju da izmenjena genska ekspresija u perifernim ćelijama kod sporadične forme AB nisu samo epifenomen starenja, već postojani znak bolesti.

Osim značajno različite učestalosti perifernih leukocita sa oštećenjima DNK kod AB i kontrolnih ispitanika, u ovom radu smo registrovali i razlike u frekvenciji ćelija sa malim i velikim stepenom oštećenja DNK između ispitivanih grupa. Kod AB pacijenata značajno je povećana frekvencija ćelija sa malim stepenom oštećenja DNK i ta kategorija je primarno odgovorna za povećanje učestalosti kometa u odnosu na kontrole odgovarajuće starosti. Hronološko starenje ima veći uticaj na frekvenciju ćelija sa velikim stepenom oštećenja DNK, što su registrovali i drugi autori (33, 34). Takođe, broj ispitanika u grupi sa velikim oštećenjima DNK u leukocitima značajno se razlikuje samo između starih i mladih osoba. Za sada je teško objasniti sličnu frekvenciju leukocita sa velikim oštećenjima kod AB i kontrole slične starosti; jedno od objašnjenja moglo bi da bude povećana osetljivost leukocita sa velikim stepenom oštećenja DNK na apoptozu, budući da je pokazano da su mononuklearni leukociti periferne krvi AB pacijenata u odnosu na odgovarajuće kontrole podložniji tom tipu ćelijske smrti (31, 35).

## **Zaključak**

Imajući u vidu činjenicu da promene u neuronima i ćelijama perifernih tkiva kod AB ne moraju da budu istog intenziteta i/ili istovremene, nastavak intenzivnih ispitivanja perifernih ćelija kod AB i drugih neurodegenerativnih bolesti mogao bi značajno da doprinese razumevanju etiologije i patogeneze tih stanja, a time i lečenju.

## **Zahvalnica**

Izradu ovog rada finansiralo je Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj, projekat 173034.

## Literatura

1. Clark CM. Clinical manifestations and diagnostic evaluation of patients with Alzheimer's disease. In: Clark CM, Trojanowski JQ, editors. Neurodegenerative dementias: clinical features and pathological mechanisms. New York: McGraw-Hill; 2000. 95–114p.
2. National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. Consensus recommendations for the post-mortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1997;Suppl:1–2.
3. Hernández F, Avila J., Tauopathies". *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(17):2219–33.
4. Schellenberg GD. Early Alzheimer's disease genetics. *J Alzheimers Dis*. 2006;9:367–372.
5. Chapman PF, Falinska AM, Knevetz SG, Ramsay M. Genes, models and Alzheimer's disease. *Trends Gen*. 2001;17:254–61.
6. Reddy PH, Beal MF. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*. 2008;14:45–53.
7. Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Acta*. 2000;1502:139–44.
8. Cecchi C, Fiorillo C, Sorbi S, Latorraca S, Nacmias B, Bagnoli S, et al. Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(10):1372–9.
9. Pratico D. Peripheral biomarkers of oxidative damage in Alzheimer's disease: the road ahead. *Neurobiol Aging*. 2005;26(5):581–583.
10. Wojda A, Zietkiewicz E, Mossakowska M, Pawlowski W, Skrzypczak K, Witt M. Correlation between the level of cytogenetic aberrations in cultured human lymphocytes and the age and gender of donors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006;61:763–772.
11. Spremo-Potparević B, Zivković L, Đelić N, Plečas-Solarović B, Smith MA, Bajić V. Premature centromere division of the X chromosome in neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2008;106(5):2218–23.
12. Spremo-Potparevic B, Zivkovic L, Delic N, Bajic V. nalysis of premature centromere division (PCD) of the X chromosome in Alzheimer patients through the cell cycle. *Exp Gerontol*. 2004;39(5):849–54.
13. Zivković L, Spremo-Potparević B, Đelić N, Bajić V. Analysis of premature centromere division (PCD) of the chromosome 18 in peripheral blood lymphocytes in Alzheimer disease patients. *Mech Ageing Dev*. 2006;127(12):892–6.

14. Zivković L, Spremo-Potparević B, Plecas-Solarović B, Đelić N, Očić G, Smiljković P, Siedlak SL, Smith MA, Bajić V. Premature centromere division of metaphase chromosomes in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer's disease patients: relation to gender and age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010;65(12):1269-74.
15. Migliore L, Fontana I, Trippi F, Colognato R, Coppedè F, Tognoni G, Nucciarone B, Siciliano G. Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AB patients. *Neurobiol Aging*. 2005;26(5):567-73.
16. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184-91.
17. Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res*. 1994;307(1):261-71.
18. Consiglio AR, Ramos AL, Henriques JA, Picada JN. DNA brain damage after stress in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34(4):652-6.
19. Migliore L, Coppedè F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutat Res*. 2002;512(2-3):135-5.
20. Turker MS. Somatic cell mutations: can they provide a link between aging and cancer? *Mech Ageing Dev*. 2000;117(1-3):1-19.
21. Bonda Đ, Bajić VP, Spremo-Potparevic B, Casadesus G, Zhu X, Smith MA, Lee HG. Review: cell cycle aberrations and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2010;36(2):157-63.
22. Brasnjevic I, Hof PR, Steinbusch HW, Schmitz C. Accumulation of nuclear DNA damage or neuron loss: molecular basis for a new approach to understanding selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases. *DNA Repair (Amst)*. 2008;7(7):1087-97.
23. Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(4):494-502.
24. Heintz N. Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends Biochem Sci*. 1993;18(5):157-9.
25. Feddersen RM, Ehlenfeldt R, Yunis WS, Clark HB, Orr HT. Disrupted cerebellar cortical development and progressive degeneration of Purkinje cells in SV40 T antigen transgenic mice. *Neuron*. 1992;9(5):955-66.
26. Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest*. 2003;111(6):785-93.
27. Kormann-Bortolotto MH, de Arruda Cardoso Smith M, Toniolo Neto J. Alzheimer's disease and ageing: a chromosomal approach. *Gerontology*. 1993;39(1):1-6.

28. Migliore L, Testa A, Scarpato R, Pavese N, Petrozzi L, Bonuccelli U. Spontaneous and induced aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Hum Genet.* 1997;101(3):299-305.
29. Bajić VP, Spremo-Potparević B, Zivković L, Đelić N, Smith MA. Is the time dimension of the cell cycle re-entry in AB regulated by centromere cohesion dynamics? *Biosci Hypotheses.* 2008;1(3):156-161.
30. Mórocz M, Kálmán J, Juhász A, Sinkó I, McGlynn AP, Downes CS, Janka Z, Raskó I. Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2002;23(1):47-53.
31. Kadioglu E, Sardas S, Aslan S, Isik E, Esat Karakaya A. Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Biomarkers.* 2004;9(2):203-9.
32. Swerdlow RH. Is aging part of Alzheimer's disease, or is Alzheimer's disease part of aging? *Neurobiol Aging.* 2007;28(10):1465-80.
33. Retana-Ugalde R, Altamirano-Lozano M, Mendoza-Núñez VM. Is there a similarity between DNA damage in adults with chronic alcoholism and community-dwelling healthy older adults? *Alcohol Alcohol.* 2007;42(2):64-9.
34. Mendoza-Núñez VM, Retana-Ugalde R, Sánchez-Rodríguez MA, Altamirano-Lozano MA. DNA damage in lymphocytes of elderly patients in relation with total antioxidant levels. *Mech Ageing Dev.* 1999;108(1):9-23.
35. Bergman M, Salman H, Beloosesky Y, Daldetti M, Bessler H. Are peripheral blood cells from patients with Alzheimer disease more sensitive to apoptotic stimuli? *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2002;16(3):156-60.

# **Evaluation of DNA damages in peripheral blood leukocytes of Alzheimer's disease patients by Comet test**

**Lada Živković\*<sup>1</sup>, Bosiljka Plećaš<sup>1</sup>, Vladan Bajić<sup>2</sup>,  
Ninoslav Đelić<sup>3</sup>, Biljana Spremo-Potparević<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Physiology, Division of Biology, Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Institute of Pharmaceutical Research and Development Galenika a.d., Pasterova 2, 11000 Beograd, Srbija

<sup>3</sup>University of Belgrade - Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biology, Bulevar Oslobođenja 18, 11000 Belgrade, Serbia

---

## **Summary**

DNA damage is a powerful trigger of apoptosis in neurons and is present in patients with Alzheimer's disease (AB). Also, DNA damage is registered in cells that are not neurons, such as peripheral blood leukocytes and fibroblasts. In this paper we examined and compared the impact of AB and chronological aging on DNA damage in peripheral blood leukocytes. We used electrophoresis of individual cells on gel (comet test) as a modern and reliable method for registration of nuclear DNA damage whose fragments form a comet tail, which is not present in undamaged cells. We analyzed leukocytes of these groups: AB patients with sporadic form of the disease, healthy elderly of an appropriate age and healthy younger adults as controls. The results show that the frequency of AB patients with leukocyte DNA damage significantly is higher than in similar control age-matched controls. Also, a significant increase in the frequency of DNA damage has been observed during chronological aging. Based on the obtained data we can conclude that genetic instability, otherwise present in the elderly is more expressed in patients with sporadic AB, which indicates that it is not just an epiphenomenon of aging, but is characteristic of the disease.

**Key words:** peripheral blood leukocyte DNA damage, Alzheimer's disease, aging, comet tests

---